

アジア 6 都市における主要な臨床検査の変動要因の 分析と共有基準範囲の可能性

Ichihara K, Itoh Y, Lam CWK, Poon PMK, Kim JH, Kyono H, et al. Sources of variation for commonly measured serum analytes among 6 Asian cities and consideration of common reference intervals. Clin Chem 2008; 54: 356-65.

市原 清志*

I. 背景と目的

臨床検査の標準化は国際的に連携をとった努力で着実に進んだが、診断の目安となる基準範囲はなお不統一である。これは、信頼性のある基準範囲の設定には①適切な健常者を十分数(少なくとも数百例)集める必要性、②種々の生理的変動を考慮し、適切に採血する必要性、③統計学的に妥当な方法で計算する必要性など、たくさん考慮すべきことがあるためと考えられる。したがって、基準範囲の設定は、個々の検査室の努力で行うのではなく、多施設が共同で多数例から信頼性の高い形で行い、それを共通に利用することの必要性が強く求められている。その前提となるのは、測定値の標準化が達成されていることと、測定値に地域差がないことである。

筆者は、国際臨床化学連合科学部門血漿蛋白専門委員会(IFCC-SD C-PP)の委員として、同委員会が企画・作成した血清蛋白(免疫グロブリン、補体成分、CRP など 14 項目)の国際標準品 CRM 470 の普及に関与したが、その普及により世界中の測定値は事実上揃った。そこで、2002 年に上海、香港、クアラルンプール、台湾、ソウル、東京の臨床検査室の協力を得、各都市から健常者 120~200 名合計 1100 名から採血し、血清蛋白 13 項目の基準範囲の設定を試みた¹⁾。各地で得

た血清試料は全て -80℃ で凍結して日本に輸送し、同一の測定装置で測定した。その結果、予想に反して、IgG、C3、C4、CRP などほとんどの測定値に比較的明瞭な地域差を認めた。また同時に測定した、基本的な生化学検査 8 項目(HDL-C、TG、CRE 等)にも一部で地域差を認めた。しかし、健常者に関する詳細な情報を得ておらず、その違いが何であるかは明らかではなかった。

そこで、2005~6 年にその結果の確認とより多くの生化学検査項目においても地域差の有無を調査分析すべく、第 2 回調査が IFCC-SD C-PP ならびにアジア太平洋臨床生化学連合(APFCB)の企画で実施された。本稿では、その調査方法と分析結果を原著論文²⁾にそって紹介するが、その新奇な点として評価された点³⁾は、地域差の程度を表す統計的評価指標の提案と、的確な調査・分析方法で主要臨床検査項目 31 のうち、11 項目で明瞭な地域差を明らかにした点である。なお、原著では紙面の制約で十分なデータを提示できなかったが、本稿では図表をより多く取り入れて、その内容を紹介する。

II. 方法

1. 対象者

ジャカルタ、香港、台湾、ソウル、宇部、旭川の 6 都市の検査室において、日常の活動度が同程

* 山口大学大学院医学系研究科 保健学系学域病態検査学分野 ichihara@yamaguchi-u.ac.jp

度となるよう健常対象者を主として検査部またはそれが属する病院に勤務するものに限定して調査を行った。男女比がほぼ均等で、年齢分布も20～60歳の範囲でほぼ一様となるように対象者を集めた。除外基準として、① 現在慢性疾患(高血圧、糖尿病、アレルギー疾患等)で定期的な投薬治療中、② 入院を要する急性疾患や手術から復帰して1週間以内、③ 妊娠中、④ 多量の飲酒習慣(摂取エタノール量 $\geq 70\text{g}/\text{日}$)、⑤ 喫煙量 ≥ 25 本以上/日、⑥ BMI ≥ 30 を置いた。その結果、香港:120名(男性46名、女性74名)、ソウル:102名(男性45名、女性57名)、台北:100名(男性62名、女性38名)、ジャカルタ:97名(男性45名、女性52名)、山口:81名(男性39名、女性42名)、旭川:80名(男性41名、女性39名)、計580名の協力を得た。

2. 調査対象項目

血清酵素活性(AST、ALT、ALP、LD、 γ GT、CPK、AMY)、血清脂質(TG、TCho、HDL-C)、血清電解質(Na、K、Cl、Ca、IP)、総蛋白TP、アルブミンAlb、クレアチニンCRE、尿素窒素UN、尿酸UA、血清蛋白(CRP、IgG、IgA、IgM、C3、C4、Tf、TTR、RBP、Cystatin C)である。また、生活習慣などの個人特性に関するアンケート調査を匿名で実施し、年齢、性別、BMI、喫煙、飲酒、運動習慣、活動度、食習慣(主要食品についての摂食頻度と食べる速さ、等)を調べた。

3. 採血と血清試料の保存

採血は、前夜からの絶食と採血前15分間の安静の条件下で午前7～10時に採血、日常検査と同様の条件で遠心して血清分離後、 -70°C 以下で保存した。全ての採血が終わってから日本に送り、デイドベーリング社(現シーメンス社)とSRL社(東京八王子)の協力を得て、同じ分析装置を使って一括測定した。

4. データ解析

共有基準範囲の設定で問題となる地域差の大きさに加え、性差と年齢差の大きさをまとめ比較分析する目的で、3レベル枝分かれ分散分析法⁴⁾を適用した。これにより標準偏差(SD)形式で要因変動として、地域差SD(SD_{地域})、性差SD(SD_性)、

