

TG異常高値を示した精度管理試料についての原因究明

市川 めぐみ^{a,b}, 森内 理江^c, 中島 崇行^{b,d}, 佐々木 由紀子^b, 草野 友子^e,
小田 真悠子^e, 柳原 碧^e, 横山 敬子^a, 小西 浩之^e, 杉下 由行^e, 三宅 一徳^e

東京都では、昭和57年度より衛生検査所を対象とした東京都衛生検査所精度管理事業を実施している。本調査において模擬血液試料を作製して配付したところ、生化学的検査項目のうち中性脂肪（TG）で、複数の参加施設から異常高値が報告されたため、原因究明を行った。調製血液に凝固成分として2種類のトロンビン製剤を添加した試料を作製し、TG濃度を測定した。その結果、2種類のトロンビン製剤のうち一方のトロンビン製剤を添加し、かつ添加量が多い場合においてTG異常高値が見られた。次に、このトロンビン製剤を添加した試料、及びこの試料を2倍以上に希釈したものについてTGを測定したところ、希釈したものでは異常高値は見られなかった。更に、このトロンビン製剤を添加した試料について、血中遊離グリセリンを消去する方法と、消去しない方法でTGを測定したところ、後者でTG異常高値が見られた。以上のことから、TG異常高値は、特定のトロンビン製剤に含まれる高濃度グリセリンによって引き起こされた可能性が示唆された。精度管理用試料を調製する際は、使用する試薬中の添加剤が測定に影響を与える可能性があるため、添加する試薬を含め入念な検討を行う必要があると考えられた。

キーワード：衛生検査所、精度管理、ブラインド調査、生化学的検査、中性脂肪、グリセリン

はじめに

衛生検査所は、血液等の人体から排出され、または採取された検体について、生化学的検査等の検体検査（臨床検査）を行うことを業とする場所である¹⁾。現在、多くの診療所や中小病院では、衛生検査所に検体検査を委託し、その結果に基づき診断や予防の方針を決定していることから、衛生検査所の検査精度確保は極めて重要である。そのため、平成30年12月1日に施行された医療法等の一部を改正する法律の改正省令では、衛生検査所に対して精度管理に係る基準を省令で定める旨が明記された²⁾。

東京都では、昭和57年度から東京都衛生検査所精度管理事業を実施しており³⁾、この中で衛生検査所を対象とした精度管理調査を行っている。この精度管理調査は、オープン方式による調査（以下、オープン調査と略す）とブラインド方式による調査（以下、ブラインド調査と略す）を併用していることが特徴として挙げられる。オープン調査は、衛生検査所に調査試料を直接配付し、報告結果を評価するものである。この方法は広く一般的に行われている調査方法であるが、試料の複数回測定や内部精度管理後の最適条件での測定等、通常の検体とは異なる手順で測定が行われる可能性がある⁴⁾。一方、ブラインド調査は、公益社団法人東京都医師会の協力のもと、医療機関から調査試料であることを伏せて臨床検体として衛生検査所へ検査依頼を行い、返却された結果を評価するものである。この方法では、オープン調査と比べて衛生検査所の日常の試験検査の実態をより正確に把握することができる。

と、医療機関から調査試料であることを伏せて臨床検体として衛生検査所へ検査依頼を行い、返却された結果を評価するものである。この方法では、オープン調査と比べて衛生検査所の日常の試験検査の実態をより正確に把握することができる。

医療機関から衛生検査所に検査依頼される血液検体の多くは、遠心分離等の操作を加えられていない採血した血液そのままの状態である。血清を検体とする生化学的検査では、血液検体は衛生検査所へ搬入され、血清分離を経て検査に供される。そこで、ブラインド調査に用いる調査試料は、試料の外観から調査試料であることが判明しないよう模擬血液試料（以下、試料と略す）とする必要がある。そのため、生化学的検査用調査試料では、調査項目が設定した目標値となるようにヒト血球に市販高濃度域コントロール血清を添加した試料を作製している。このようにして調製した試料はフィブリンを欠くため、臨床検体と同様の凝固状態を模倣する目的で、トロンビン製剤及びフィブリノゲン製剤を添加している。

