

〈資料〉

本邦で利用可能な総グリセリド測定試薬 「コレステスト[®]N TG」の性能評価

山本 肇、友野 愛花、齋川 健志、関本 正泰
二本柳 洋志、石幡 哲也、齋藤 市弘、高田 直樹

Performance evaluation of “Cholestest[®] N TG” for measuring serum total glycerides

Hajime Yamamoto, PhD, Manaka Tomono, Takeshi Saikawa, Masahiro Sekimoto
Hiroshi Nihonyanagi, Tetsuya Ishihata, Ichihiro Saitoh and Naoki Takada

Summary The glycerol-blanked triglyceride measurement method is widely used for the clinical measurement of serum glyceride concentrations in Japan, as stated by the Japanese Society of Clinical Chemistry (JSCC). By contrast, isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry has been adopted by the U.S. Centers for Disease Control and Prevention as the reference measurement procedure for total glycerides. In this study, we evaluated the performance characteristics and clinical utility of Cholestest[®] N (Sekisui medical co., ltd. Tokyo, Japan) for measuring serum total glycerides.

The coefficients of variation (C.V.) for within-run and between-day precision analyses were 0.65 ~ 0.92 % and 0.92 ~ 1.03 %, respectively. The Cholestest[®] N TG was preserved linearity up to 2,364 mg/dL. There was no significant interference caused by the addition of the following interfering substances: conjugated bilirubin, hemoglobin and ascorbic acid.

Compared with the JSCC transferable method, it has sufficient basic performances, and the correlation test was good ($y=0.997x + 7.768$, $r = 0.9988$).

These results indicate that the new method, applicable to automated clinical chemistry analyzers, is useful for rapid measurement of total glycerides in human serum, and this assay kit may be beneficial in routine tests because it is useful for the diagnosis of dislipidemia.

Key words: total glycerides, automated analyzer, international standardization

一般財団法人竹田健康財団 竹田総合病院
臨床検査科
〒965-8585 福島県会津若松市山鹿町3-27

Department of Clinical Laboratory, Takeda General
Hospital, The Takeda Healthcare Foundation
3-27 Yamaga-machi, Aizu-Wakamatsu, Fukushima
Prefecture, 965-8585, Japan

受付日：2018年4月5日
採択日：2018年7月17日

I. 緒言

トリグリセリド (triglyceride; TG) 測定値の評価にあたっては、多くのガイドラインが発表されている。世界保健機関¹⁾、米国National Cholesterol Education Program's Adults Treatment Panel III²⁾、国際糖尿病連盟³⁾、そしてわが国ではメタボリックシンドロームの診断基準⁴⁾や動脈硬化性疾患予防ガイドライン⁵⁾が挙げられる。これらにおいて、脂質代謝異常に関するTGの臨床判断値は同一の150 mg/dLが用いられている。このうち動脈硬化性疾患予防ガイドライン2017年版⁵⁾において、我が国での疫学調査結果^{6),7)}で明らかとなった高TG血症と種々の動脈硬化性疾患リスクの増加の関連性およびTG管理の重要性が示されている。

本邦におけるTG測定系は、JSCC勧告法⁸⁾に準拠した標準化対応法としてFG消去法が普及している。1996年以前は、TGの日常検査法として総グリセリド定量 (FG非消去法) が採用されており^{9),10),11)}、疫学調査が行われた時期により測定法が異なる、もしくは両測定系が混在する可能性に留意しなければならない。TGの動脈硬化性疾患のリスク評価に関して両測定系を比較した報告は未だ存在しないことから、測定値の国際互換性の確保および国際標準化 (ハーモナイゼーション) が求められる。

我々は、先行研究として、総グリセリド定量 (FG非消去法) と遊離グリセロール (free glycerol; FG) 消去法における健常人の測定値の差、ヘパリンによる影響について報告した¹²⁾。FGの存在やリパーゼ活性の亢進により、2法の測定値は大きく乖離するため、種々の疾患においてその影響を検証する必要があるが、先行研究における測定は自家調整試薬¹²⁾や研究用試薬を用いたものであった。