年齢差SD(SD_{年齢})が、また、残差変動として、純粋な個体間SD(SD_{純個体})が求まる(図1)。ここで、各要因変動の有意性は、それとSD_{純個体}との比を取り、その比が0.4以上あれば層別化を要する有意な変動要因と判断する。例えば、地域差については地域差SD比 $=\text{SD}_{\text{地域}}/\text{SD}_{\text{純個体}} \geq 0.4$ であれば地域差は基準範囲の設定で無視できないと判断する。ここで、0.4は性差SD比から判断して、一般にそれが0.4以上である項目(表1参照)のALT、GGT、CK、HDL-C、CRE、UAなどで、男女別の基準範囲が設定されるためである。なお、年齢は20～10歳刻みで値を段階型の値に置き換えて分析を行った。

一方、生活質問表の回答も含めた検査値の地域差の要因を調べるため、各検査値を目的変数におき、説明変数には、「地域」(宇部を基準カテゴリーとして5つ作成)、「性別」(女性1男性0としてダミー変数)、「年齢」、「BMI」、「飲酒度」(エタノール消費量で5段階値に)、「喫煙度」(喫煙指数から5段階値に)、「活動度」、「食事の速さ」、「満腹度」、「主要食品の週当たりの消費頻度」(5段階値として)をおいて、地域差以外の測定値の変動要因についても解析を行った。

III. 結 果

表1は3レベル枝分かれ分散分析法の結果で、全検査項目の測定結果について、性差、年齢差、地域差の大きさを示す。純個体間変動とのSD比が0.4以上で有意に大きく、地域差を無視できないとされた項目として、LD、TP、Glb、UN、Na、K、Cl、IP、IgG、C3、C4があり、それ以下でも、AMY、Alb、補正Caである程度明瞭な地域差を認める。

同様の基準で性差を認めた項目は、ALT、CK、GGT、HDL-C、TG、UN、CRE、UA、IgM、Tf、TTR、RBPなどである。また、年齢差では、LD、ALP、TCO、IPで明瞭な変動を認めた。

地域差と性差の程度を図示すると、図2のようになる。これから、地域差の少ない、AST、ALP、GGT、TCho、HDL-C、UA、CRE、Cystatin Cなどでは、基準範囲を共有しうが、

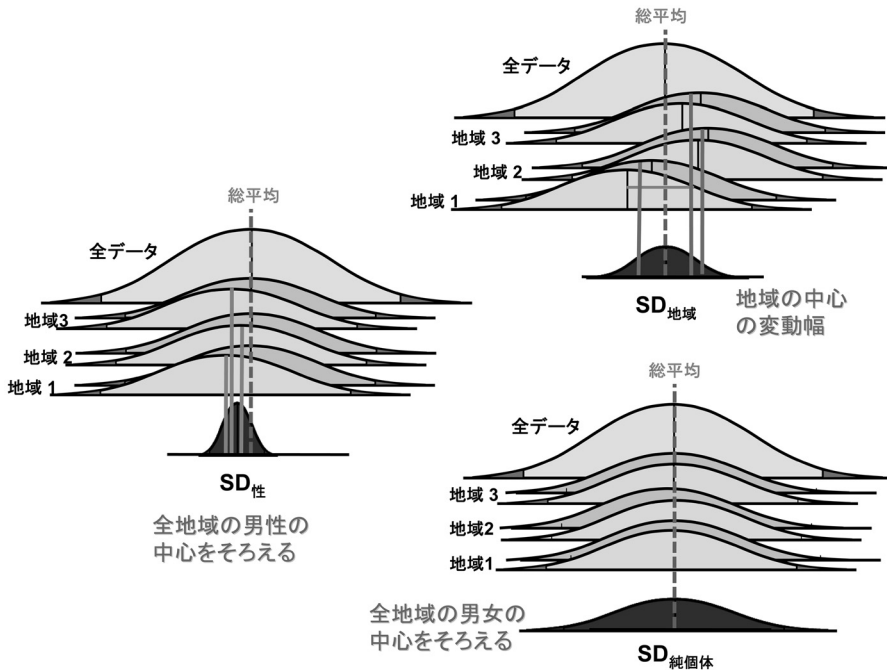
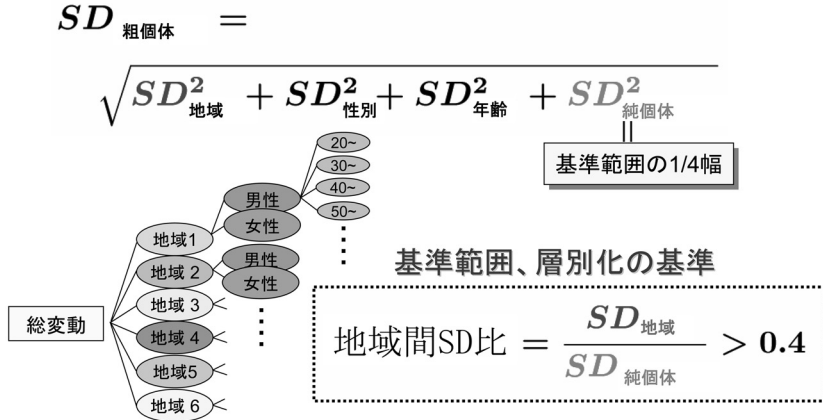


