臨床検査室を対象とした

**総コレステロールの国際標準化プログラム**

# Phase-1

#

2019年07月

US National Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN)

 　　　国立循環器病研究センター 研究所 研究推進支援部　脂質基準分析室**CDC/CRMLNによる総コレステロールの国際標準化プログラム(Phase-1)**

　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　 　 2019.07

　　　　　　　　　　　　　　　　　　　国立循環器病研究センター 研究所 研究推進支援部　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8ヶ国の

8施設（2018年10月現在）の脂質基準分析室で構成されるCRMLN（US Cholesterol Reference Method Laboratory Network）が開発した臨床検査室向けの総コレステロールの国際標準化プログラムです。このプログラムは、ヒトの新鮮な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国際標準化システムです。このプログラムを通じて得られる成績には高度な統計解析が施され、検査室の「精度保証のエビデンス」となる認証書は国際的な効力を持ち、今日では、世界各国、特に欧米諸国での疫学研究や臨床試験の場で広く活用されています。国際標準化プログラムへの参加には、制限はありません。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(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。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)

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、右は新しい国立循環器病研究センターの建物です。（左から順にエントランス棟、病院、ｵｰﾌﾟﾝｲﾉﾍﾞｰｼｮﾝｾﾝﾀｰ（OIC）および研究棟）



2. CRMLN (US Cholesterol Reference Method Laboratory Network)は、米国から1施設と米国外から7施設の計8施設の脂質基準分析室で構成される国際標準化ネットワークです(2018年10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\_members.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。CDCによって総コレステロールの認証を受けた日本の臨床検査室の一覧は、CDCのHPの中の "List of International Clinical Laboratories Certified for Total Cholesterol" に公表されております。

 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)

 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、総コレステロールでは、その一次標準(絶対基準分析法)であるGC-IDMS法(NIST)や二次標準(実用基準分析法)であるAbell-Kendall法(CDC,CRMLN)を、「下位」とは総コレステロールの日常分析法（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、CDCや国立循環器病研究センター の二次標準を経由して、NISTの一次標準まで、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。

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試料、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 |
| 1. 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数値で「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: 総コレステロールの国際標準化(Phase-1)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。従来通り、FAX(06-6170-1708)でもお申込みいただけます。

7. 基準分析法: CDCとCRMLNにおける総コレステロールの基準分析法は、Abell-Kendall(AK)法です。AK法は、検体をKOH性のアルコールで加水分解し、生成した遊離コレステロールをヘキサンで抽出・蒸発乾固させ、Liebermann-Burchard試薬を加えて発色させ、分光光度計で定量する方法です。その工程は全て用手法で行なわれ、目標値が出るまでに約1.5日を要します。総コレステロールの目標値は、AK法で確定されます。

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、総コレステロールの場合、正確度が%バイアスで±1.0%以内、精密度はCVで1.0%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、その結果として総コレステロールの認証資格を保有しています。

9. 標準物質と管理血清: AK法で使用される総コレステロールの第一次標準物質(Primary Reference Material)は、米国のNISTのSRM 911c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-1): 総コレステロールの脂質標準化プログラムは、CDC/CRMLNで開発され、CDCのHP (http://www.cdc.gov/labstandards/crmln.html) に掲載されています。[英文のプログラム名は](http://www.cdc.gov/labstandards/crmln.htm)、Certification Protocol for Clinical Laboratoriesです。このプログラムによって認証された臨床検査室の名前は、List of International Clinical Laboratories Certified for Total Cholesterolに掲載されています。

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6濃度の「新鮮血清」を準備して下さい。

 (1)　濃度域1⇒100～200 mg/dLの濃度域で、2濃度（種類）の新鮮血清①と②を準備して下さい。　※

　　　濃度域2⇒200～240 mg/dLの濃度域で、2濃度（種類）の新鮮血清③と④を準備して下さい。　※

 濃度域3⇒240 mg/dL以上の濃度域で、2濃度（種類）の新鮮血清⑤と⑥を準備して下さい。　※

　　 ※ 濃度域の1～3で準備する血清の本数は、自己分析用として各濃度で3本（3測定日分）、国立循環器病研究センター用として各濃度で1本必要です。

　(2)　濃度域1の最低値①と濃度域3の最高値⑥との濃度差は、少なくとも100 mg/dLは開くこと。

　(3)　各濃度域での2濃度の差が、少なくとも20 mg/dLは開くこと。

　(4)　濃度域3の高濃度血清⑥の総コレステロール値は、300 mg/dL以上が望ましい。

　　　　　　　　　　　　　　 200　　　　　　　　　 240

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

 　↑　　　　　　　↑　　　↑　　　　　　　↑ 　↑　　　　　　 ↑ ⑥－①＝100 mg/dL以上の差が望ましい

20 mg/dL

以上開くこと

20 mg/dL

以上開くこと

20 mg/dL

以上開くこと

1. ②　　　③　　　　　　　④　 ⑤　　　　　　 ⑥　⑥＝300 mg/dL以上が望ましい

　(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、ヒトの「新鮮な個人血清」を使用することを原則としています。やむを得ず血清を混合する場合は、2～3人までとして下さい。

　(注2)　新鮮血清の定義は、測定開始の3日前から当日までに採取されたヒト血清です。

　(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リポ蛋白の組成や構造(プロファイリング)が異なり、試薬との反応性に違いが発生します。その結果、間違った結果が得られる可能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出来ません。これらを使用した場合、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（１濃度当たり、3測定日分として3本必要）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、1濃度につき最低1.0 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6濃度の血清を3日間、無作為に二重測定して下さい。その際、第1測定日（Run 1）と第2測定日（Run 2）との間を少なくとも2日間、また、第2測定日(Run 2)と第3測定日（Run 3）との間も少なくとも2日間の間隔を開けて分析するように、検体を配分して下さい。このルールに違反した場合、確実に失格となりますので、ご注意下さい。測定結果は、12頁の記入例にならって、10頁のCholesterol Results Formに記入して下さい。