近年、本邦の試薬メーカーにおいても総グリセリド測定試薬 (FG非消去法) の開発が進んでいる。今回我々は、本邦にて商品化され汎用自動分析装置に搭載可能な総グリセリド測定用新規試薬「コレステスト[®]N TG」(積水メディカル株式会社)に関する性能評価を行ったので報告する。

II. 方法と材料

1. 検討試料

精度管理試料コレステスト[®]N コントロール (積水メディカル株式会社) (メーカー参考濃度: 低濃度試料90.0 ± 9.0 mg/dL、高濃度試料128.0 ± 12.8 mg/dL) および患者残余検体を用いた。患者検体の使用にあたっては、包括同意を得ており、個人情報とはすべて連結不可能匿名化を行った。本研究は、当院倫理委員会の承認 (研究倫理審査受付番号2017-076K) のもとに実施した。

2. 試薬および測定機器

総グリセリド測定試薬: コレステスト[®]N TG (積水メディカル株式会社)、機器: TBA[™]-c16000 (キャノンメディカルシステムズ株式会社) を使用した。測定条件は、メーカー指定パラメーター (試料: 1.5 μL、第1試薬: 150 μL、第2試薬: 50 μL、測定波長: 主波長604 nm、副波長804 nm、分析法: 2-Point End Assay) を使用した。本測定系は総コレステロール・グリセリド実試料一次標準物質JCCRM211 (検査医学標準物質機構) を基準標準物質として使用している。総グリセリドのSI単位へのトレーサビリティは、トリパルミチン純度標準物質NIST SRMを1次標準物質としており¹³⁾、欧米における総グリセリド測定の日常検査法と同一である。

認証標準物質: 総コレステロール・グリセリド実試料一次標準物質JCCRM211-5 (検査医学標準物質機構) およびコレステロール・中性脂肪常用参照標準物質JCCRM223-40 (検査医学標準物質機構) を使用した。両標準物質ともにトリパルミチン純度標準物質NIST SRMを1次標準物質としており、前者はIDMS、後者はJSCC勧告法にて値付けが行われている^{13),14)}。

検量物質: コレステスト[®]N キャリブレーター (積水メディカル株式会社) を使用した。白箱検討のため、キャリブレーターに表示値の記載はなく、そのため、検量線作成にあたり事前に認証標準物質を測定し、得られた標準曲線を使用して同キャリブレーターにおける総グリセリド濃度の表示値設定を行った。ついで、同キャリブレーターにて試料測定用の検量線を作

成し、以降の検討内容を実施した。

JSCC標準化対応試薬： 相関分析の比較対照法としてJSCC標準化対応試薬コレステスト[®] TG（積水メディカル株式会社）を使用した。

3. 測定原理

JSCC標準化対応法は、第一反応にてFGを消去し、第2反応にてFG以外に由来するグリセロールを発色反応に導き、吸光度変化によりTG濃度を測定している。本法では、第一反応でFGを消去せず、全てのグリセリド由来のグリセロールを発色反応へ導き定量を行う。FG非消去法とFG消去法の2法の差をFG濃度とした。

4. 検討および解析の方法

「コレステスト[®]N TG」（積水メディカル株式会社）の定量測定に関する信頼性を確認するために、妥当性確認（バリデーション）を実施した。本検討は「定量測定法に関するバリデーション指針（日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会）」¹⁵⁾ に準拠し、解析には「Validation-Support/Excel Ver.3.5（日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会）」を使用した。

Ⅲ. 検討内容

1. 併行精度（同時再現性）

2濃度の精度管理試料コレステスト[®]N コントロール（積水メディカル株式会社）（メーカー参考濃度：低濃度試料90.0±9.0 mg/dL、高濃度試料128.0±12.8 mg/dL）を連続20回測定し変動係数CV（%）を算出した。

