

臨床化学分析用標準物質の現状と課題

川口 研*

(平成21年1月23日受理)

A survey on certified reference materials for clinical chemistry

Migaku KAWAGUCHI

1. はじめに

医師が病気の診断を行う際、問診によって得られる患者の訴え、患者が置かれている状況（例えば、性、年齢、遺伝性、流行季節など）の分析、医師の診察によって得られる症状の把握、臨床検査による検査成績の分析などが行われ、これらの結果が総合的に判断される。この中で臨床検査成績は、最も客観的な情報を与えるため、現在の医療現場において、必要不可欠である¹⁾。特に、体液（血液・尿など）、便、組織などの生体中の化学物質を物理・化学・生化学・免疫化学的方法を駆使して定量分析する臨床化学分析²⁾においては、得られた測定値の信頼性を確保することが重要である。日本臨床検査医学会（旧名称：日本臨床病理学会）では、1988年から臨床検査の使い方ガイドラインの作成に取り組んでおり、その第一次案である「基本的検査のガイドライン」が1989年に完成した³⁾。本ガイドラインでは、どのような施設でも行える基本的検査(1)と通常の診療所や病院で行う基本的検査(2)が設定されている。

基本的検査(1)の検査群は、いつでもどこでも必要な5項目の検査が設定されている（表1）。ガイドラインによると5項目の検査から患者の一般状態（例えば、総蛋白量、

表1 基本的検査(1)：いつでもどこでも必要な検査

1. 尿検査
蛋白、糖、ウロビリノゲン、潜血
2. 血液検査
白血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球数
3. 糞便検査
潜血
4. 赤沈とCRP
5. 血液化学検査
血清総蛋白濃度、A/G比

* 計測標準研究部門 有機分析科 バイオメディカル標準研究室

表2 基本的検査(2)：

入院時あるいは外来初診時でも必要のあるとき行う検査

1. 尿検査
色調、混濁、pH、比重、蛋白、糖(食後2~3時間尿)、ウロビリノゲン、潜血、亜硝酸塩、試験紙による白血球反応(エステラーゼ)、沈渣
2. 血液検査
1) CRPとシアル酸(または赤沈)
2) 白血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球数、赤血球恒数(指数)、血小板数、末梢血液像
3) 血清総蛋白濃度、血清総蛋白分画、総コレステロール、トリグリセリド、AST、ALT、LD(LDH)、ALP、 γ -GT、尿素窒素、クレアチニン、尿酸
3. 糞便検査
潜血、虫卵
4. 血清検査
HBs抗原、抗体検査、梅毒血清反応
5. 胸部・腹部単純X線撮影
6. 心電図

アルブミン/グロブリン比 (A/G比) およびヘモグロビンのすべてが基準範囲なら一般状態は良好であるなど) や疾病（感染症、貧血、腎障害、肝・胆道障害、糖尿病、胃腸障害など）のスクリーニングが行える⁴⁾。

基本的検査(2)は、入院時あるいは外来初診時でも必要な検査として立案されたものである（表2）。ここでは基本的検査(1)に比べ、さらに検体検査が加えられ、胸部・腹部単純X線写真、心電図なども加えられている⁴⁾。これらの検査群より、基本的検査(1)よりも詳細な一般状態、疾患の有無を評価することが可能であり、広く用いられている。

これらの基本的検査(1)及び(2)の項目内で、定量的な化学分析が求められる項目は、糖、ヘモグロビン、C反応性蛋白 (CRP)、血清総蛋白濃度、A/G比、シアル酸、総コレステロール、トリグリセリド、尿素窒素、クレアチニン、尿酸などである。また、酵素活性の測定が必要な項目は、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、乳酸脱水素酵素 (LD)、アルカリホスファターゼ (ALP)、 γ -グルタルトランスペプチダーゼ (γ -GT) などである。

この様に、臨床化学分析では、尿酸、クレアチニンなどの低分子化合物から、CRPなどの生体高分子まで、測定対象物質の幅が広いことが特徴である。

近年の臨床検査の普及、分析機器・試薬のグローバル化などにより、地域・国内はもとより国際的に比較可能な形で測定値を取得することが求められている。臨床化学分析の標準化は、測定機関間での相互比較が可能となることによる患者自身の負担減少だけではなく、検査値と個々の症例などを組み合わせたデータベース構築や診断基準の精度向上などの効果が期待されており、標準化についての取り組みも更に活発化している⁵⁾。また、2006年から欧州連合(European Union, EU)において体外診断薬に関する指令(In Vitro Diagnostic Medical Devices Directive, IVD 指令)が発効されるに至り、臨床検査における測定方法の妥当性と測定結果の信頼性の担保が早急に求められている⁶⁾。

検査値の信頼性を確保するためには、臨床化学分析における計量学的トレーサビリティ体系の確立が重要である。臨床化学分析におけるトレーサビリティ体系を図1に示す。

臨床化学分析による測定値の信頼性を確保するためには、SIを頂点としたトレーサビリティ体系の構築が最も理想的であるが、日常的に用いられている常用標準や測定法を直接的にSIトレーサブルにすることは、困難である。従って、SIトレーサビリティを実現するためには、これら常用標準、日常検査法、検査機器を校正するための上位の純物質系標準物質及び組成標準物質が必要不可欠である。

