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**

# Phase-2

# 01国循

 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

**国立循環器病研究センターによるLDLコレステロールの標準化プログラム（Phase-2）**

　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　 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）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LDLコレステロール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試料に新鮮血清を使用、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(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)

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のネットワークです(2018年10月現在)。国立循環器病研究センターは1992年７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)

 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、LDLコレステロールの基準分析法であるBeta-Quantification法(BQ法)を、「下位」とはLDLコレステロールの日常分析法(直接法)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Beta-Quantification法を経由してCDCの基準分析法(BQ法)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。HDLコレステロールとLDLコレステロールで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 |
| ③ 標準化プログラム | あり | なし |
| ④　 試料 | 新鮮血清 | 製造血清(新鮮血清もあり) |
| ⑤　 解析ソフト | あり | なし |
| ⑥　 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そのものに当たります。

6. 申込み方法: LDLコレステロールの標準化(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。また従来通り、FAX(06-6170-1708)でのお申込みも可能です。

7. 基準分析法: CRMLNにおけるLDLコレステロールの基準分析法は、Beta-Quantification法(BQ法)です。BQ法とは、第一段階で新鮮血清(3mL)を比重1.006のバックグラウンドで18度C、18時間30分、105,000 x Gで超遠心し、上清に浮上したリポ蛋白(カイロミクロン、VLDL等)をチューブスライサーで切除して、下層部分(BF: Bottom Fraction)を採取し、食塩水を加えて元の3 mLに戻します。第二段階で、BF中のHDLをヘパリン・マンガン法で分離し、第三段階でBFとHDL分離血清を検体として、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・蒸発乾固後、Liebermann-Burchard試薬を加えて発色させ、分光光度計でBFとHDL中のコレステロールを定量する方法(AK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4日を要します。LDLコレステロールの目標値は、Beta-Quantification法(BQ法)で確定されます。但し、Beta-Quantification法の特異性を検討した結果、IDL出現検体や高Lp(a)検体では、その一部がLDLに測り込まれるという報告があります。

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、LDLコレステロールの場合、正確度が%バイアスで±2.0％以内、精密度はCVで1.5％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LDL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: BQ法で使用されるコレステロールの標準物質は、米国のNISTのSRM 911cを使用しています。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): LDLコレステロールの脂質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HPで検索できます。試薬メーカーを対象としたLDLコレステロールの標準化プログラムは、CDCのHP (<http://www.cdc.gov/labstandards/crmlm.htm>l)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6濃度の新鮮血清を準備して下さい。

 (1)　濃度域1⇒119 mg/dL以下の濃度域で、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⇒120～139 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⇒140 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。

　(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80 mg/dLは開くこと。

　　　　　　　　　　　　　　 120　　　　　　　　 140

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

 　 　↑　　　　 ↑　　　 ↑　　 　↑ ↑　　　　　↑ ⑥－①＝80mg/dL以上の差が望ましい

1. ②　　　 ③　　 　④ ⑤　　　　 ⑥

　(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、血清を凍結融解または凍結乾燥することによって、リポ蛋白が物理化学的に構造変性するとされますので、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) LDLコレステロールの場合、新鮮血清とは測定当日に採取されたヒト血清です。

　(注 4)　市販品を代用することは出来ません。市販品を使用したことが判明した場合、確実に失格となりますので、ご注意下さい。

12. 血清採取上の注意: BQ法では超遠心法を使用しますので、強い乳濁血清(例: Ⅱb, Ⅳ, Ⅴ型の高脂血症) でも測定出来ます。

13. 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、1検体につき最低3.5 mL、必要となります。従来は、5.5 mL必要としていましたが、2011年から減量しました。

14. 日常分析室における検体の測定方法：分析は6濃度の血清を採取当日中に (LDLは、血清分離後、出来るだけ速やかに分析を終了することが望ましいとされています) 、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 LDL-Cholesterol(10頁)に記入し、脂質基準分析室まで、電子メール（ファイル添付）またはFAX（06-6170-1708）でご報告下さい。

15. 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 |

16. 測定成績解析ソフト: LDLコレステロール値の解析ソフトは、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、LDL-Cholesterol Analysis Software(October, 2001)です。

17. 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 LDL-Cholesterol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。

18. 6濃度の血清、標準化参加分析室情報(8頁)、Information Form for LDL-Cholesterol(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。検体は凍結せずに保冷剤で冷やし、発送日の翌日の午前10時必着の時間指定便でお送り下さい。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。検体測定が済みましたら、Results Form for LDL-Cholesterol(10頁)を電子メール(CDC\_hyojunka@ncvc.go.jp)或いはFax(06-6170-1708)でご報告下さい。

19. 時間指定便の利用をお願いする理由: 検体が10時までに到着しましたら、基準分析室では直ちに血清を超遠心する作業に入ります。検体が出来るだけ早く到着しますように、時間指定便をお願いしております。

20. LDL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、わが国にはありません。NCEPの目標は、正確度がBQ法による目標値の±4％以内、精密度は変動係数(CV)で4％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

21. 項目20.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。LDLコレステロール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の標準化では、CDCは直接、認証書の発行はしておりません。

22. 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。

23. 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のHPを通じてご覧頂けます。

24. 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。LDLコレステロールの技術料は、42,000円となります。

25. 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。

26. 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。

27. 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 |
| 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 研究所 研究推進支援部」で検索してください。 |

28. 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

国立循環器病研究センターによるLDLコレステロール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、**Information Form for LDL-Cholesterol(9頁)**や**Results Form for LDL-Cholesterol(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。