2. 室内再現精度（日差再現性）

初回測定時のみキャリブレーションを行い、2濃度の精度管理試料コレステスト[®]N コントロール（積水メディカル株式会社）（メーカー参考濃度：低濃度試料90.0±9.0 mg/dL、高濃度試料128.0±12.8 mg/dL）を連続14日間各々2重測定し、変動係数CV（%）を算出した。本精度管理試料溶解後の期限は7日であるため、検討1日目、8日目にバイアルを溶解し実施した。測定時を除き、試料は閉栓し4℃にて冷所保存した。

3. 希釈直線性

直線性評価用試料として測定範囲上限を大きく上回る高濃度試料（積水メディカル株式会社）を使用した。本試料を生理食塩水で10段階希釈し、各濃度5重測定し、希釈直線性を確認した。評価はCLSI：臨床検査標準研究所（Clinical and Laboratory Standards Institute、旧NCCLS）基準EP6-A¹⁶⁾ に準拠した。

4. 選択性の確認（共存物質の影響）

干渉チェック・A プラス（シスメックス株式会社）、L(+)-アスコルビン酸（キシダ化学株式会社）を、TG 200 mg/dL以上の患者残余血清をもとに作製した自家調製プール血清（添加前総グリセリド濃度329 mg/dL）に添加し、非抱合型ビリルビン（Bil F）、抱合型ビリルビン（Bil C）、ヘモグロビン（Hb）、アスコルビン酸の影響を検討した。添加0濃度の測定値と比較して各添加濃度の測定値が±5%以内である場合、総グリセリド濃度に影響がないと評価した。

5. 相関分析

患者残余血清100検体を用いて本法と比較対照法との相関性を確認した。

Ⅳ. 結果

1. 併行精度（同時再現性）

2濃度の精度管理試料を連続20回測定した平均値±SDおよび変動係数は、Mean：90.72±0.59 mg/dL ～ 128.24±1.19 mg/dL、CV（%）：0.65%～0.92%であった（Table 1）。

2. 室内再現精度（日差再現性）

2濃度の精度管理試料を連続14日間各々2重測定した平均値±SDおよび総合変動係数は、Mean：91.33±0.84 mg/dL ～ 129.40±1.33 mg/dL、CV（%）：0.92%～1.03%であった。また、明瞭なトレンド現象やシフト現象を認めなかった。（Table 2）。

3. 希釈直線性

直線性評価用高濃度試料を生理食塩水で10段階希釈し、各濃度5重測定したところ、2,364 mg/dLまでの直線性が確認できた（Fig. 1）。

生 物 試 料 分 析

Table 1 Within-run reproducibility (n= 20) of the measurement of total glycerides

	Control 1 Lot.101RDO	Control 2 Lot.101RDO
Certified Value (mg/dL)	90.0±9.0	128.0±12.8
Range (mg/dL)	81~99	115~141
Measurements	1	91.2
	2	90.8
	3	90.6
	4	90.0
	5	90.2
	6	90.7
	7	90.4
	8	91.0
	9	90.8
	10	91.3
	11	89.8
	12	90.1
	13	91.1
	14	90.6
	15	90.2
	16	91.0
	17	90.2
	18	91.1
	19	90.9
	20	92.4
Average (mg/dL)	90.72	128.24
SD (mg/dL)	0.59	1.19
CV (%)	0.65	0.92

Table 2 Between-day reproducibility (14 days with duplicate assay) of the measurement of total glycerides

	Control 1 Lot.101RDO		Control 2 Lot.101RDO		
Certified Value (mg/dL)	90.0±9.0		128.0±12.8		
Range (mg/dL)	81~99		115~141		
Days	1	90.6	91.4	128.2	129.4
	2	91.2	91.2	129.4	130.1
	3	90.4	91.0	127.1	129.6
	4	91.7	92.0	127.8	129.9
	5	92.6	92.1	129.4	130.5
	6	91.3	92.0	130.4	130.9
	7	90.7	92.6	130.5	131.0
	8	92.5	91.7	128.9	130.8
	9	90.4	92.1	127.5	129.8
	10	89.9	92.4	130.4	127.9
	11	90.7	90.5	128.7	130.4
	12	91.0	91.2	131.1	128.7
	13	92.1	90.4	127.9	129.9
	14	91.4	90.2	129.9	127.2
Average (mg/dL)	91.33		129.40		
CV (%)	0.92		1.03		