図1 3レベル枝分かれ分散分析の原理と、地域差SD比の意味

枝分かれ分散分析では、観察したデータを階層的に取り扱い、まず地域でデータを分類、各地域で男女に分類、さらに男女別に年齢層に分類するなどして、階層的にデータを分類してゆく、そして、地域別にデータの中心をそろえると地域差の程度を標準偏差でSD_{地域}として算出できる。同様に、地域別に、各地域の男性の中心をそろえると、性差の程度をSD_性として算出できる。図では記さないが、さらに各地域の各性の中央位置を揃えると年齢差の程度をSD_{年齢}として算出でき、最終的に残った変動、すなわち全地域の男女の中心揃える(年齢も考慮すると、男女別年代別の中心を揃える)と、残った測定値の広がり、は、個体間変動の純粋な大きさ(SD_{純個体})に相当する。

ここで、各要因変動(SD_{地域}、SD_性、SD_{年齢})の実質的な大きさを知るには、そのSD_{純個体}との比をとればよいこととなる。もともと純個体間変動は、地域や年齢や性別による偏りを取り除いたもので、その大きさSD_{純個体}を基準にするのが妥当といえる。

表1 3レベル枝分かれ分散分析による測定値の変動要因の解析

国際単位で表した、測定値の総平均値、地域、性別、年齢という3つの要因による変動の大きさを標準偏差の形式でSDで表した(SD_{地域}、SD_性、SD_{年齢})。それぞれの()内には、各SDをSD_{純個体}で割ってそれとの比を示した。本文で述べたごとく、この比が0.4以上の場合背景色を灰色で、0.20~0.39を薄い灰色で示した。

検査項目	単位	総平均	SD(純個体間SDに対する比率)			
			都市間	性差	年齢差	純個体間
AST ‡	U/l	20.1	0.00 (0.00)	1.85 (0.31)	1.42 (0.24)	5.20
ALT ‡	U/l	16.9	0.33 (0.04)	3.98 (0.44)	1.67 (0.18)	7.30
LD	U/l	155.4	17.05 (0.72)	0.00 (0.00)	10.66 (0.45)	23.65
ALP	U/l	205.3	0.00 (0.00)	13.83 (0.27)	25.49 (0.50)	51.44
GGT ‡	U/l	27.0	0.00 (0.00)	8.49 (0.60)	3.68 (0.26)	11.38
CK ‡	U/l	103.3	0.00 (0.00)	27.94 (0.54)	5.88 (0.11)	42.37
AMY	U/l	78.1	5.74 (0.27)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	21.01
TCho	mmol/l	5.02	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.39 (0.49)	0.80
HDL-C	mmol/l	1.60	0.00 (0.00)	0.19 (0.62)	0.04 (0.11)	0.31
TG ‡	mmol/l	1.07	0.00 (0.00)	0.21 (0.39)	0.16 (0.29)	0.45
TP	g/l	73.9	2.00 (0.55)	0.00 (0.00)	0.93 (0.26)	3.63
Alb	g/l	45.8	0.57 (0.25)	0.84 (0.38)	0.82 (0.37)	2.24
Glb	g/l	28.1	1.43 (0.48)	0.74 (0.25)	0.50 (0.17)	2.95
UN	mmol/l	4.60	0.48 (0.46)	0.42 (0.41)	0.17 (0.16)	1.04
CRE	μmol/l	65.6	0.00 (0.00)	13.59 (1.37)	1.08 (0.11)	9.91
UA	μmol/l	314	0.00 (0.00)	73.18 (1.17)	8.33 (0.13)	62.35
Na	mmol/l	142.5	0.81 (0.44)	0.33 (0.18)	0.70 (0.39)	1.82
K	mmol/l	4.30	0.15 (0.42)	0.06 (0.17)	0.03 (0.07)	0.35
Cl	mmol/l	103.9	0.95 (0.52)	0.55 (0.31)	0.36 (0.20)	1.81
aCa	mmol/l	2.20	0.02 (0.27)	0.00 (0.00)	0.01 (0.23)	0.06
IP	mmol/l	1.34	0.08 (0.46)	0.02 (0.15)	0.06 (0.40)	0.16
IgG	g/l	13.60	1.00 (0.44)	0.59 (0.26)	0.18 (0.08)	2.25
IgA	g/l	2.34	0.12 (0.15)	0.00 (0.00)	0.12 (0.15)	0.80
IgM	g/l	1.23	0.00 (0.00)	0.24 (0.57)	0.15 (0.35)	0.42
C3	g/l	1.072	0.11 (0.63)	0.03 (0.17)	0.03 (0.20)	0.17
C4	g/l	0.228	0.04 (0.54)	0.00 (0.00)	0.02 (0.29)	0.07
Tf	g/l	2.42	0.00 (0.00)	0.12 (0.33)	0.06 (0.15)	0.38
TTR	mg/l	269.9	0.00 (0.00)	40.70 (0.91)	7.48 (0.17)	44.75
RBP	mg/l	38.9	0.00 (0.00)	7.84 (0.81)	3.58 (0.37)	9.64
CysC	mg/l	0.713	0.01 (0.12)	0.07 (0.75)	0.03 (0.28)	0.09
CRP ‡	mg/l	0.985	0.21 (0.26)	0.00 (0.00)	0.11 (0.14)	0.56