この中で、国家計量標準研究機関(National Metrology Institute, NMI)である計量標準総合センター(National

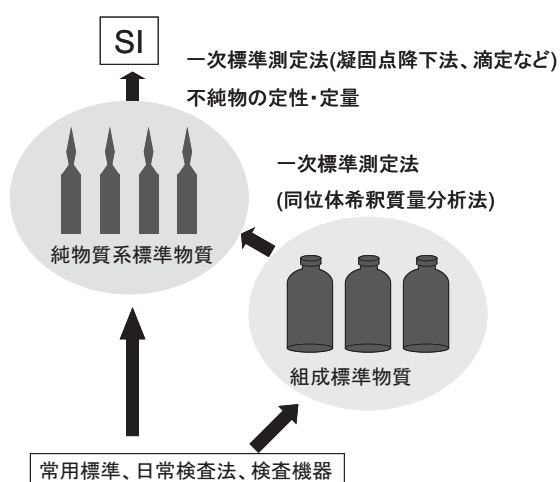


図1 臨床化学分析における計量学的トレーサビリティ体系

Metrology Institute of Japan, NMIJ) による寄与が期待されているのは、上位の認証標準物質(Certified Reference Material, CRM)の開発・維持・供給ならびに一次標準測定法(Primary Method)の開発であると考えられる。

本調査研究では、臨床化学分析分野で検査対象とされている物質や項目のうち、蛋白や酵素などの高分子成分を除きたいわゆる低分子化合物について、標準物質を中心とした計量学的トレーサビリティ体系の構築に関する国際的な取り組み及び現状、また、海外の国家計量標準研究機関における臨床化学分析用標準物質の開発の歩み及び現状を調査し、今後の標準開発に向けての課題などについて考察を行った。

2. 認証標準物質の開発方針

2.1 一次標準測定法

トレーサビリティ上位の標準物質を開発するためには、高精度で、他の同種の標準を参照しない測定法が不可欠である。国際度量衡委員会/物質質量諮問委員会(Comité International des Poids et Mesures/Comité Consultatif pour la Quantite de Matière, CIPM/CCQM)は信頼性の高い国際的に整合性のある化学計測を実現するために、一次標準測定法(Primary Method)の定義を次のように与えた。

「一次標準測定法は、計量学的に最高の質を有し、その操作が完全に記述され、理解され、かつ不確かさがSIを用いて完全に記述される方法で、その量について、他の同種の標準を参照せずに測定結果を標準として使用できる方法」

具体的には、次にあげる手法が、用いられている。

- (1) 同位体希釈質量分析法
- (2) 電量滴定法
- (3) 重量法
- (4) 滴定法
- (5) 凝固点降下法

一次標準測定法は、SIトレーサブルな標準物質を目指すうえで、第一選択肢となり、認証標準物質の特性値の値付けには、これら一次標準測定法を適用することが望ましい。

2.2 純物質系標準物質

純物質系標準物質は、測定機器の校正、検量線用の標準試料、添加回収試験による分析法の妥当性確認などに用いられる。純物質系標準物質の値付けには、凝固点降下法や滴定法などの一次標準測定法を用いることが第一選択肢である。例えば、NMIJでは、コレステロール認証

標準物質 (NMIJ CRM 6001-a) において、示差走査熱量計 (Differential Scanning Calorimeter, DSC) により、凝固点降下法に基づき純度を決定した。しかし、臨床化学分析に必要な分析対象物質の中には、熱に不安定な化合物や特徴的な官能基がなく滴定には不向きな化合物も多く、一次標準測定法だけでは、純度を決定することができない場合も考えられる。このような場合には、不純物を同定・定量し、その不純物量を差し引くことで純度を決定する差数法を用いる。また、例え一次標準測定法を用いることが可能であっても、不純物の影響を無視することができない場合が多く、いずれの手法においても、複数の方法で純度を評価することが望まれる。

2.3 組成標準物質

組成標準物質は、一般的には、分析法の妥当性確認のために用いられることが多いが、臨床化学分析分野においては、常用標準、日常測定法、検査機器の校正に用いられるのが特徴的である。臨床化学分析用の組成標準物質の認証値の値付けには、主に同位体希釈質量分析法 (Isotope Dilution Mass Spectrometry, IDMS) が用いられる。IDMSは、マトリックス中の低分子化合物の値付けに用いることができる唯一の一次標準測定法として確立された方法である。有機化合物の測定におけるIDMSでは、一般に測定対象物質を重水素あるいは¹³Cなどの安定同位体で標識した化合物 (標識化合物) の一定量を測定試料に添加し、測定対象物質と標識化合物の同位体平衡を達成させる。その後、除タンパク処理や固相抽出などの試料前処理操作を行う。検液から目的成分をガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography, GC) または高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) などの手法で分離した後、質量分析装置で測定することにより、測定対象物質と標識化合物の比率を求め、試料中の分析対象物質の濃度を求める。臨床化学分析分野に必要な組成標準物質としては、血清、尿、細胞、組織などが考えられるが、現在開発されている組成標準物質の大部分は、ヒト血清標準物質である。

3. 臨床化学分析分野における標準物質の国際動向

3.1 メートル条約に基づく国際相互承認

1875年5月20日、フランスのパリで、単位の確立と国際的な普及を目的として、メートル条約が締結された。我が国は1885年に条約に加入し、国内単位の統一をはかり、土地や建物の表記を除き1959年からメートル法が実施され、1966年4月1日から全面的に実施された。

