

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460688

研究課題名(和文) 臨床検査分析前変動の系統的再評価とデータ・レポジトリの構築

研究課題名(英文) Systematic re-evaluation and construction of data repository regarding pre-analytical variables of clinical laboratory tests.

研究代表者

清水 慶久 (Shimizu, Yoshihisa)

九州保健福祉大学・その他部局等・教授

研究者番号：80403674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：臨床検査値の分析前変動要因に関する報告の多くは、標準化以前のため相互比較が困難で、分析条件も不完全である。本研究では、主要な変動要因について測定値を標準化して実験を系統的に行うことを計画した。

血清試料の保存温度は、-30、-20、-10、0、4、10、25、37の8条件で検討、-10前後で不安定な項目が多かった。日内変動では、Fe、P等で大きな変化を認めた。体位の影響は、30分間隔で体位変換し5分毎採血で検討した。立位(臥位) 座位で変動する検査では20分の安静が必要と判明した。月経周期変動はHDL-C、Na、TCで認めた。今後より多くの変動要因について分析を続けたい。

研究成果の概要(英文)：There have been a host of reports on pre-analytical variables in clinical laboratory(lab) tests. However, the test results had not been standardized, and the protocols were not comprehensible with inclusion of limited number of experimental conditions and test items. In this study, we planned to build a standardized data repository of experimental results on pre-analytical variables of common lab tests.

As an initial attempt, we have conducted five experiments. Effects of storage temperature (-30, -20, -10, 0, 4, 10, 25, 37 °C) were examined. Most unstable was -10 °C for many tests. Diurnal rhythm was observed prominently in iron and P. Effects of 30-min interval postural changes(PC) were analyzed by every 5-min sampling. For lab tests sensitive to PS, 20 mins was required for stabilization after PC. Menstrual cycle related changes were observed in HDL-C, Na, and TC. Additional experiments are planned to build a data repository truly useful for the practice of evidence-based lab medicine.

研究分野：病態検査学

キーワード：臨床検査医学 臨床検査変動要因解析

## 1. 研究開始当初の背景

臨床検査医学の重要な役割は、病気以外の原因で検査値が変化する要因(検査値の分析前変動要因)を詳細に解明し、その知見を臨床側に伝え、臨床検査実施条件の最適化と検査値の判読を支援することである。

臨床検査の分析前変動に関する知見は極めて多数存在するが、これまで研究者ごとに個別に行われ、断片的で分析条件も不完全なものが多い。また、標準化以前の測定方法による検討データであり統合して取り扱えない。すなわち、分析前変動要因に関する多種多様な実験を、改めて体系的に実施し、しかもその測定値を標準化・調和化可能な形で求め、その情報を広く共有することが求められる。

一方、研究分担者の市原が代表を務めるIFCCの世界規模基準値調査(基準値=健常者の基礎条件の測定値)では、標準化対応検査の測定値を国際認証標準品で標準化、非対応検査は健常者血清パネルの比較測定で試薬間差を調整(調和化)する形で、順次データが蓄積されつつある。また、この基準値情報に質問票から得た個人特性情報(年齢、性別、肥満度、飲酒度、喫煙度、血液型、生理周期、等)を組み合わせることで、基準値の変動要因に関する検査診断エビデンスを、Web上で自在に照会し、その結果を図示できるシステムの開発が計画されている。このような状況から、本研究では分析前変動に関する実験を、改めて体系的かつ詳細な条件設定をして行うが、その測定は、上記世界規模調査と連携して実施する。また、全測定値を標準化・調和化可能となるようパネル血清の値と関連づけて記録すること、実験単位でデータ形式を統一して蓄積(実験結果のレポジトリ化)することで、基準値データベースとの融合を目指す。

## 2. 研究の目的

臨床検査データは、臨床の現場で病気の診断、治療経過のモニター、予後判定に利用される。しかし、検査値の評価を行うにあたり、病気以外の原因で検査値が変化する分析前変動の要因を熟知することは、臨床検査値の正しい判読に不可欠である。