aCaは補正Caで、 $aCa = Ca - (40 - Alb) / 20$ として求めた

‡ 対数変換した測定値で分散分析を行い、その後逆変換して、SDを求めた。

LD、Alb、Glb、UN、Na、K、IgG、C3、CRPでは共有が困難と判断される。

表2は、地域差、性差以外に、年齢、BMI、喫煙度、飲酒度などが、測定値の変動に影響を与えているかを重回帰分析で調べた結果であるが、一般にそれらによる測定値の変動は、地域差や男女差に比べると小さいと判断された。ただ、HDL-Cのように、よく知られた肥満度、飲酒、喫煙などが有意にそのHDL-Cの測定値に関係しているなど、興味深い結果となっている。

IV. 考 察

1. 地域差の現状

今回予想外に多くの検査で、明瞭な地域差を認めたが、特に注目されたのは、LDの地域差SD比が0.7と極めて大きかった点で、定期運動の程度に地域差を認めず、また溶血に関与する他の検査値との関連もなかった。さらに、測定時に分析装置や肉眼によるチェックで溶血を認めた例は一例もなかったなどより、遺伝的な因子が最も考えやすく、アイソザイムパターンの違いに興味を持たれる。電解質の検査値の地域差は、食習慣の違

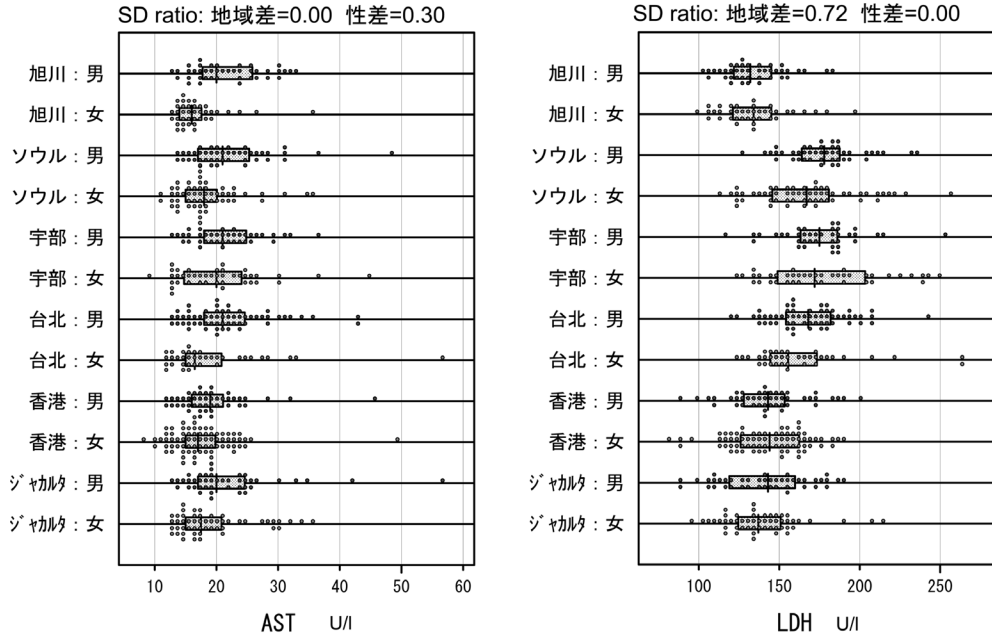


図 2-1

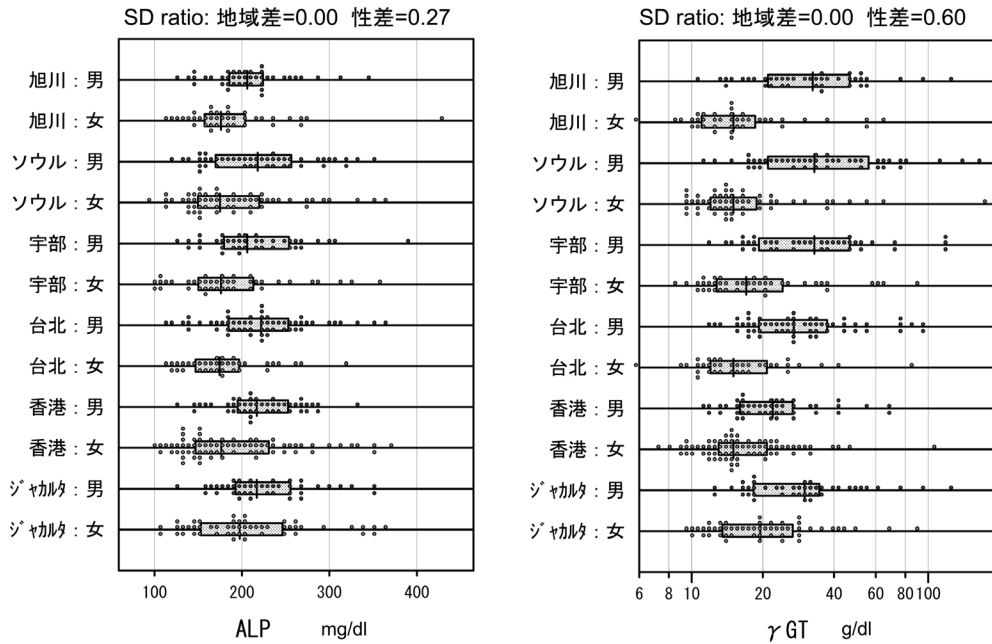


図 2-2

図 2 主要な検査値の地域差・男女差

本研究で調べた 31 項目の臨床検査値のうち、代表的な 12 項目について男女別地域別の測定値の分布特性を示す。各図の上端には、地域差、性差の程度を表す、地域差 SD 比、性差 SD 比を表す。その比が、0.4 以上であれば層別化を要する有意な要因、0.2~0.39 の場合、層別化は必ずしも必要でないが、無視できない変動要因と判断できる。