メートル条約に基づく計量標準分野の国際的な動向として、国際相互承認協定 (Global Mutual Recognition Arrangement, グローバルMRA) により、各国の国家計量標準の比較同等性を確認しあい、各計量標準機関が発行する校正証明書を相互に受け入れることを目指した活動が展開されている。比較同等性が認められるためには、主要な量の国際比較を実施して参加機関の技術能力と測定結果の同等性を確認すること、及び、その機関において品質システムが整備されていることが求められる。さらに、これらの結果に基づき、国際度量衡局 (Bureau International des Poids et Mesures, BIPM) の基幹比較データベース (Key Comparison Database, KCDB)⁷⁾ の Appendix C に校正測定能力 (Calibration and Measurement Capabilities, CMC) を登録し、公開することにより国際的な活用をはかることが進められている。また、グローバルMRAによれば、国を代表する国家計量標準研究機関を Principal NMI と呼び、我が国では、NMIJ がその任にある。また、国を代表する国家計量標準研究機関が、自ら供給できない部分の計量標準を供給する機関を Designated NMI として指名し、国際的に当該分野における国家計量標準供給機関としての役割を担ってもらうことになっている⁸⁾。

化学分野に関しては、1993年に国際度量衡委員会/物質量諮問委員会 (CIPM/CCQM) が創設された。CCQMの主な役割は、次の通りである。

- (1) 定量的化学測定の精確さとSIへのトレーサビリティに関わる問題についてCIPMに助言すること
- (2) 最高水準でのトレーサビリティを確立するための各国の国家計量標準研究機関の活動を調整すること
- (3) 不確かさの概念および測定値に不確かさを付与することについての理解を奨励し、地域または国際水準での他機関の主導権を考慮しつつトレーサビリティの確立を促進すること

現在、CCQMの活動の一環として、臨床化学分析分野における比較同等性を担保するために、標準物質の純度評価や各種マトリックス中微量物質の測定などの、数多くの国際比較が行われている。現在までにCCQMで行われた臨床化学分析分野の国際基幹比較 (Key comparison) を表3に示す。

臨床化学分析分野においては、2000年のCCQM-K6「ヒト血清中コレステロールの定量」からはじまり、グルコース、クレアチニン、コルチゾール、プロゲステロンを測定対象物質として、国際基幹比較が行われてきた。これらの国際比較の結果は、国際相互承認の技術的な裏付けであり、KCDBのAppendix Bに登録され、公開されて

表3 臨床化学分析分野の国際基幹比較

No.	Year	Analyte	Matrix	Publication	Participating Institute
CCQM-K6	2000	Cholesterol	Human serum	Open	NIST, LGC, NARL, NMIJ, NRCCRM, NMi, PTB
CCQM-K11	2001	Glucose	Human serum	Open	NIST, KRIS, PTB
CCQM-K11.1	2005	Glucose	Human serum	Not yet	—
CCQM-K12	2001	Creatinine	Human serum	Open	NIST, KRIS, PTB, LGC, IRMM
CCQM-K12.1	2005	Creatinine	Human serum	Not yet	—
CCQM-K63a	2007	Cortisol	Human serum	Not yet	—
CCQM-K63b	2007	Progesterone	Human serum	Not yet	—

いる。国際基幹比較により、各国のPrincipal NMI（又はPrincipal NMIによって指名されたDesignated NMI）が自身の能力（標準物質の値付け能力）およびその結果の同等性を示し、そのCMCによって値付けされた標準物質の内容（認証値）をAppendix Cに登録することで、グローバルMRAに基づき、当該標準物質の国際同等性が示される。

3.2 標準分野と臨床検査分野の融合

2002年6月にBIPMと国際臨床化学連合（International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC）の呼びかけにより、標準分野を代表してBIPMや各国の国家計量標準研究機関、臨床検査分野からはIFCCおよび各国の政府系機関、臨床検査関連機関、世界保健機構（World Health Organization, WHO）、臨床検査試薬および機器製造メーカー、さらに国際試験所認定機構（International Laboratory Accreditation Cooperation, ILAC）等の合同委員会「検査医学におけるトレーサビリティに関する合同委員会（Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine, JCTLM）」⁹⁾が設置された。日本からは、NMIJ、日本臨床検査標準協議会（Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards, JCCLS）、日本臨床検査薬協会（Japanese Association of Clinical Reagents Industries, JACRI）が正式メンバーとして参加している。JCTLMは、直接的にはEUのIVD指令に対応して、臨床検査分野における国際整合性のとれた上位標準物質や基準測定法のリスト化及びリファレンスラボの国際的なネットワークシステムの構築を行っている。IVD指令は、EUで販売されるすべての臨床検査薬および臨床検査機器に、それらのトレーサビリティを宣言することを求めている。すなわち、臨床検査試薬および臨床検査機器等メーカーは、自らの測定結果あるいは製品のトレーサビリティを自らで証明するか、あるいは上位標準（標準物質あるいは標準測定法）に対して、トレーサブルであることを示す必要がある。一方、JCTLMの中長期的な目標には、臨床検査における最も完成されたトレーサビリティ体系の実現、国家計量標準研究機関と臨床検査研究所との関係強化、

臨床検査分野におけるトレーサビリティ概念の啓発、臨床検査における認証標準物質・計測方法等の開発、測定システムや測定試薬を開発する臨床検査関連企業の育成などがあげられている。

JCTLMには、2つのワーキンググループ（WG）が設置されており、WG1では「トレーサビリティの確保された標準物質」および「国際的に合意（認証）された基準測定法」の選定について、WG2では臨床検査の精度管理のための国際的な比較ネットワークシステムの構築について活発な論議を行っている。WG1では、電解質、代謝物、ホルモン、凝固因子、タンパク質、ドラッグ、酵素、核酸、血液型、血中ガス、生体中金属元素、ビタミン、感染症の分野においてトレーサビリティ体系を構築することを目指し、上位の標準物質と基準測定法を選定し、それらのリストをBIPM/JCTLMのWebサイトに掲載する作業を行っている。