過去のブラインド調査において、生化学的検査項目の一つである中性脂肪（以下、TGと略す）の項目で目標範囲よりも数倍高い値（以下、異常高値と略す）を示す事例が確認された⁵⁻⁸⁾ため、調査の一環として原因究明を目的に実験を行った。

^a 現所属：東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

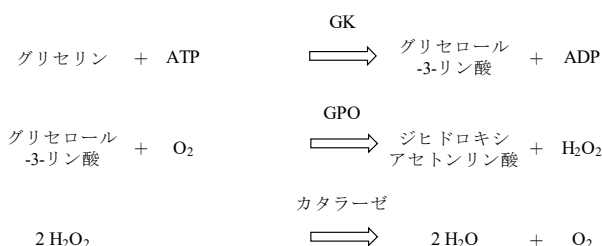
^b 当時：東京都健康安全研究センター精度管理室

^c 東京都健康安全研究センター精度管理室

^d 現所属：東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科

^e 順天堂大学医学部附属浦安病院臨床検査医学科
279-0021 千葉県浦安市富岡2-1-1

第一反応：遊離グリセリンの消去



第二反応：TGの分解

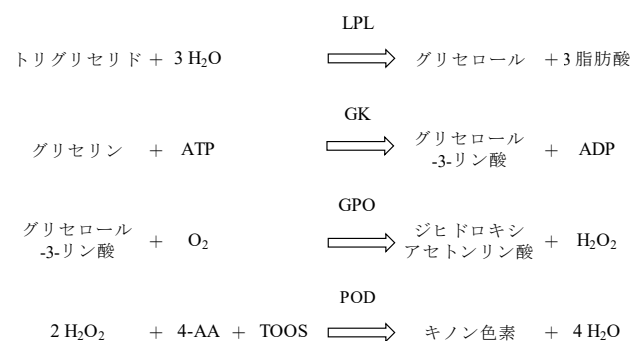


図1. TG測定試薬の測定原理

なお、東京都衛生検査所精度管理事業の生化学的検査の配付試料作製における血液の使用については、東京都健康安全研究センター精度管理調査倫理審査委員会の承認を得ている。

試薬及び機器

1. 試料の調製

試料は、精度管理調査で用いた健常ヒト血液の余剰血液を用いた。抗凝固剤（10%クエン酸Na、またはCPD）を加えた血液を血球と血漿に分離し、血漿にTG濃度があらかじめ設定した目標値となるように高濃度域コントロール血清（QAPトロール2X、シスメックス社製）を添加した。これに生理食塩水で2回洗浄した血球を併せてヘマトクリット値が約40%となるように調製後、生化学的検査用採血管に2 mLずつ分注した。

2. 試薬

1) 血液凝固成分

血液凝固成分として、トロンビン製剤は、トロンビンA（A社製、液剤）及びトロンビンB（B社製、凍結乾燥製剤を生理食塩水で溶解）を用いた。同様に、フィブリノゲン製剤は、フィブリノゲンC（C社製、凍結乾燥製剤をフィブリノゲン溶解液で溶解）及びフィブリノゲンD（D社製、凍結乾燥製剤をフィブリノゲン溶解液で溶解）を用いた。

2) 測定試薬

TGの測定試薬は、実験1及び実験2ではトリグリセライドキットTG-EX「生研」（デンカ株式会社製、以下、生研と略す）、実験3ではコレステスト® TG（積水メディカ

表1. 各種製剤の添加による凝固の有無とTG値

試料No.	トロンビン (μL)		フィブリノゲン (μL)		凝固	TG (mg/dL)
	A	B	C	D		
1	10				-	89
2	20				-	88
3	40				-	606
4	10		20		+	89
5	20		20		+	85
6	40		20		+	576
7	10			20	+	87
8	20			20	+	85
9	40			20	+	595
10		10			-	90
11		20			-	89
12		40			-	89
13		20	10		+	89
14		20	20		+	88
15		20		10	+	88
16		20		20	+	88

：異常高値

ル株式会社製、以下、コレスと略す）及びコレステスト®N TG（積水メディカル株式会社製、以下、コレスNと略す）を用いた。

生研及びコレスの測定原理は消去法である。図1に示したとおり、第一反応で血清中遊離グリセリンを除去する。次に、第二反応でTGを分解し、生じたH₂O₂によりキノン色素を生成し、その吸光度を測定する^{9,10)}。