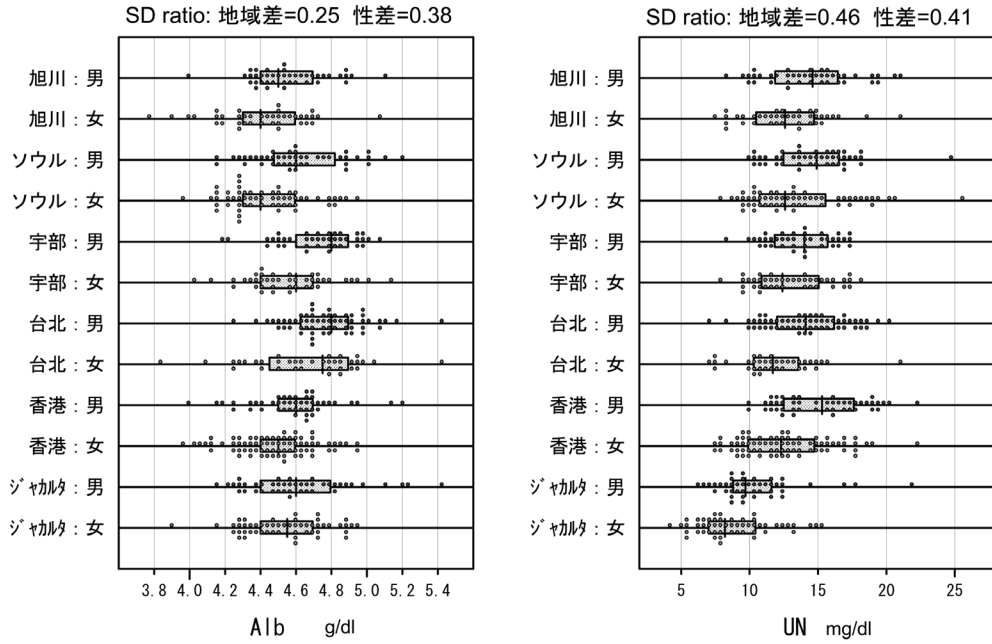


図 2-3

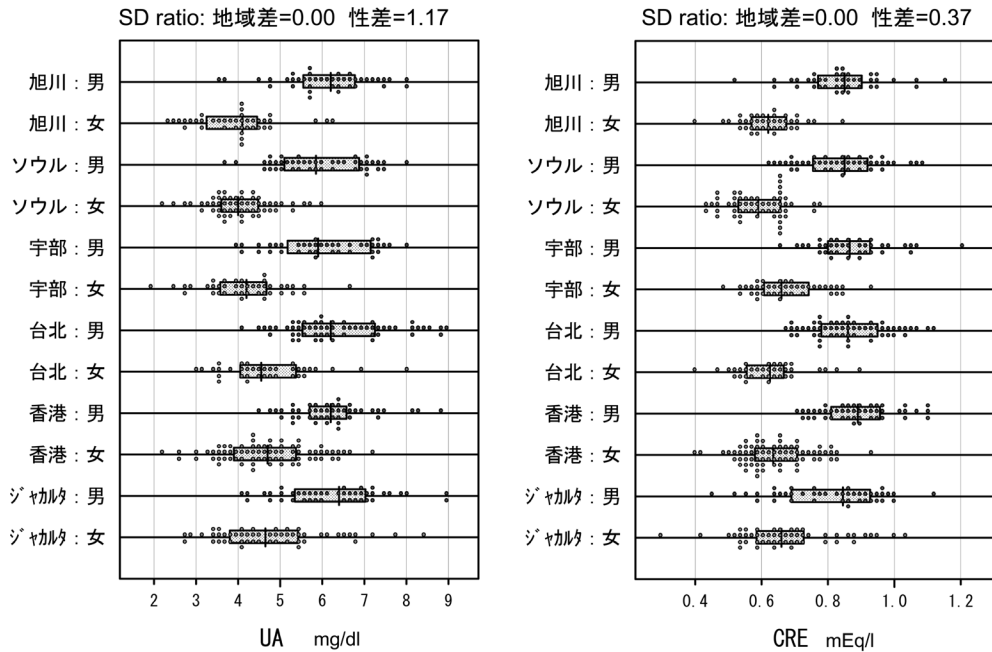


図 2-4

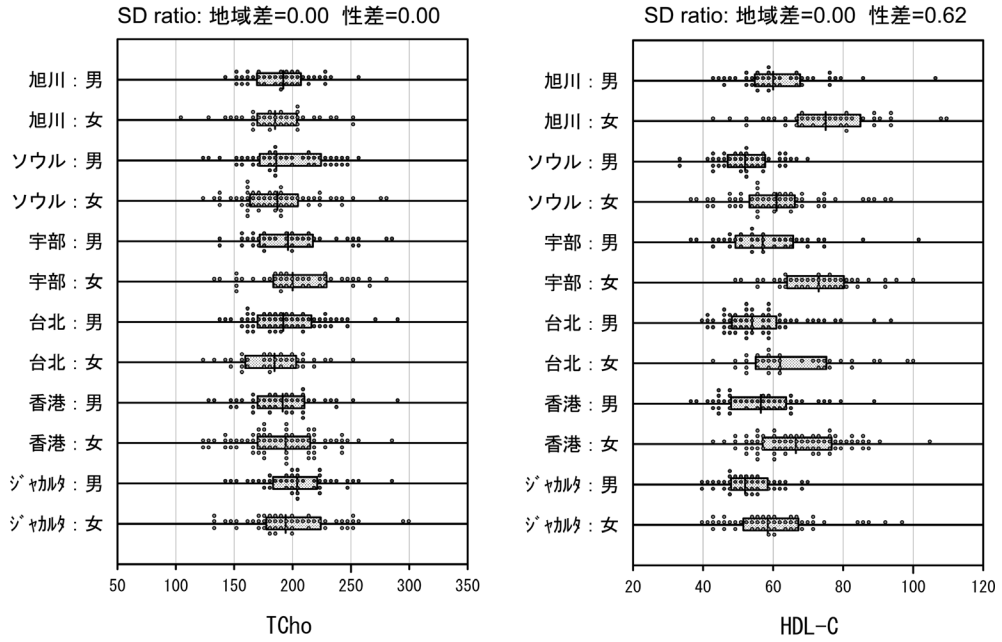


図 2-5

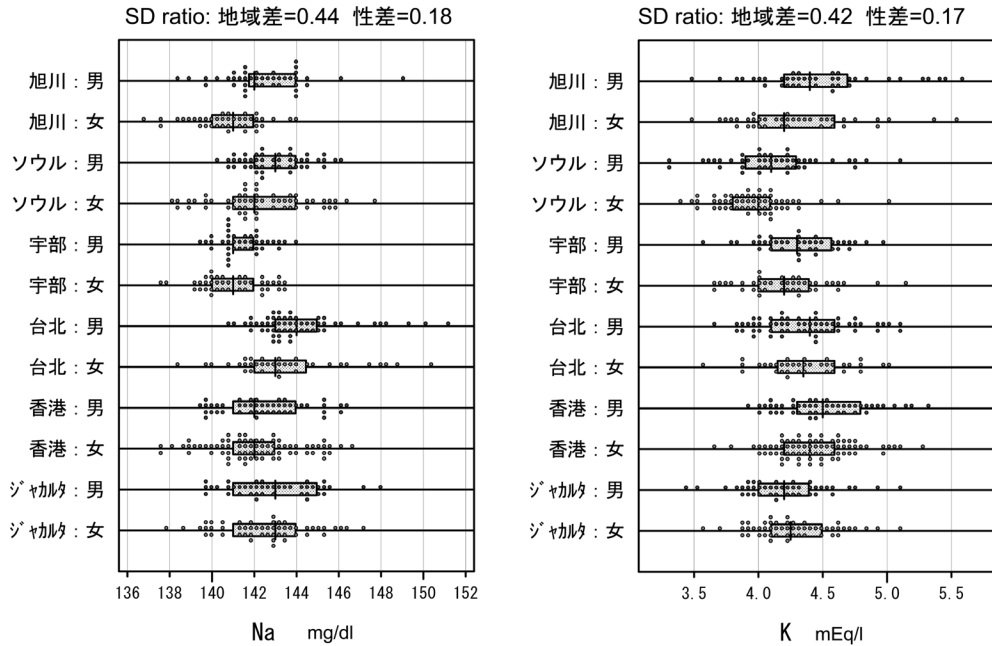


図 2-6

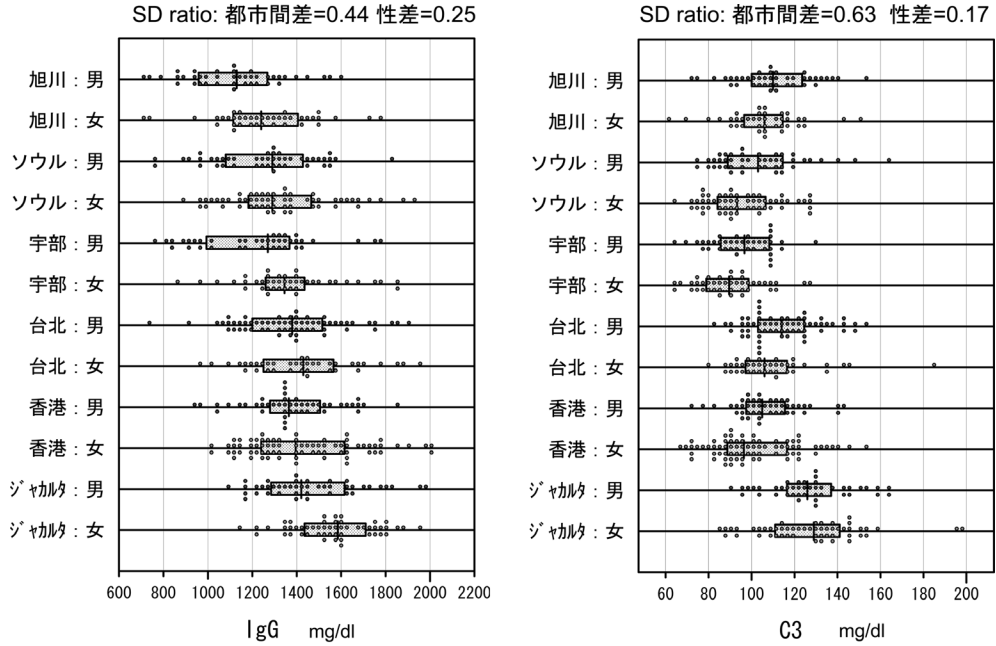


図 2-7

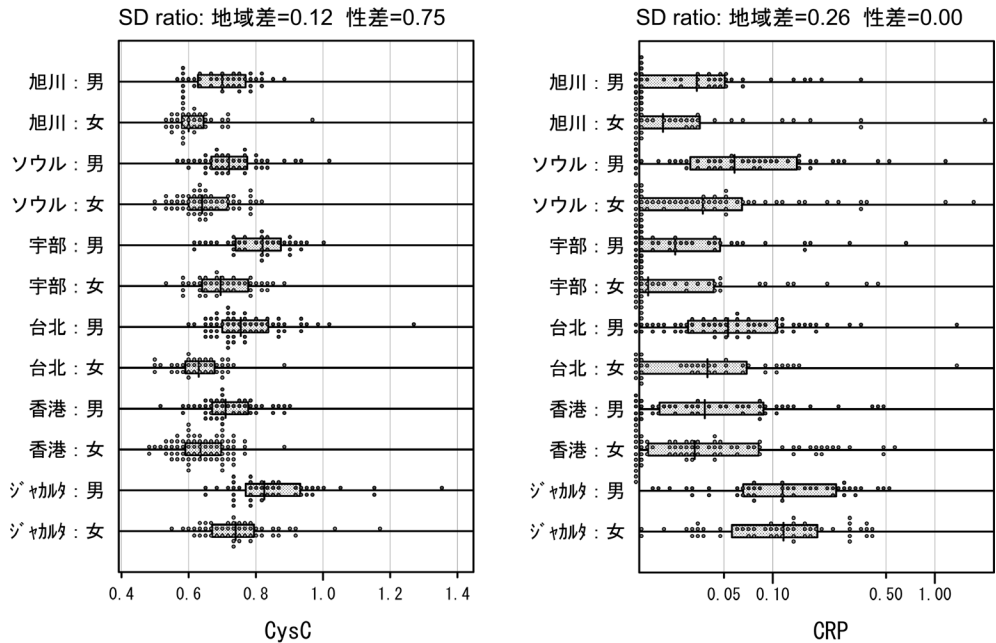


図 2-8

表2 重回帰分析を用いた測定値の変動要因の解析結果

検査項目	n	重相関係数 R			検査値の関連の有意性を示す t値							
		性	性+地域	性+地域 +の因子	年齢	BMI	喫煙度	飲酒度	運動習 慣度	他の因子1	他の因子2	
AST	570	0.27	0.30	0.41	3.72	3.20				フルーツ	2.70	
ALT	570	0.38	0.47	0.55	3.53 **	5.85 *						
LDH	572	0.07	0.54	0.62	3.81 **	5.37 **						