JCTLMに登録されている標準物質には、List IとList IIがある。List IはSIトレーサブルあるいは国際的承認の得られた測定法により値付けされている標準物質であり、List IIは非SIトレーサブルな標準物質となっている。また、選定された標準物質は、常用標準、日常検査法、検査機器の校正や測定の妥当性確認などの目的のために、上位標準として利用可能であるとみなされている。

3.3 国際的に認められている臨床化学分析用標準物質

2008年時点での、KCDBのAppendix C及びJCTLM List Iに登録されている純物質系及び組成標準物質をそれぞれ表4及び表5にまとめた。

純物質系標準物質において、米国のNIST（National Institute of Standard and Technologies）が最も多い9種、次いで、中国のNIM（National Institute of Metrology）が3種、EUのIRMM（Institute of Reference Materials and Measurements）が2種、日本のNMIJが1種、メキシコのCENAM（Centro Nacional de Metrologia）が1種、オーストラリアのNMIA（National Measurement Institute, Australia）が1種を登録している。これらの機関は、すべてNMIである。また、項目によっては、複数の計量標準

表4 Appendix C及びJCTLM List Iに登録されている純物質系標準物質

Analyte	Name of the reference material	Certified value	Uncertainties	Producer	Appendix C	JCTLM List I
Billirubin	SRM 916a	98.3 %	0.3 %	NIST	○	○
Cholesterol	SRM 911c	99.2 %	0.4 %	NIST	○	○
Cholesterol	NMIJ CRM 6001-a	99.9 %	0.1 %	NMIJ	○	○
Cholesterol	GBW 09203b	99.7 %	0.1 %	NIM	○	○
Cortisol	SRM 921	98.9 %	0.2 %	NIST		○
Creatinine	SRM 914a	99.7 %	0.3 %	NIST	○	○
D-Glucose	SRM 917b	99.7 %	0.2 %	NIST	○	○
Glucose	DMR 190b	99.01 %	0.14 %	CENAM	○	○
Testosterone	NARL CRM M914	98.4 %	0.4 %	NMIA	○	○
Thyroxine (T4)	IRMM-468	98.6 %	0.7 %	IRMM		○
3,3',5-triiodothyronine (T3)	IRMM-469	97.1 %	0.7 %	IRMM		○
Tripalmitin	SRM 1595	99.5 %	0.2 %	NIST	○	○
Urea	SRM 912a	99.9 %	0.1 %	NIST	○	○
Urea	GBW 09201	99.9 %	0.2 %	NIM		○
Uric acid	SRM 913a	99.6 %	0.1 %	NIST	○	○
Uric acid	GBW 09202	99.8 %	0.3 %	NIM		○
VMA	SRM 925	99.4 %	0.4 %	NIST		○

*VMA: 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid

表5 Appendix C及びJCTLM List Iに登録されている組成標準物質

Analyte	Matrix/Material	Name of the reference material	Producer	Appendix C	JCTLM List I
Cholesterol	Human serum	SRM 909b	NIST	○	○
Cholesterol	Human serum	SRM 968c	NIST	○	○
Cholesterol	Human serum	SRM 1589a	NIST	○	
Cholesterol	Human serum	SRM 1951b	NIST	○	○
Cholesterol	Human serum	SRM 1952a	NIST	○	○
Cholesterol	Human serum	JCCRM 211	ReCCS	○	○
Cortisol	Human serum	BCR-192	IRMM		○
Cortisol	Human serum	BCR-193	IRMM		○
Cortisol	Human serum	IRMM-451	IRMM		○
Creatinine	Human serum	SRM 909b	NIST	○	○
Creatinine	Human serum	SRM 967	NIST		○
Creatinine	Human serum	BCR-573	IRMM		○
Creatinine	Human serum	BCR-574	IRMM		○
Creatinine	Human serum	BCR-575	IRMM		○
Creatinine	Human serum	ERM-DA 250a	LGC		○
Creatinine	Human serum	ERM-DA 251a	LGC		○
Creatinine	Human serum	ERM-DA 252a	LGC		○
Creatinine	Human serum	ERM-DA 253a	LGC		○
Creatinine	Human serum	DMR 263a	CENAM	○	○
Creatinine	Human serum	KRISS CRM 110-02-01	KRISS	○	
17β-Estradiol	Human serum	BCR-576	IRMM		○
17β-Estradiol	Human serum	BCR-577	IRMM		○
17β-Estradiol	Human serum	BCR-578	IRMM		○
Glucose	Human serum	SRM 965a	NIST	○	○
Glucose	Human serum	DMR 263a	CENAM	○	○
Glucose	Human serum	JCCRM 521	ReCCS		○
Progesterone	Human serum	BCR-347	IRMM		○
Progesterone	Human serum	BCR-348R	IRMM		○
Total glycerides	Human serum	SRM 909b	NIST	○	○
Total glycerides	Human serum	SRM 1951b	NIST	○	
Triglycerides	Human serum	SRM 909b	NIST	○	○
Triglycerides	Human serum	SRM 1951b	NIST	○	
Triglycerides	Human serum	JCCRM 223	ReCCS		○
Urea	Human serum	SRM 909b	NIST	○	○
Uric acid	Human serum	SRM 909b	NIST	○	○
Uric acid	Human serum	JCCLS021	ReCCS		○