一方、コレスNの反応原理は非消去法である。この方法は生研／コレスと異なり、第一反応（遊離グリセリンの除去）の工程がない。血清中の遊離グリセリンとTGを併せて分解し、生じたH₂O₂によりキノン色素を生成、その吸光度を測定する¹¹⁾。

3) 検量物質

生研では、脂質キャリブレーションD（デンカ株式会社製）を用いた。コレス及びコレスNでは、セロノルム®・リピッド（積水メディカル株式会社製）を用いた。

3. 測定機器

生化学自動分析装置TBA-120FR（キヤノンメディカルシステムズ株式会社）で測定した。

実験方法

1. 実験1：各種添加製剤がTG測定に及ぼす影響

試料はTG目標値が約90 mg/dLとなるよう調製した。これにトロンビンAのみ10～40 μLを添加（試料No. 1～3）、トロンビンAを10～40 μL及びフィブリノゲンCを20 μL（試料No. 4～6）、トロンビンAを10～40 μL及びフィブリノゲンDを20 μL（試料No. 7～9）、トロンビンBのみ10～40 μL（試料No. 10～12）、トロンビンBを20 μL及びフィブリノゲンCを10～20 μL（試料No. 13, 14）、トロンビンBを20 μL及びフィブリノゲンDを10～20 μL（試料No. 15, 16）をそれぞれ添加した。上記の試料について凝固の有無を確認した後、試料を遠心分離し得られた上清を生研を用いて測定し、TG値を求めた。

2. 実験2：TG異常高値の希釈による影響

試料はTG目標値が約200 mg/dLとなるように調製した。これにトロンビンAを50 μ L及びフィブリノゲンCを50 μ L加え凝固させた。この試料を遠心分離して得られた上清、及びこれを生理食塩水で2～10倍に希釈したものを生研を用いて測定し、TG値を求めた。

3. 実験3：遊離グリセリン量の比較

試料はTG目標値が約180 mg/dLとなるように調製した。これにトロンビンAを10～50 μ L及びフィブリノゲンCを20 μ L、トロンビンBを10～50 μ L及びフィブリノゲンCを20 μ Lをそれぞれ加えた試料、及びいずれも添加しない試料を作製した。これらの試料を遠心分離して得られた上清について、消去法（コレス）及び非消去法（コレスN）の2種類の測定試薬を用い、それぞれのTG値を求めた。

結果及び考察

1. 実験1：各種添加製剤がTG測定に及ぼす影響

試料は、トロンビン及びフィブリノゲン両方を添加した場合に凝固し、トロンビンのみの添加では凝固しなかった（表1）。TG値は、トロンビンAを10 μ L及び20 μ L添加した試料でおおむね目標値となったが、40 μ L添加した試料では、フィブリノゲン製剤の添加の有無にかかわらずTG異常高値を示した。一方、トロンビンBの添加では、添加量及びフィブリノゲン製剤添加の有無にかかわらず、いずれもおおむね目標値を示し、TG異常高値は見られなかった。

トロンビンA及びBの2製品に含まれる試薬中の成分をインタビューフォームで確認したところ、表2に示す成分が含まれていた。試薬の主成分はいずれもウシ血液由来トロンビンで、2製品に共通していた。その他の添加剤では、トロンビンAにはトロンビンBよりも多くの種類の添加剤が含まれていた。トロンビンAは液剤であるため、水溶液中での化学変化や輸送時の振とうによる構造変化を防ぐ目的で、添加剤が使用されている¹²⁾。一方、トロンビンBは凍結乾燥製剤であるため保存安定性が高く、液剤のトロンビンAよりも添加剤の量は少ないと考えられる。実際にトロンビンAは粘稠性があり、一方で生理食塩水で溶解したトロンビンBは水のように流動性が大きい状態であった。トロンビンA中のL-アルギニン、パラオキシ安息香酸メチル及びパラオキシ安息香酸プロピルは製剤の安定