ALP	569	0.24	0.27	0.36	4.40 **							
γGT	568	0.45	0.47	0.57	3.57 **	5.93		3.90				
CPK	572	0.41	0.44	0.49					2.95	体重	4.62	
AMY	568	0.00	0.26	0.33						体重	-5.01	
TCho	572	0.06	0.16	0.43	8.34 **							
HDL-C	572	0.37	0.48	0.53		-5.43	-2.84	2.83				
TG	570	0.32	0.38	0.50	4.62 **	6.08						
TP	572	0.05	0.45	0.50		-3.38						
Alb	572	0.30	0.42	0.47	-6.06 *							
Glb	570	0.16	0.46	0.49			-3.12					
UN	568	0.25	0.50	0.54	3.29					魚介類	2.83	
CRE	568	0.68	0.69	0.70			-2.70					
UA	571	0.63	0.65	0.69		5.43				魚介類	2.69	塩辛いもの -2.97
Na	569	0.18	0.42	0.48	5.62 **					フルーツ	-3.04	肉類 2.60
K	570	0.09	0.39	0.40								
Cl	572	0.13	0.49	0.51	2.61							
Ca	572	0.05	0.27	0.33					3.62			
IP	571	0.15	0.42	0.43	-3.18							
IgG	578	0.18	0.44	0.48			-4.22					
IgA	578	0.05	0.18	0.22								
IgM	576	0.36	0.42	0.46	-4.20 **							
C3	575	0.16	0.52	0.63		9.99						
C4	576	0.06	0.45	0.52	3.88	4.64						
Tf	576	0.21	0.25	0.30								
TTR	578	0.53	0.57	0.61		3.32		4.57				
RBP	578	0.48	0.51	0.60	6.38			5.44				
CysC	576	0.43	0.59	0.65	6.86		2.71					
CRP	578	0.08	0.38	0.45						豆類	-3.57	