研究機関から頒布されている標準物質がある。例えば、コレステロールの標準物質は、3機関が登録しているが、NMIJのCRM 6001-aが最も高純度で、不確かさも小さい。また、ステロイドホルモンであるコルチゾール (SRM 921) 及びテストステロン (NARL CRM M914) の純度値が98.9 %及び98.4 %と低く、ステロイドホルモン類は、類似化合物が非常に多く、高純度な標準物質の開発が難しいと推察された。また、甲状腺ホルモンであるT4 (IRMM-468) 及びT3 (IRMM-469) も、純度値が98.6及び97.1 %であり、純度値が低く、精製が困難であったと考えられる。さらに、不確かさは共に0.7 %であり、他の純物質系標準物質と比較して、大きな値を示している。一般的に、不純物量が多く純度が低いほど、純度評価が困難になり、不確かさは大きくなる傾向が見られる。T4及びT3の値付けは、IRMM、ドイツのPTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt)、NIST、イギリスのLGC (Laboratory of the Government Chemist)、ドイツのBAM (Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung) の5機関で、高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) を用いたピーク面積百分率により、不純物を見積もり、さらに、カール・フィッシャー法による水分量、核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) によるエタノールの質量分率などを定量し、差数法により純度を評価して求めている¹⁰⁾。

また、JCTLM List Iに登録されている標準物質の内、Appendix Cに登録されていないものがいくつか存在する。JCTLM List Iへの登録は、10以上のカテゴリーに分けられたレビューチームにより審査が行われ、順次登録していくのに対し、Appendix Cに登録するためには、国際基幹比較などに参加し、技術的な裏づけに基づく、国際的な同等性を示す必要がある。従って、Appendix Cには、様々な機関による合意の下に値を決定した標準物質を登録することはできず、各機関が当該標準物質の認証値のトレーサビリティを自ら証明し、比較同等性が認められなければならない。また、Appendix Cへの登録は、NMIのみが行うことができるのに対し、JCTLMのリストには、NMI以外の機関でも、登録することが可能である。

組成標準物質としては、ヒト血清標準物質がノミネートされている。また、測定対象物質としては、コレステロール、クレアチニン、17 β -エストラジオール、グルコース、プロゲステロン、中性脂肪 (トリグリセリド)、尿素、尿酸などがある。一部の標準物質では、多数の臨床項目が認証されているものもある。例えば、NISTのSRM 909bは、コレステロール、クレアチニン、トータルグリセリド、トリグリセリド、尿素、尿酸の認証値が付与さ

れている。また、同一の機関から同一の標準物質が頒布されている場合もあるが、これは、LowやHighといった認証値の濃度レベルが異なるものが多い。例えば、IRMMのBCR (ERM-DA) 192及び193のヒト血清中コルチゾールの認証値は、それぞれ98.8 \pm 2及び277 \pm 5 μ g/Lである。また、LGC及びIRMMの血清中のクレアチニンは、標準物質としてはAppendix Cに登録されていないが、校正測定能力 (CMC) のみが登録されている。

JCTLM List Iに登録されている組成標準物質の大部分は、NMIにより、IDMS法によって、値付けされたものである。NMI以外の標準物質としては、検査医学標準物質機構 (Reference Material Institute for Clinical Chemistry Standards, ReCCS) のJCCRM 521が登録されており、その認証値は、日本臨床化学会 (Japan Society of Clinical Chemistry, JSCC) 勧告法¹¹⁾によって、値付けられている。グルコースのJSCC勧告法は、米国臨床化学会 (American Association of Clinical Laboratory Standards, AACC) の基準法であるヘキサナーゼ (HK) -グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PDH)¹²⁾ を改良したものが提案されている。測定手順としては、水酸化バリウム溶液と硫酸亜鉛溶液を用いたソモジー法¹³⁾ による除蛋白操作を行った後、それぞれの酵素を含む測定試薬により反応させ、試薬盲検を対象に生成物であるNADPHの340 nmにおける吸光度を測定する。勧告法では検量線を必要としないように、厳密に試薬の反応時間や温度などが設定されているが、実際には測定上限を400 mg/dLとして設定した5種類の濃度を持つ標準試料により検量線を作成して定量値を求めることが推奨されている。このようにして厳密に手順を遵守して測定した結果、同時測定における再現性はCV値で2 %以下であり、施設間で生じる誤差も \pm 2.0 mg/dL程度にとどまったと報告されている。IDMSでの測定値との相関についても検討され、それぞれの値が十分に一致することが示されているが、除蛋白操作を省くと5~8 mg/dL程度低い値が得られることも報告されている⁵⁾。

4. 海外の国家計量標準研究機関における臨床化学分析用認証標準物質の開発の歩み及び現状

4.1 NISTにおける取り組み

米国は、技術革新や産業競争力を強化するために、経済保障を強化して生活の質を高めるように計測学、規格、産業技術を促進することを目的として、1901年に国立標準局 (National Bureau of Standards, NBS) が創設された。1988年に現在の名称である国立標準技術研究所 (National

表6 NISTから配布されている臨床化学分析用標準物質（純物質系標準物質）

Name of the reference material	Analyte	Certified value	Uncertainties	First Certificate Issue Date	Recently Certificate Issue Date
SRM 911c	Cholesterol	99.2	0.4	20-Oct 1967	10-Aug 2007
SRM 912a	Urea	99.9	0.1	24-Sep 1968	5-Dec 1990
SRM 913a	Uric Acid	99.6	0.1	24-Sep 1968	28-Dec 2000
SRM 914a	Creatinine	99.7	0.3	24-Sep 1968	8-Feb 1994
SRM 916a	Bilirubin	98.3	0.3	10-Mar 1971	30-Dec 2005
SRM 917b	D-Glucose	99.7	0.2	18-Nov 1970	6-Jan 2006
SRM 920	D-Mannitol	99.8	0.1	17-Jan 1972	23-Nov 1973
SRM 921	Cortisol	98.9	0.2	15-Feb 1973	16-Dec 1973
SRM 925	VMA	99.4	0.4	24-May 1973	26-Dec 1973
SRM 1595	Tripalmitin	99.5	0.2	6-Jul 1983	6-Jul 1983