4. 選択性の確認 (共存物質の影響)

干渉チェックA プラスとL(+)-アスコルビン酸を用い、共存物質の影響を確認した結果、最大濃度である非抱合型ビリルビン (Bil F) : 19.1 mg/dL、抱合型ビリルビン (Bil C) : 19.8 mg/dL、ヘモグロビン (Hb) : 510 mg/dL、アスコルビン酸 : 50 mg/dLまでの添加による測定値

への影響は認められなかった (Fig. 2)。

5. 相関分析

患者残余血清100検体を本法と比較対照法で測定した。平均値±SDは、それぞれ161.01±116.21 mg/dL、153.74±116.59 mg/dLであった。分布範囲は、それぞれ44.2～758.2 mg/dL、

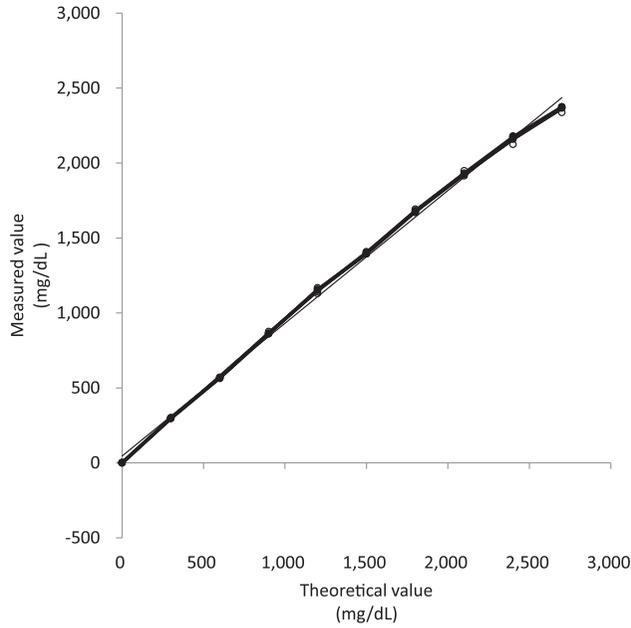


Fig. 1 Dilution linearity

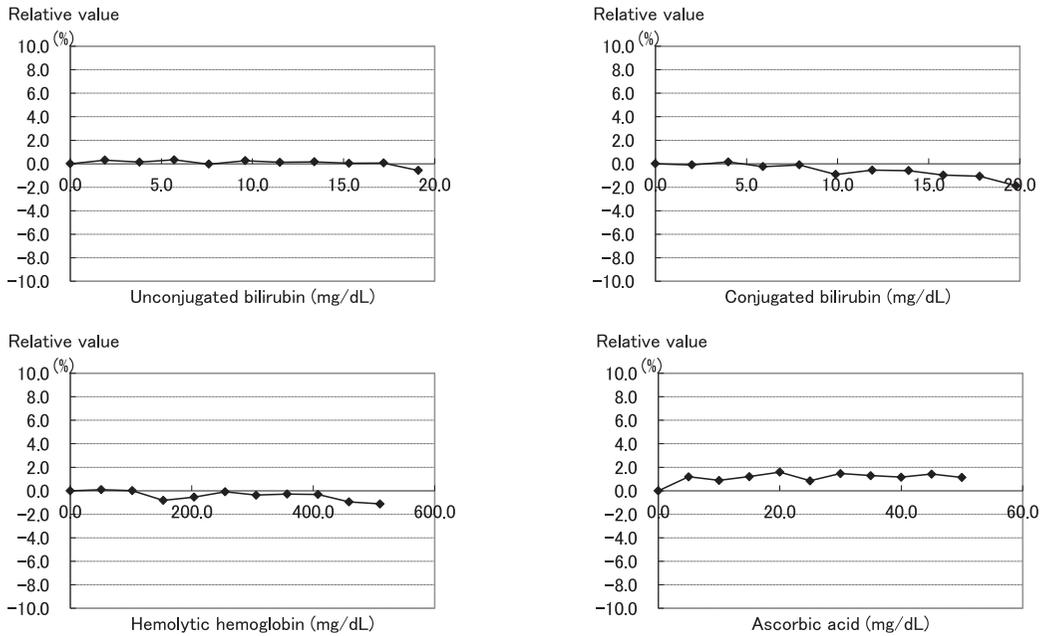


Fig. 2 Effects of interference substances on total triglycerides

36.2 ~ 748.2 mg/dLであった。2法の相関性を標準主軸回帰にて確認した結果、回帰式は $y=0.997x+7.768$ 、相関係数 $r=0.9988$ 、 $S_{yx}=5.66$

mg/dLであった。2法は 7.27 ± 5.66 mg/dL、 7.49 ± 6.71 %の差を認めた。また、極端な乖離検体も認められなかった (Fig. 3)。