等、塩化ナトリウムや氷酢酸、塩酸、水酸化ナトリウムはpH調整の目的で添加されていると考えられた¹³⁾。上記はトロンビンAが液剤であるために添加されていると考えられるが、これらの成分は反応原理から反応系に大きな影響を与えるとは考え難い。そこで、共通して添加されているグリセリンに着目すると、トロンビンAは濃グリセリン、トロンビンBはグリセリンとなっていた。この表記の違いと、トロンビンAの粘稠性のある性状から、トロンビンAのグリセリン濃度がトロンビンBよりも高いと仮定すると、トロンビンAを40 μ L加えたときに測定原理の第一反応でトロンビン製剤中のグリセリンを除去しきれず、第二反応で試料中のTGとグリセリンを併せて測定したため、TG異常高値の原因になったと推察した。

2. 実験2：TG異常高値の希釈による影響

実験1で試薬中のグリセリンがTG測定に影響を与えたと推察されたことから、実験2ではトロンビンA及びフィブリノゲンCを加えた試料について希釈を行い、TG測定値の変化を調べた（図2）。

その結果、未希釈の試料ではTG異常高値を示したが、2～10倍希釈のいずれでもTG値はおおむね目標値となった。2倍希釈及び3倍希釈については5回測定を行って確認したが、異常高値となるものはなかった。なお、図2のTG値は、未希釈試料は測定値、希釈試料は測定値に希釈倍数を乗じて算出した値を用いた。これは、実験1で推察した、第二反応にてトロンビン製剤中のグリセリンが、試料のTGと併せてTG値として測定されたことの裏付けとなると考えられた。

3. 実験3：遊離グリセリン量の比較

本邦における日常検査のTG測定系は、日本臨床化学会（Japanese Society of Clinical Chemistry：JSCC）勧告法に準拠した消去法が普及している¹⁴⁾。一方、諸外国では非消去法が主流であるため、国際標準化の観点から国内でも非

表2. トロンビンA及びトロンビンBの成分

	トロンビンA（液剤）	トロンビンB（凍結乾燥製剤）
主成分	ウシ血清由来トロンビン	ウシ血清由来トロンビン
添加剤	濃グリセリン L-アルギニン 塩化ナトリウム 氷酢酸 塩酸 水酸化ナトリウム パラオキシ安息香酸メチル パラオキシ安息香酸プロピル	グリセリン 水酸化ナトリウム

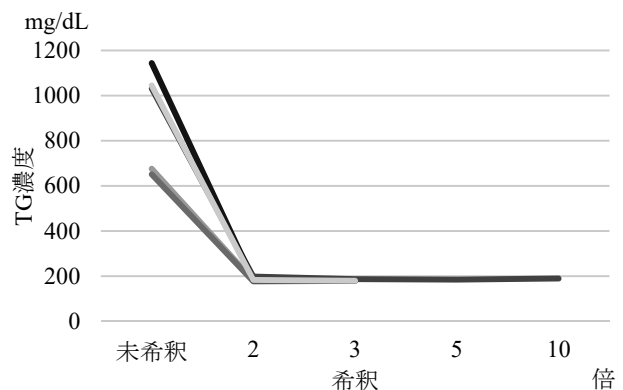


図2. トロンビンAを添加した試料の希釈による影響
未希釈の血清と2倍、及び3倍希釈したものは5回測定した。なお、希釈試料のTG値は測定値に希釈倍数を乗じて算出した値を用いた。

消去法の標準化が検討され、一部のメーカーでは非消去法の試薬についても開発を進めている^{15,16)}。そこで、同一メーカーから販売されている消去法のコレス及び非消去法のコレス N の 2 測定試薬を用い、トロンビン製剤 2 種をそれぞれ添加した試料での TG 値を求めた。トロンビン A を添加した試料、トロンビン B を添加した試料及びいずれも添加しない試料についてそれぞれ 10 回測定し