表7 NISTから頒布されている臨床化学分析用標準物質（組成標準物質）

Name of the reference material	Analyte	Matrix/Material Form	First Certificate Issue Date	Recently Certificate Issue Date	
SRM 909b	Calcium Chloride Cholesterol Creatinine Lithium Magnesium Potassium Sodium Total glycerides Triglycerides Urea Uric Acid	Human serum	Lyophilized	15-Sep 1980	5-Oct 2004
SRM 1951	Cholesterol Total glycerides Triglycerides	Human serum	Frozen	Feb-29 1988	10-Jul 2003
SRM 1952	Cholesterol	Human serum	Lyophilized	Feb-29 1988	8-Jan 1990
SRM 968c	Fat-Soluble Vitamins Carotenoids Cholesterol	Human serum	Lyophilized	21-Apr 1989	4-Aug 2006
SRM 965a	Glucose	Human serum	Frozen	16-Dec 1996	20-Feb 2004
SRM 970	Ascorbic Acid	Human serum	Frozen	18-Oct 2004	18-Oct 2004
SRM 1955	Homocysteine	Human serum	Frozen	6-Oct 2005	6-Oct 2005
SRM 967	Creatinine	Human serum	Frozen	24-Jan 2007	24-Jan 2007

Institute of Standards and Technology, NIST)に変更した。NISTは、米国の国家計量標準を担うとともに、国内の技術革新と進歩に関する重要な4つの分野（バイオテクノロジー、ナノテクノロジー、情報技術、先端製造技術）の研究開発及び標準化を行っている。また、NISTは数多くの標準物質(Standard Reference Material, SRM)を産業、学界、政府、および他のユーザーに供給している。NISTが開発してきた臨床化学分析用標準物質に関して、純物質系及び組成標準物質をそれぞれ表6及び7にまとめた。

NBSにおいて、1960年代後半から純物質系標準物質の開発が行われていた。一方で、1983年に頒布されたTripalmitin以降は、純物質系標準物質の新規の頒布は行われておらず、ロット更新を行うことで、標準物質の維持・供給を行っていると考えられる。

NISTが頒布している臨床化学分析用の純物質系標準物

質の値付けには、差数法が多く用いられている。例えば、SRM 917bのD-グルコースの値付けは、 $^2\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ による糖類の不純物の定性・定量、カール・フイッシャー法による水分量などから不純物量を求め、100%から差し引いて、純度値を見積もっている。

NISTでは、NBS時代の1980年に血清標準物質(SRM 909)を認証して以降、凍結乾燥された血清標準物質の開発を中心に行ってきた。また、近年では、SRM 1951、965a、970、1955、967の様に凍結(frozen)タイプの血清標準物質の開発が盛んに行われている。凍結乾燥品は、ユーザー側で純水を添加し、平衡化・均一化させて使用する必要があり、時間と労力、さらには、正確な測定に影響を与える可能性などが懸念される。近年では、輸送技術が発達した結果、冷凍状態での頒布が可能となり、実際の状態に近い凍結品タイプの血清標準物質の開発が

行われてきたと推察される。また、ロット更新も比較的頻繁に行われており、SRM 909に関しては、1980年、1993年、1996年、2003年、2004年の計5回のロット更新が行われている。NISTの組成標準物質の値付けには、IDMSが多く用いられており、SRM 967のクレアチニン血清標準物質の開発には、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) 及び液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) が用いられた^{14), 15)}。

4.2 IRMMにおける取り組み

ベルギーのGeelにあるIRMMは、欧州委員会 (European Commission, EC) の総局である共同研究センター (Joint Research Centre, JRC) の研究機関の一つで、認証標準物質の開発・供給を行っている。IRMMが頒布している臨床化学分析用の認証標準物質を表8に示す。

IRMMは、1980年代半ばから組成標準物質を中心に開発を進めてきた。IRMMの標準物質の特徴としては、認証値を求める際に、IDMSを中心とした複数の測定手法、大学や病院の臨床検査室といった複数の機関・組織による共同実験によって、値付けが行われていることである。例えば、ERM-DA 192及び193のヒト血清中コルチゾールの認証値には、7機関によるGC-IDMS法¹⁶⁾⁻²⁶⁾、5機関による高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光検出法 (HPLC-UC)²⁷⁾⁻³⁰⁾、3機関によるラジオイムノアッセイによって、値付けられている。

また、近年では、IRMM, LGC, BAMが連携し、欧州標準物質 (ERM, European reference materials) として、国家を超えた標準物質を供給するシステムを構築している。このような背景から、IRMMが頒布している標準物質の一部の記号にERMが用いられるようになった。

5. NMIJにおける取り組み

5.1 現状

NMIJでは、社会的な要請により、2004年4月にバイオメディカル標準研究室を開設し、臨床化学分析分野における認証標準物質及び一次標準測定法の開発に取り組んでいる。これまでに開発してきた臨床化学分析分野の認証標準物質を表9にまとめた。

また、2009年度には、ヒドロコルチゾン (コルチゾール)、2010年度には、尿酸の認証標準物質を頒布予定である。

5.2 今後の開発課題

我が国の臨床検査における基本的検査項目の測定対象物質のうちで、いわゆる低分子化合物に該当するものには、コレステロール、クレアチニン、尿酸、尿素、中性脂肪、グルコースなどがあげられる。これらの内、NMIJから供給 (予定も含む) されていない標準物質は中性脂肪とグルコースである。中性脂肪は、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリドの総称であるが、全体の