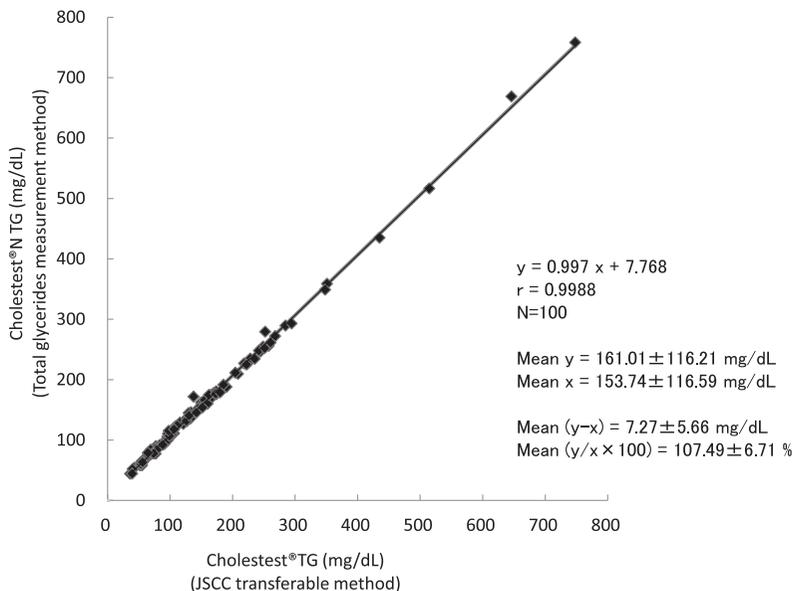


Fig. 3 Correlation between glyceride values measured by both the methods in serum samples obtained from patients

V. 考察

本邦におけるTG測定系は、JSCC勧告法⁸⁾に準拠した標準化対応法としてFG消去法が普及している。一方で、アメリカ疾病管理予防センター（Centers for Disease Control and Prevention; CDC）は、実用基準分析法として、古くからCarlson変法¹⁷⁾を採用していたが、近年、同位体希釈ガスクロマトグラフィー質量分析法（Isotope Dilution Gas Chromatography Mass Spectrometry; IDGC/MS）による総グリセリド測定を基準測定操作法に採用した¹⁸⁾。

以上の背景から、日常検査として、本邦ではFG消去法、本邦を除いた諸外国では総グリセリド測定（FG非消去法）が採用されており、測定値の国際互換性の確保および国際標準化（ハーモナイゼーション）の整備が課題となっている。JSCC法（FG消去法）では、内因性のFGを消去後、アシルグリセロールの加水分解により生じたグリセロールの総量を酵素法で定量測定し、トリオレイン換算を行うことにより、TG濃度を得ている。すなわち、FGを除くアシルグリセロールである、モノアシルグリセロール（monoacyl glycerol; MAG）、ジアシルグリセロール（diacyl glycerol; DAG）、トリアシルグ