臨床検査の測定値が変化する原因を分類すると、病気による変動(病態変動 pathological variation)、生理学的な現象としての変動(生理的変動 physiological variation)と、測定上の様々な条件の違いで生じる変動(測定技術変動 analytical variation)に分けて考えることができる。後2者は合わせて、分析前変動と総称される。分析前変動に関する研究報告は極めて沢山存在するが、大多数は検査値が標準化される以前の古い時代のデータであり、かつ断片的で統合して取り扱えず、分析条件も不完全なものが多い。

本研究では分析前変動要因に関する実験を、改めて綿密に計画して、より詳細かつ信

頼性の高い結果が得られる条件で体系的に実施する。そこで本研究では、分析前変動要因として、保存温度の検査値への影響、日内リズムの影響、採血直前の歩行・体動・体位(臥位・座位・立位)の影響、さらに、生理周期が検査値に及ぼす影響について調査、解析した。

## 3. 研究の方法

### (1)対象者の募集

20~65歳の健康な人で次の除外基準に合致しない場合参加可能とした。

#### 除外基準

- 1) 貧血があるか、血管が細く採血が困難と予測される人
- 2) やせ BMI<18 kg/m<sup>2</sup>、肥満 BMI>30 kg/m<sup>2</sup>
- 3) HBV, HCV, HIV が陽性と分かっている人
- 4) 妊娠中・産後1年以内の人、または女性ホルモン製剤を服用中の方
- 5) 過度の飲酒習慣のある人(エタノール換算 >70g/日)
- 6) 喫煙量 >20本/日
- 7) 慢性疾患で定期的に薬物治療を受けている人
- 8) 実験当日、医師により体調不良のため参加不適と判定された人

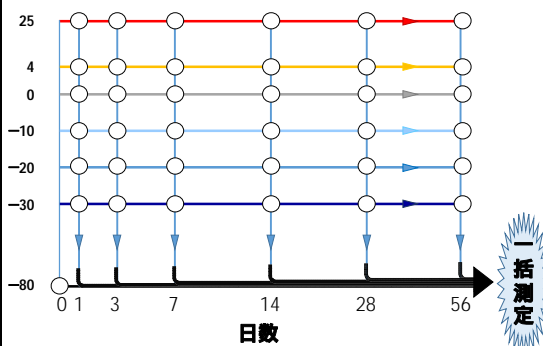
### (2)各実験の詳細

#### 検体保存の影響

##### 1.血清試料成分の安定性

21歳~64歳の健常者7人(男性:5人、女性:2人)を対象とし、男性150ml、女性130mlの採血後、1200g,10分で遠心分離を行った。次に、それらを小分けにしておき、採血直後、1日、3日、7日、14日、28日、56日に全て-80において保存後、全試料を一括測定して保存条件の影響度を分析した(下図)。

なお保存温度の条件は、25, 4, 0, -10, -20, -30, -80とし、対象検査項目はALT, AST, ALP, LDH, GGT, AMY, CK, TG, HDL-C, LDL-C, TBil, C3, C4の13項目とした。なお、各項目の測定は、ベックマンコールター社のAU480を用いた。



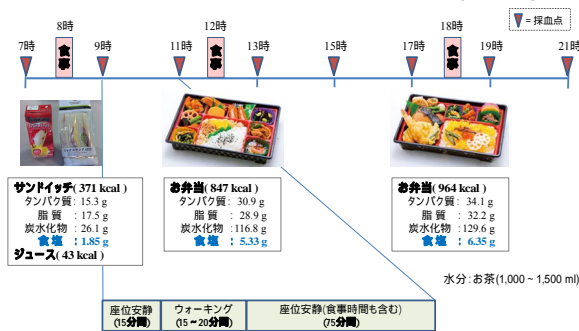
##### 2.全血試料の安定性

21歳~64歳の健常者8人(男性:4人、女性:4人)を対象とし、全血10ml(EDTA-2K採血)を採血後、十分な転倒混和を行い、1ml

ずつ小分けし、それぞれ 25 , 4 , 0 の環境下におく。そして、採血直後、1 日後、3 日後、7 日経過後の 4 時点で測定を行った。測定には自動血球計数測定装置 Pentra XL80 LC-5601J(堀場製作所)を用いた。