表8 IRMMから供給されている認証標準物質

Name of the reference material	Analyte	Matrix/Material Certified	Form
ERM-DA192	Cortisol	Human serum 98.8 ± 2 µg/L	Lyophilized
ERM-DA193	Cortisol	Human serum 277 ± 5 µg/L	Lyophilized
ERM-DA451/IFCC	Cortisol	Human serum 83 - 764 nmol/L	Frozen
ERM-DA347	Progesterone	Human serum 3.19 ± 0.07 µg/L	Lyophilized
BCR348R	Progesterone	Human serum 8.5 ± 0.4 µg/L	Lyophilized
BCR573	Creatinine	Human serum 68.7 ± 1.4 µmol/L	Lyophilized
BCR574	Creatinine	Human serum 105.0 ± 1.3 µmol/L	Lyophilized
BCR575	Creatinine	Human serum 404.1 ± 7.1 µmol/L	Lyophilized
BCR576	Estradiol	Human serum 0.114 ± 0.005 nmol/L	Lyophilized
BCR577	Estradiol	Human serum 0.689 ± 0.032 nmol/L	Lyophilized
BCR578	Estradiol	Human serum 1.34 ± 0.07 nmol/L	Lyophilized
IRMM468	T4	Pure material 98.6 ± 0.7 %	Crystal
IRMM469	T3	Pure material 97.1 ± 0.7 %	Crystal

表9 NMIJから配布されている純物質系認証標準物質

Name of the reference material	Analyte	Certified value	Uncertainties	First Certificate Issue Date
NMIJ CRM 6001-a	Cholesterol	99.9 %	0.1 %	1-Apr 2005
NMIJ CRM 6005-a	Creatinine	99.9 %	0.2 %	21-May 2007
NMIJ CRM 6006-a	Urea	99.9 %	0.1 %	1-May 2008

90～95%は、トリグリセリドが占めている²⁾。また、日本人の血清中トリグリセリドを構成する脂肪酸の割合は、オレイン酸(44%)、パルミチン酸(26%)、リノール酸(16%)、その他(14%)である²⁾。中性脂肪の標準物質として、NISTからはグリセロール1分子に3個のパルミチン酸がエステル結合したトリパルミチンが頒布されている。我が国においては、グリセロール1分子に3個のオレイン酸がエステル結合したトリオレインを基準として、中性脂肪を測定する手法がJSCC勧告法³¹⁾として、広く用いられているので、トリオレインの認証標準物質を早急に開発する必要がある。図2にトリオレイン及びトリオレインの構成脂肪酸であるオレイン酸の構造式を示す。不純物としては、他のトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、グリセロール、飽和・不飽和脂肪酸などが考えられるため、様々な分離分析を用いて、評価する必要がある。

グルコースは、糖尿病の診断や治療効果を判断するために重要であり、認証標準物質の開発が望まれる。グルコースの構造式を図3に示す。グルコースは、代表的な単糖の一つで、光学活性を有しており、D体が、天然に大量に存在する。また、特徴的なUV吸収は示さないため、UV検出器による測定は、困難である。グルコースの分子式は、フルクトースやガラクトースと同じ分子式(C₆H₁₂O₆)で示され、構造異性体が多く存在する。従って、様々な分離分析を用いて、評価する必要がある。

臨床化学分析用の組成標準物質は、JCCLS, ReCCS, 福祉・医療技術振興会(Health Care Technology Foundation, HECTEF)において開発が進められてきた。これまで、我が国では、純物質系認証標準物質の開発が行われていなかったため、海外の上位標準物質にトレーサブルな組成標準物質が多く、国内で完結したトレーサ

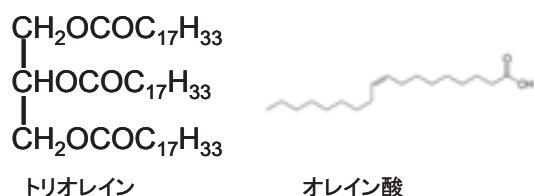


図2 トリオレイン及びオレイン酸の構造式

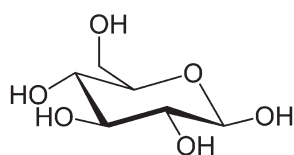


図3 グルコースの構造式

ビリティ体系を実現することが難しかった。現在、NMIJにおいて、臨床化学分析用の純物質系認証標準物質の開発が早急に進められている。今後は、臨床検査分野における国内での計量学的トレーサビリティ体系を構築するために、関連学協会として協力して、組成標準物質の開発を進めて行く必要がある。組成標準物質の開発におけるNMIJの役割としては、認証標準物質を自ら開発するのみならず、関連学協会や試薬メーカー等が調製した標準物質に関して、認証値を提供する校正サービスなどが期待される。

5.3 その他の課題と展望

臨床化学分析用の標準物質の開発は、NISTやIRMMによって、先行して進められてきた。また、欧州では、国家の枠組みを超えた標準物質であるERMの整備が進められている。一方、アジア圏内では、NMIJ、中国のNIM、韓国のKRISS (Korea Research Institute of Standards and Science) の3機関が中心となり、アジア圏内の計量標準における国際的な連携を行う組織(Asian Collaboration on Reference Materials, ACRM)を発足させた³²⁾。NIM、KRISSは、臨床化学分析分野の標準物質を開発しており、国際基幹比較にも積極的に参加している。今後、ACRMを中心として、各国のNMIが連携して認証標準物質を開発していく可能性も考えられる。