リセロール（triacyl glycerol; TAG）を測定している。JSCC法（FG消去法）とCDC法（総グリセリド測定、FG非消去法）との測定値の差は、内因性のFGを測定にしているか否かに起因することになる。内因性FG濃度へ影響する要因として食事、肥満¹⁹⁾などが知られている。

上記を背景とする測定値の互換性の必要性から、国内試薬メーカーにおいても総グリセリド測定試薬の開発が進んでいる。今回我々は、本邦にて商品化され汎用自動分析装置に搭載可能な新規試薬「コレステスト®N TG」に関する性能評価を行った。

性能評価の結果は概ね良好であった。併行精度は1%未満、室内再現精度は2%未満であり、現在の技術水準から算出した許容誤差限界や臨床医の望む許容誤差限界²⁰⁾を十分に下回るものであった。室内再現精度は試薬搭載時の初回キャリブレーション後、連続14日間ブランク補正のみにて検討を行ったが、精度管理状況に明瞭なトレンド現象やシフト現象を認めず、日内精密度と日間精密度の有意な差を認めなかった。ことから、少なくとも試薬開封・搭載後14日間の安定性についても確認できた。希釈直線性の検討においては、2,364 mg/dLまでの直線性が確認できた。能書上の製品の測定範囲3～

2,000 mg/dLであることから、日常検査において十分な測定範囲を有するものと考えられる。選択性の確認においては遊離型、抱合型ビリルビン、溶血ヘモグロビン、アスコルビン酸の測定値への影響は認められなかった。また、本邦におけるTG測定の標準法であるJSCC標準化対応試薬との相関分析においては回帰式 $y=0.997x+7.768$ 、相関係数 $r=0.9988$ と良好な相関が得られた。また、2法の差より得られたFG濃度は 7.27 ± 5.66 mg/dLと、過去の先行研究^{12), 21)}とほぼ同様の結果が得られた。

国際標準化を議論するうえで、2法の測定原理の違いに関する様々な知見を集積する必要がある。従来、FGの定量には、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) 法²¹⁾、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 法²²⁾、液体高速クロマトグラフィー (HPLC) 法と吸光光度法を組み合わせた方法²³⁾ によるTGの分画測定もしくは、酵素法では自家製試薬¹²⁾ もしくは製品化前の研究用試薬による総グリセリド測定 (FG非消去法) とFG消去法を比較する方法に制限され、研究展開に大きな制約があった。特に、測定原理の違いの面から動脈硬化性疾患のリスク評価を比較した研究報告が待たれるところである。

今回、商品化された自動分析装置に搭載可能な総グリセリド測定試薬「コレステスト[®]N TG」は本邦における総グリセリド測定試薬として十分な基礎性能を有していることが明らかとなった。

VI. 結語

本邦にて商品化された総グリセリド測定試薬「コレステスト[®]N TG」の性能評価を行ったところ、良好な結果を得た。同試薬は汎用自動分析装置に搭載可能であり、本邦でも容易に総グリセリド測定が可能になった。