### 日内リズムの影響

19~61 歳の健康者(男性 6 名、女性 5 名)を対象とし、7 時~21 時まで 2 時間おきに 20 分間の座位安静の後、各 8.5ml 採血を行った。また、行動様式の違いの日内変動への影響を除外すべく、採血間の 2 時間の行動パターンは全員同じ(15~20 分間の軽いウォーキング以外は座位による作業)とし、かつ、朝・昼・夕食の内容と時間も全員同一とした(下図)。



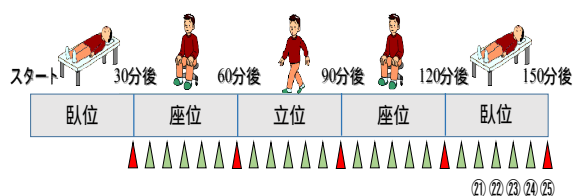
再現性確保のため、同一内容・同一被験者で3週間後に再度実施

測定項目は、酵素( AST, ALT, ALP, LD, GGT, CK, AMY , ChE ) 脂質( TG, TCho, HDL-C, LDL-C ) 電解質( Na, K, Cl, Ca, Mg , IP, Fe ) その他( Glu, TP, Alb, TBil , CRE, BUN, UA , glycoalbumin)、免疫化学( CRP, IgG, IgA, IgM, C3 , C4, Tf, Hp, TTR ) の計 36 項目とした。

各時点で得た血液は、その都度血清分離し、直ちに - 80 に凍結保存し、生化学自動分析装置 AU-480(ベックマン・コールター社)を用いて測定した。

### 採血直前の歩行・体動・体位(臥位・座位・立位)の影響

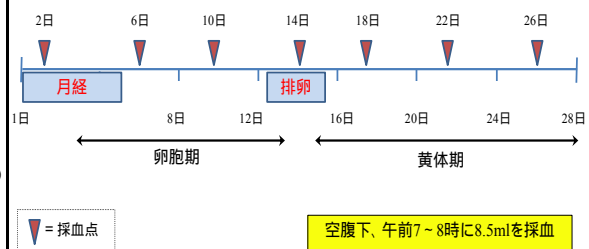
20~65 歳の健康者 7 名(男性 3 名、女性 4 名)を対象とした。図に示す通り、(1) 臥位 30 分後に初期採血を行う。続いて、(2) 座位の姿勢を 30 分、(3) 通常速度(時速 4km)の歩行を 30 分、(4) 座位の姿勢を 30 分、最後に(5)臥位を 30 分間とる。この間、翼状針を留置し、5 分おきに計 25 回、3.5mL 採血を行い、末梢血検査(CBC)用に 0.5mL、生化学検査用に 3mL 分注した。CBC 用試料はその場で測定し、生化学用試料は血清分離後全て - 80 で冷凍保存し、後日全試料を一括測定し、採血直前の歩行・体動・体位影響度を分析した。



測定項目は次の通りである: ALT, AST, LD, CK, Alb, UA, BUN, CRE, TC, Ca, IP, Na, K, Cl, WBC, RBC, Hb, Ht, MCV, MCH, MCHC, PLT. 生化学項目の測定は、ベックマン・コールター社の AU480、CBC の測定には自動血球計数測定装置 Pentra XL80 LC-5601J(堀場製作所)を用いた。

### 生理周期の影響

21~26 歳の健康女性 14 名を対象とした。採血のタイミングは、各個人の生理周期を確認するため、毎朝起床時に口腔で基礎体温(BBT)を測定し約一ヶ月間記録した。このデータをもとに、月経初日を最初の採血日として、卵胞期 3 回、排卵期 1 回、黄体期 3 回の計 7 回行った。採血量は 1 回あたり 8.5 ml とし、各時点で得た血液は、その都度血清分離し、直ちに - 80 に凍結保存した(下図)。



調査開始前の1ヶ月間は、各個人の生理周期を確認するため、毎朝起床時に口腔で基礎体温(BBT)を測定し記録し、採血のタイミングを決定。

各検査項目の測定は、生化学自動分析装置 AU-480(ベックマン・コールター社)を用いた。

なお採血は、前夜 10 時以降絶食の上、朝 7 時 30 分~9 時に安静下で行った。測定項目は、酵素( AST, ALT, ALP, LDH, GGT, CK, AMY , ChE ) 脂質( TG, TC, HDL-C, LDL-C ) 電解質( Na, K, Cl, Ca, Mg , IP, Fe ) その他( Glu, TP, Alb, TBil , CRE, BUN, UA , glycoalbumin)、免疫化学( CRP, IgG, IgA, IgM, C3 , C4, Tf, Hp, TTR ) の計 36 項目とした。