また、臨床検査(Clinical Laboratory Test)には、臨床的役割からの分類として、一般的な病態を把握するための日常検査や、緊急時、急激な変化を認める場合に行う緊急検査、さらには、より詳細な病態の把握のために行われる特殊検査などがある¹⁾。一方、検査方法による分類では、血液や尿などの生体試料に対して行われる検体検査だけでなく、機械工学や電子工学の技術を応用することにより、患者の物理的変化量をとらえる生体機能検査(例えば、心電図検査、脳波検査など)、さらには、一定の負荷を与える負荷試験や内視鏡検査などがあり、臨床検査と一言でいっても非常に幅が広い¹⁾。今後は、化学標準だけでなく、NMIJ全体として、検査医療全般におけるトレーサビリティ体系の構築が要求される可能性がある。

医薬品、法科学の標準物質に関しては、NISTが先行して、開発を進めている。昨今、グローバル化が進んでおり、人的及び物的交流は益々盛んになると考えられる。今後は、これらの分野においても、我が国における計量学的トレーサビリティ体系の構築及び国際的な相互承認が必要になることも考えられる。

6. まとめ

国際的な連携を基に、臨床化学分析における計量学的トレーサビリティ体系の構築が急速に進められている。臨床化学分析分野の特徴として、測定対象物質の幅が広いこと及び組成標準物質のニーズが高いことが上げられる。NISTでは、NBS時代の1960～80年の間に開発した純物質系標準物質を基盤として、近年では、組成標準物質の開発にシフトしている。欧州では、IRMMを中心として、国家の枠を超えた標準物質であるERMの整備が進められている。NMIJは、2004年にバイオメディカル標準研究室を立ち上げ、これまでに複数の純物質系標準物質を開発してきた。今後は、関連学会と協力して、組成標準物質の開発を視野に入れ、国内での計量学的トレーサビリティ体系を構築すると共に、国際的な活動にも積極的に参加し、時間・空間を越えた普遍的な臨床化学分析の実現に向けて、研究開発を推し進める必要がある。

参考文献

- 1) 標準臨床検査医学 第3版 (医学書院、2006)
- 2) 臨床化学検査学 臨床検査学講座 第2版 (医歯薬出版、2006)
- 3) 日本臨床病理学会「日常初期診療における臨床検査の使い方小委員会」(編)：日常初期診療における臨床検査の使い方、基本的検査(案) (日本臨床病理学会、1989)
- 4) 最新 臨床検査のABC 日本医師会生涯教育シリーズ (医学書院、2007)
- 5) 加藤尚志、産総研計量標準報告 5-1 (2006) 81-95.
- 6) Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices
- 7) KCDB, <http://kcdb.bipm.org/>
- 8) CIPM/MRA, <http://www.bipm.org/en/cipm-mra/>
- 9) JCTLM, <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>
- 10) B. Toussaint, H. Schimmel, C.L. Klein, M. Wiergowski, H. Emons, J. Chromatogr. A 1156 (2007) 236.
- 11) 日本臨床化学会学術連絡委員会、臨床化学 20-4 (1991) 247.
- 12) HEW Publication NO. (CDC) 77-8330. HEW. USPHS, Centers for Disease Control, (1976).
- 13) M. Somogyi, J. Biol. Chem., 160 (1945) 69.
- 14) M.J. Welch, A. Cohen, H.S. Hertz, K.J. Ng, R. Schaffer, P.V.D. Lijn, V.E. White, Anal. Chem. 58 (1986) 1681.
- 15) N.G. Dodder, S.S.C. Tai, L.T. Sniegoski, N.F. Zhang, M.J. Welch, Clin. Chem. 53 (2007) 1694.
- 16) W.T. Yap, R. Schaffer, H.S. Hertz, E. White, M.J. Welch, Biomed. Mass Spectrom. 10 (1983) 262.
- 17) L. Siekmann, H. Breuer, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20 (1982) 883.
- 18) J.A. Jonckheere, A.P. De Leeheer, H.L. Steyaert, Anal. Chem. 55 (1983) 153.
- 19) J.A. Jonckfeere, A.P. De Leenheer, Biomed. Mass Spectrom. 10 (1983) 197.
- 20) K.D.R. Stechell, C.H.L. Shackleton, Clin. Chim. Acta 47 (1973) 381.
- 21) M. Axelson, J. Sjoval, J. Steroid Biochem. 5 (1974) 733.
- 22) L. Siekmann, J. Steroid Biochem. 5 (1974) 727.
- 23) L. Dehennin, A. Reiffsteck, R. Scholler, Biomed. Mass Spectrom. 7 (1980) 493.
- 24) A. Cohen, H.S. Hertz, J. Mandel, R.C. Paule, R. Schaffer, L.T. Sniegoski, T. Sun, M.J. Welch, V.E. White, Clin. Chem. 26 (1980) 854.
- 25) L. Siekmann, S. Martin, A. Siekmann, H. Breuer, Acta Endocrinol. Suppl. 202 (1976) 65.
- 26) L.T. Sniegoski, J.R. Moody, Anal. Chem. 51 (1979) 1577.
- 27) W.E. Lambert, J.P.M. De Slypere, J.A. Jonckheere, A. Vermeulen, A.P. De Leenheer, Anal. Biochem. 134 (1983) 216
- 28) A.M. Cadarella, G.E. Readon, E. Canalis, Clin. Chem. 28 (1982) 538.
- 29) N.R. Scott, P.F. Dixon, J. Chromatogr. 164 (1979) 29.
- 30) E. Langhoff, H. Flachs, J. Ladefoged, E. Hirdberg, Eur. J. Clin. Pharmacol. 26 (1984) 651.
- 31) 日本臨床化学会学術連絡委員会、臨床化学 25-1 (1996) 39.
- 32) ACRM, <http://www.asiacrm.org/>