左3列のR値は、説明変数に性だけを、性+地域を、全ての有意なものを入れた場合のR値で、説明変数追加でRが0.2以上変化すると灰色、0.06~0.20変化すると薄い灰色で示し、右7列は、t値からみた説明変数の有意性、数値の背景色で3段階で示した。

(有意水準の目安はt値がt=2.59でP=0.01, t=3.31でP=0.001, t=3.92でP=0.0001, and t=4.46でP=0.00001)

いが関与していると思われるが、生活習慣調査票では、食事内容の細かな調査をしておらず、詳細は不明である。原著論文の中でも記したが、Kは2、3の地域での比較ではあるが、地域差の報告がいくつかあり、今回の結果は、Na、Cl、Ca、IPなどのそれと同様に今後の共有基準範囲を考えるうえで重要な知見と言える。

第1回調査¹⁾の場合と同様、IgG、C3、CRPで明瞭な差を認めたが、もともとIgGは喫煙により低下するので、その習慣の違いも考えられるが、重回帰分析結果は地域差と喫煙は独立した変動要因であることを示す。実際上緯度が低くなるほど、IgGが上がり、C3にもそのような傾向がみられ、恐らく病原体への暴露が低緯度地域に行くほどより多くなると推定される。

2. 層別化・地域差の判定基準の重要性

CLSI(旧NCCLS)のガイドラインでは、基準範囲の設定で、有意な変動要因がある場合、基準個

体の測定値を層別化することが求められている⁵⁾。その中では、Harris & Boyd⁶⁾の方法が推奨されているが、地域差など分類数が3つ以上の場合には対応していない。またLahti⁷⁾やFraser⁸⁾も同様の層別化基準を出しているが、前者では、数が少ないと不安定な判定になり、逆に多いと判定が鋭敏すぎる。後者では、生理的変動幅を目安にしており、複数の変動要因の制御ができないなどの大きな欠点が存在する。今回筆者が提唱した方法は、3要因まで同時に分析でき、かつそれぞれが3つ以上のカテゴリーに分かれていても使えるなど極めて汎用的な方法となっている³⁾。したがって、今後の共有基準範囲の設定において、本法は広く適用されてゆくべきデータ解析法と考えられる。

3. 共有基準範囲設定に関する今後の展望

本研究の成果は、IFCCやAPFCBでも大きな反響を呼ぶこととなり、すでに2007年10月に中国北京のAPFCBの総会および2008年4月にト

ルコのアタリヤで行われ IFCC の血漿タンパク委員会でも、追加調査が必要と判断され、より多くの国と地域をカバーする形での第3回調査の企画が行われた。すでに2009年1月をスタートにほぼ同様の調査が実施されつつある。参加は東南、東アジアの10地域20施設と、日本国内では13地域計32施設余りで、1地域当たり120名以上の健常者の参加を目指している(総数約3000名)。また検査項目数も、標準化の立ち遅れているイムノアッセイ項目を大幅に取り入れ、合計97項目としている。また、方法間差、試薬間差が入らないようにするため今回もすべて -80°C に凍結して試料を日本に運び、日本で一括測定する予定である。現在ベックマンコールター社など8つの試薬メーカーから試薬の提供を受けることとなっており、恐らく半数以上の検査項目で共有基準範囲が求まると予測している。問題は、標準化されていない項目の場合、参加施設に固有の試薬や測定系での基準範囲が求まらない点である。今回この点を克服するため、各施設と中央の施設との間で、厳密なクロスチェックを行い、参加施設の値に変換した共有基準範囲を提供できるようにする計画である。これにより、ほとんどすべての項目で、全地域共有の基準範囲または、地域差がある場合、地域別の基準範囲の提供が可能となる。さらに本企画では、多数の測定値だけでなく、詳細な個人特性の調査も行うので、地域差を認めた場合の細かい要因分析の解析が可能となるように配慮している。これにより、この大規模な調査結果は、事実に基づく臨床検査診断学の情報ソースとして大きな意義を持つと期待される。

文 献

- 1) Ichihara K, Itoh Y, Min WK, Soo kFY, Lam CWK, Kong XT, et al. Diagnostic and epidemiological implications of regional differences in serum concentrations of proteins observed in six Asian cities. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 800-9.
- 2) Ichihara K, Itoh Y, Lam CWK, Poon PMK, Kim JH, Kyono H, et al. Sources of variation for commonly measured serum analytes among 6 Asian cities and consideration of common reference intervals. *Clin Chem* 2008; 54: 356-65.
- 3) Boyd JC. Cautions in the adoption of common reference intervals. *Clin Chem* 2008; 54: 238-9.
- 4) Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry*. 3rd edition. New York: W.H. Freeman, 1995. p.272-320.
- 5) NCCLS C28-A2: How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory. 2nd edition. Approved Guideline. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
- 6) Harris EK, Boyd JC. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem* 1990; 36: 265-70.
- 7) Lahti A, Hyltoft Petersen P, Boyd JC, Fraser CC, Jorgensen N. Objective criteria for partitioning Gaussian-distributed reference values into subgroups. *Clin Chem* 2002; 48: 338-52.
- 8) Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Libeer JC, Ricos C. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Ann Clin Biochem* 1997; 24: 8-12.