### (3)測定値の標準化

測定期間中は市販コントロールを管理試料として、厳密な精度管理体制をとった。

また、測定値の標準化のため、化学反応検査ならびに免疫比濁測定に対しては、現在世界規模基準値調査で用いている、標準化対応検査項目に対して値付けが行われているパネル血清を用いて、測定値の校正作業を行った。

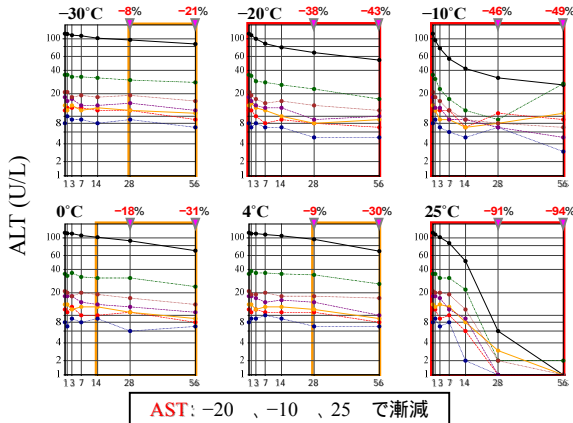
### (4)データ解析

測定値の条件間変動、経時変化の検定は、2 元配置分散分析( two-way ANOVA ) および混合デザイン ANOVA にて行う。

## 4. 研究成果

### 検体保存の影響

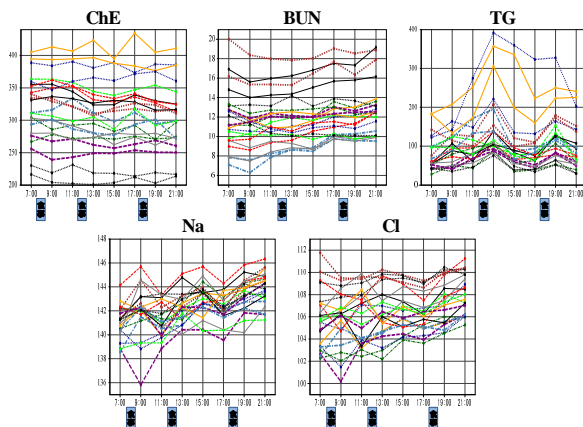
AMY と TG の測定値は、全温度条件において 2 月間安定で変化しなかった。ALP、CK、HDL-C、LDL-C、TBil、GGT の測定値は 4 以下であれば 1 月間安定であったが、その後軽度低下傾向を認めた。一方、25 以下ではいずれも漸減(CK、TBil は強い減少)傾向を認めた。AST、ALT の活性は、-30 以下と 0 と 4 以下では 1 月間安定で、その後軽度低下した(下図)。



それに対して、-10 と 25 以下では活性が明瞭に漸減した。LDH の活性は-20 以下では安定だが、-10、0、4 以下では直線的に減少し、その程度は-10 以下で最も著明であった。一方 25 以下では最初の 2 週間安定であったが以降漸減した。C3 は-80 以下の全温度条件で、明瞭な測定値の漸増を認めた。ただし、1 日目の値は 25 以下の温度では変化しなかったが、25 以下では既に上昇を認めた。

### 日内リズムの影響

2 元配置分散分析により、有意な日内変動を認めたのは、36 項目中 20 項目で、なかでも ChE、BUN、TG、Na、Cl、Fe、Glu、TG で特に明瞭な変化を認めた。また、日内リズムの再現性を確認するため、3 週間後に実施したパターンもほぼ同様であった(下図)。