本論文は、第28回生物試料分析科学会年次学術集会 (平成 30 年 3 月 山形市) での報告と同意の内容である。

COI 報告書に記載したとおり、本論文内容に関連する著者 (ら) の利益相反: なし

文献

- 1) World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications, Geneva, 1999.
- 2) National Cholesterol Education Program: "Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III)," JAMA, 2001; 285: 2486-2497.
- 3) International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, Brussels, 2005.
- 4) メタボリックシンドローム診断基準検討委員会: 「日本動脈硬化学会, 日本肥満学会, 日本糖尿病学会, 日本高血圧学会, 日本循環器学会, 日本内科学会, 日本腎臓病学会, 日本血栓止血学会による, 日本における診断基準作成の検討委員会の報告」, 日本内科学会雑誌, 2005; 94: 749.
- 5) 日本動脈硬化学会: 「動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2017年版」, ナノオ企画, 東京, 2017.
- 6) Noda H, Iso H, Saito I, Konishi M, Inoue M, Tsugane S; JPHC Study Group. The impact of the metabolic syndrome and its components on the incidence of ischemic heart disease and stroke: the Japan public health center-based study. Hypertension Res 2009; 32: 289-98.
- 7) Okamura T, Kokubo Y, Watanabe M, Higashiyama A, Ono Y, Nishimura K, Okayama A, Miyamoto Y. A revised definition of the metabolic syndrome predicts coronary artery disease and ischemic stroke after adjusting for low density lipoprotein cholesterol in a 13-year cohort study of Japanese: the Suita study. Atherosclerosis 2011; 217: 201-6.
- 8) 日本臨床化学会試薬専門委員会: 「血清中の中性脂肪濃度測定 の 勧告法」, 臨床化学, 1996; 25: 39-51.
- 9) 園田信五. 酵素を用いた血清中性脂肪測定法の問題点—その1—. 衛生検査, 1981; 30: 571.
- 10) 仁科甫啓. 中性脂肪. 臨床検査, 1978; 22: 1304-1313.
- 11) 園田信五, 加藤淳子, 春日信司, 土屋富貴子, 木全恵理子, 影山信雄. グリセロールを含む脳圧降下薬が酵素を用いた血清中性脂肪測定に及ぼす影響. 臨床検査, 1983; 27: 809-811.
- 12) 山本 肇, 佐竹奏一, 二本柳洋志, 石幡哲也, 折笠ひろみ, 小熊悠子, 高田直樹, 齋藤市弘. 遊離グリセロール未消去による総グリセリド測定 の 検討—中性脂肪測定国際標準化を見据えた基礎検討—. 医学検査. 2016; 65: 209-215.

- 13) 総コレステロール・グリセリド実試料一次標準物質JCCRM211-5認証書 - 一般社団法人 検査医学標準物質機構
- 14) 脂質測定用常用参照標準物質 JCCRM223-40認証書 - 一般社団法人 検査医学標準物質機構
- 15) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会：「定量測定法に関するバリデーション指針」, 臨床化学, 2011; 40: 149-157.
- 16) NCCLS EP6-A: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline, 2003.
- 17) Carlson LA: "Determination of serum triglycerides," J Athero Res, 1963; 3: 334-336.
- 18) Edwards SH et al.: "Reference measurement procedure for total glycerides by isotope dilution GC-MS," Clin Chem, 2012; 58: 768-776.
- 19) Nakagawa T, Hirayama S, Watanabe T, et al. Triglyceride concentrations should be measured after elimination of free glycerol to exclude interindividual variations due to adiposity and fasting status. Clin Chem Lab Med. 2017 Aug 28;55(9):e191-e194. doi: 10.1515/cclm-2016-0710.
- 20) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会：生理的変動に基づいた臨床化学検査36項目における測定の許容誤差限界, 臨床化学 2006; 35 : 144-153.
- 21) Sunao Morita, Makoto Yamaura, Tomo Satoh, Atsushi Hori, Takeshi Uehara, Toshiyuki Watanabe, Takashi Miida and Hiroya Hidaka: Measurement of free glycerol concentration in human serum using gas chromatography mass spectrometry[Jpn]. J Anal Bio-Sci, 40: 279-284, 2017.
- 22) Dong Y, Ma Y, Yan K, Shen L, Wang X, Xu Y, He G, Wu Y, Lu J, Yang Z and Feng F: Quantitative analysis of glycerol levels in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 957: 30-35, 2014.
- 23) Li H, Dong J, Chen W, Wang S, Guo H, Man Y, Mo P and Li J: Measurement of serum total glycerides and free glycerol by high-performance liquid chromatography. J Lipid Res, 47: 2089-2096, 2006.