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: 総コレステロール値の解析ソフトは、CDC/CRMLNで考案されました。ソフト名は、Total Cholesterol Analysis Software (April, 2000)です。解析ソフトは2004年01月に部分改訂され、従来の解析結果よりも一段と詳細な内容となっています。主な改正点は次の通りです。

　(1)　判定結果が明示されています。

CDCやCRMLNの分析室が解析内容を基にして標準化の合否を判定する際には、根拠が必要となります。その根拠として、R-square、Predicted at 200 mg/dL、Predicted at 240 mg/dL、Average % Bias、Average % Absolute Bias、Average within-sample CV、及び、外れ値(Outliers)として Within-method outliersと Between-method outliersの8種類の項目を審査します。これらの審査内容が判定基準を満たした場合、 Resultの欄に (OK)として、また、満たされていなければ（Fail）として出力されます。このことにより、標準化が不可と判定された理由がはっきりと判別でき、原因の所在と今後の修復対策が取り易くなります。

　(2)　外れ値（Outliers）の内容が詳しく示されています。

外れ値（Outliers）は、Within-method outliersと Between-method outliersの2つの要素に分類できます。外れ値はPhase 1（Absolute Test）とPhase 2（Relative Test）の両面から解析、出力されています。このことから、外れ値を発生させるに至った原因の解析と今後の修復対策が取り易くなります。

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。

17．6濃度の血清、標準化参加分析室情報(8頁)、Information Form(9頁)、及び、Cholesterol Results Form(10頁) の準備が出来ましたら、検体と一緒に国立循環器病研究センター 研究所 脂質基準分析室 (C棟50601)までお送り下さい。検体はドライアイスで凍結してお送り下さい。同時に、申込書(7頁)へ必要事項を記入の上、国立循環器病研究センターまで、電子メール（CDC\_hyojunka@ncvc.go.jp：ファイル添付）またはFAX（06-6170-1708）でお知らせ下さい。国立循環器病研究センターは土曜、日曜、祝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、検体の発送日にはご注意下さい。

18. 総コレステロール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AK法による目標値の±3％以内、精密度は変動係数(CV)で3％以下、相関係数はｒ2で0.975以上とされています。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18.の判定基準が満たされた場合、CDC/CRMLNから認証書が発行されます。総コレステロールの認証書の有効期限は6ヶ月間です。CDCへの認証書の申請手続きは、国立循環器病研究センターで行います。CDCから送られてきた認証書は、データー解析結果と請求書と一緒に、検体受付後、1ヶ月以内を目処にお返し致します。

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、及びトリグリセライド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.html)、あるいは国立循環器病研究センター研究所 研究推進支援部のHPを通じてご覧頂けます。（近日公開予定）

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。総コレステロールの技術料は、CDC/CRMLNの規定に従い、30,000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＄、トリグリセライドで80＄の請求が出来ると規定されています。（なお、Phase-3については、過去半年の平均ドル円レートを元に計算して、日本円で請求させて頂きます。）

24. 試薬メーカーを対象とした脂質標準化プログラム(Phase-3)は、CDCのHP (http://www. cdc.gov/labstandards/crmln.html)で検索できます。

25. 基準分析法の更新予定：　現在CDCとCRMLNで使用している脂質基準分析法は、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です。化学的分析法は優れた再現性を有するものの、ごくわずかではありますが目的物質以外の誤差が入ることは避けられないため、脂質基準分析法も古典的な化学的分析法から、目的物質そのものの質量を測定対象とするアイソトープ希釈/ガスクロマトグラフ/質量分析計法(GC-IDMS法)に切り替える予定で進めておりますが、両測定法間の測定値の差異がすべての試料で一律ではないことから、基準法の変更には、特に疫学分野の先生方から反対の声が多く寄せられており、未だ実現には至っておりません。　CDCとCRMLNでは、引き続き両測定法による総コレステロールの測定を続け、両測定法間の関係性を確認していくことにしています。近年、総コレステロールを質量分析計で値付けしたとされる実用標準血清が販売されているようですが、上記の観点からその取り扱いには細心の注意が必要と思われます。下図の左は国立循環器病研究センターで稼働中のコレステロール専用の四重極型質量分析計、右はコレステロール(m/z 368)とその安定同位体(m/z 370)のフラグメントピークのスペクトルと検量線を示しています。



26. 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 研究所 研究推進支援部 (C棟、５階 50601号室）US National Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN) |
| 責任者 | 宍戸　稔聡 |
| 住所 | 〒564-8565 大阪府吹田市岸辺新町6番1号 |
| 電話 | 06-6170-1069 (内線 31025) |
| FAX | 06-6170-1708 |
| e-mail | 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 研究所 研究推進支援部」で検索してください。 |

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 研究所

　　　脂質基準分析室　小山　勲

〒564-8565　大阪府吹田市岸辺新町６-１

Tel： 06-6170-1069　(内線 31025)

FAX: 06-6170-1708

CDC/CRMLNによる総コレステロールの国際標準化プログラム(Phase-1)

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** (**CDC**の認証書、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6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） |
| 5. |  | 　　　個人血清　　　　　プール血清（　　　　　　人分を混合） |
| 6. |  | 　　　個人血清　　　　　プール血清（　　　　　　人分を混合） |

5.　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、**Cholesterol Reference Method Laboratory Network(CRMLN)** の**Information Form(9頁)**や**Cholesterol Results Form(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。