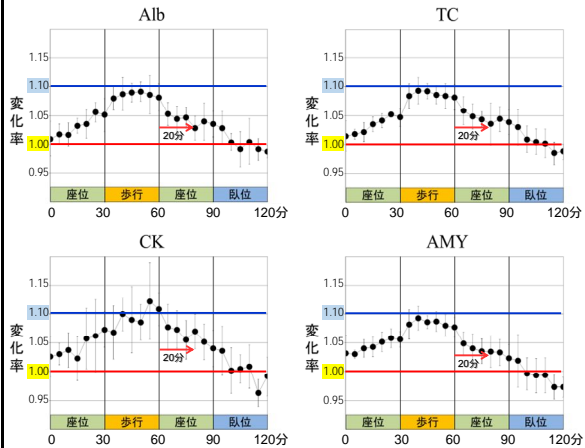


今回認めた主な日内リズムのパターンは、) Glu は、朝・昼よりも夕食後により強く上昇するが、逆に TG では夕食よりも朝食後の

上昇がより明瞭、) TP、Alb、K、Ca、HDL-C は、毎食後一時間目に低下、) BUN、Na、Cl は午前から夜にかけて一定して漸増、) Fe、T-Bil は、午前中高値、夕方以降低値、) IP は、朝 9 時から午後 3 時頃まで低値、それ以降は上昇、などである。これらの変化パターンのうち、) ) は今回行った細かい変動要因の制御により明らかとなった。

### 採血直前の歩行・体動・体位(臥位・座位・立位)の影響

Alb、ALT、AST、LD、CK、TC は臥位に比し、座位と立位で有意に上昇した(下図)。



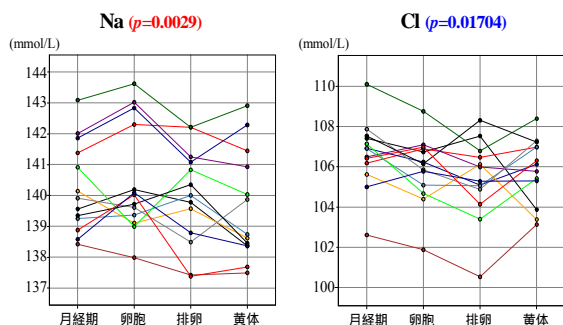
例えば ALT と LDH では、臥位に比し、座位で各々平均 6.5%、12.0%、立位で平均 12.3%、12.9%の上昇がみられた。一方、Ca、RBC、Hb、Ht ではその程度が少なく、およそ臥位に比し、座位で平均 2.7%、立位で平均 6.4%の上昇にとどまった。

これに対して、WBC は臥位に比べ立位で、平均 32%増加した。また、UA、BUN、Na、K、Cl、MCV、MCH、MCHC では体位の影響を全く受けなかった。CRE は他と異なり、臥位と立位の値に差がないが、座位で平均 4.2%低下した。

これら一連の測定値の変化を 5 分間隔で調べると、体位変換後およそ 15~20 分で、測定値がその体位に対して安定化することが明らかとなった。

### 生理周期の影響

2 元配置分散分析により、有意な月経周期変動を認めたのは、36 項目中 7 項目で、脂質代謝にかかわる TC、HDL-C、LDL-C、電解質、Mg、C4 で明瞭な影響を認めた。なかでも特に月経周期の影響が大きかったのは、HDL-C (P = 0.0007)、Na (P = 0.0029)、TC (P = 0.0045) であった。その増減をパターン別にみると、排卵期をピークに増加する TC、HDL-C、C4、卵胞期から排卵期にかけて増加する LDL-C、排卵期に減少する Mg、卵胞期に増加し、排卵期に減少する Na、Cl (下図) 5 つのパターンが確認された。



Naについては、閉経後エストロジェンの急激な低下で上昇することが明らかになっているが、今回のデータからもエストロジェンが低値となる卵胞初期に増加するパターンを認めた。

## 5. 主な発表論文等

### 【雑誌論文】(計 6 件)

1. Kawano R, Ichihara K, Wada T. Derivation of level-specific reference change values (RCV) from a health screening database and optimization of their thresholds based on clinical utility. *Clin Chem Lab Med* in press. (査読有) doi: 10.1515/cclm-2015-1004.
2. Masuda S, Ichihara K, Yamanishi H, Hirano Y, Tanaka Y, Kamisako T on behalf of the Scientific Committee for the Asia-Pacific Federation of Clinical Biochemistry. Evaluation of menstrual cycle-related changes in 85 clinical laboratory analytes. *Ann Clin Biochem* 2015 in press. (査読有) doi: 10.1177/0004563215617212
3. Ichihara K, Yamamoto Y, Hotta T, Hosogaya S, Miyachi H, Itoh Y, Ishibashi M, Kang D on behalf of the Committee on Common Reference Intervals, Japan Society of Clinical Chemistry. Collaborative derivation of reference intervals for major clinical laboratory tests in Japan. *Ann Clin Biochem* 2015; in press. (査読有) doi: 10.1177/0004563215608875
4. Yamakado M, Ichihara K, et al. (11人中2番目) Derivation of gender and age-specific reference intervals from fully normal Japanese individuals and the implications for health screening. *Clin Chim Acta* 2015; 447: 105-114. (査読有) doi:10.1016/j.cca.2015.04.037
5. Shimizu Y & Ichihara K. Sources of variation analysis and derivation of reference intervals for ALP, LDH, and amylase isozymes using sera from the Asian multicenter study on reference values. *Clin Chim Acta* 2015; 446: 64-72. (査読有) doi:10.1016/j.cca.2015.03.034

6. Ichihara K, Ceriotti F, Mori K, Huang YY, Shimizu Y, et al. (19人中1番目, 5番目) The Asian project for collaborative derivation of reference intervals: (2) results of non-standardized analytes and transference of reference intervals to the participating laboratories on the basis of cross-comparison of test results. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(7):1443-57. (査読有) doi:10.1515/cclm-2012-0422.

### 【学会発表】(計 9 件)

1. 清水慶久, 市原清志, 「臨床検査の生理的変動要因に関する系統的再評価 - 月経周期について - 」, 第62回日本臨床検査医学会学術集会, 2015.11.19-11.22, 岐阜都ホテル. (岐阜県岐阜市)
2. 永井美緒, 清水慶久, 木村祥吾, 市原清志, 「5分間隔採血による体位変換の検査値に及ぼす影響の検討」, 第55回日本臨床化学会年次学術集会(JSCC55), 2015.10.30-11.1, 大阪大学コンベンションセンター. (大阪府吹田市).
3. 木村祥吾, 清水慶久, 永井美緒, 市原清志, 「7段階の温度設定による主要13臨床検査に対する血清試料の保存安定性の検討」, 第55回日本臨床化学会年次学術集会(JSCC55), 2015.10.30-11.1, 大阪大学コンベンションセンター. (大阪府吹田市).
4. 永井美緒, 市原清志, 清水慶久, 木村祥吾, 齋藤憲祐, 「微量採血法による末梢血検査の変動要因の検討」, 第55回日本臨床化学会年次学術集会(JSCC55), 2015.10.30-11.1, 大阪大学コンベンションセンター. (大阪府吹田市).
5. Ichihara K. "The IFCC global multicenter study on reference values: its objectives and current status". All Russian Congress of Laboratory Medicine, Oct 1, 2014, in Moscow, Russia. (開会式特別講演)
6. Ichihara K. "Biological variations: essential knowledge for the practice of EBLM". The 11th Philippine Council for Quality Assurance of Clinical Laboratory, Sep 24, 2014, Manila, Philippines. (開会式特別講演)
7. Ichihara K. "Essential knowledge on biological sources of variation for the practice of EBLM". MedLab Asia Pacific 2014 in Singapore, Feb 18, 2014, Singapore. (招待講演)

8. Ichihara K, The strategy and implication of the global study. Symposium: "The IFCC global multicenter study on reference values: An Asian perspective". 13th Congress of Asia-Pacific Fed of Clin Biochem, Oct 29, 2013, Bali, Indonesia. (企画, 演者)

9. Ichihara K, "Course on Multivariate Analysis for EBLM ", Seminar for South African Association for Clinical Biochemistry, Jul 31~Aug 1, 2013, Cape Town, South Africa. (招待講演)

## **6 . 研究組織**

### **(1)研究代表者**

清水 慶久 ( SHIMIZU Yoshihisa )  
九州保健福祉大学・生命医科学部・教授  
研究者番号：80403674

### **(2)研究分担者**

市原 清志 ( ICHIHARA Kiyoshi )  
山口大学・大学院医学系研究科・名誉教授  
研究者番号：10144495