(n=10)、その平均値をプロットした(図 3)。

トロンビンを添加しない試料での TG 値は、コレスでは 173 mg/dL、コレス N では 178 mg/dL でおおむね目標値を示した。トロンビン A を 10 μ L 添加した試料では、コレスは 177 mg/dL と、トロンビンを添加していない試料と同程度の TG 値を得た。一方、コレス N では TG 値 1,544 mg/dL と異常高値を示した。トロンビン A を 20 μ L 添加した試料では、コレス、コレス N とも異常高値となったが、コレスの TG 値が 451 mg/dL に対してコレス N では 1,377 mg/dL であった。更に、トロンビン A を 30 μ L 以上添加した試料では、2 試薬での TG 値はいずれも 1,000 mg/dL を超えた。一方、トロンビン B を添加した試料では、いずれの試料でもトロンビンを添加しなかった試料と同様、コレスでは 165~170 mg/dL、コレス N では 170~176 mg/dL でおおむね目標値どおりであった。トロンビン B 10 μ L~50 μ L に含まれるグリセリンは、試料の TG 値に影響を与えない程度の量であったため、トロンビン B を添加した試料ではコレスとコレス N での TG 値に差が生じなかったと考えられる。この結果は、コレスとコレス N の性能評価で試料中の遊離グリセリン濃度の差により両者の測定値に差が生じたとする山本らの報告¹⁷⁾と一致する。

臨床では、脳圧降下剤等のグリセリンを含む補液を静脈注射により投与された患者血清で非常に高い TG 盲検値が報告されており¹⁸⁾、測定試薬の添付文書でも脳圧降下剤投与時の血清では TG 異常高値を示し得る旨が記載されている⁹⁻¹¹⁾。一方、本実験で使用したトロンビン製剤は、外科領域で局所の出血を止めることが本来の用途であるため、インタビューフォームにはトロンビン製剤の添加剤が臨床検査結果に及ぼす結果については記載されていない。測定

試薬の添付文書でも、動物血清や他の物質の添加等により目的の測定結果が得られないとの記載に留まっている⁹⁻¹¹⁾。つまり、精度管理用試料の調製に用いることまで想定されていない。今回の実験では、精度管理調査で試料が原因と考えられる TG 異常高値の原因究明を行ったが、同様に TG 以外の項目についても、試料作製時に使用した試薬が測定に影響を与えることを否定できない。信頼性確保を目的とした精度管理試料の作製にあたっては、使用製剤の有効成分だけでなく添加剤にも留意し、注意深い検討を行う必要がある。そして、精度管理調査で外れ値を示す参加施設が出た場合は、参加施設での精度管理の不備の他、精度管理試料自体の要因も考慮する必要があると考えられた。

ま と め

東京都が実施している東京都衛生検査所精度管理事業のブラインド調査で、生化学的検査項目の一つである TG で設定値を超える異常高値を示す事例が確認されたため、原因究明のための実験を行った。

実験の結果、精度管理試料の作製で使用したトロンビン製剤 2 種のうち、トロンビン A を添加した試料で TG 異常高値となることが判明した。トロンビン A 及び B の 2 製剤にはグリセリンが添加されていたが、トロンビン A ではトロンビン B より多く含まれていたと示唆された。TG 測定試薬の原理に、血清中に微量に含まれるグリセリンを消去する工程があるが、この工程でトロンビン A に含まれるグリセリンを消去しきれず、TG 異常高値となったと推察した。

信頼性確保を目的とした精度管理試料の作製では、使用製剤の添加剤にも留意した十分な検討が必要である。また、精度管理調査では外れ値を示す参加施設が出た場合、精度管理試料の影響も考慮する必要があると考えられた。

付 記

本研究の一部は第 57 回全国衛生化学技術協議会年会、2020 年 11 月、において発表した。

文 献

- 1) 臨床検査技師等に関する法律、昭和 33 年 4 月 13 日法律七十六号。
- 2) 厚生労働省医政局長：医政発 0810 第 1 号、医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行について（通知）、平成 30 年 8 月 10 日。
- 3) 東京都福祉保健局医療政策部：令和 2 年度第 39 回東京都衛生検査所精度管理事業報告書。
- 4) 高木 康：モダンメディア、64, 147-154, 2018。
- 5) 東京都福祉保健局医療政策部：平成 22 年度第 29 回東京都衛生検査所精度管理事業報告書。
- 6) 東京都福祉保健局医療政策部：平成 23 年度第 30 回東京都衛生検査所精度管理事業報告書。

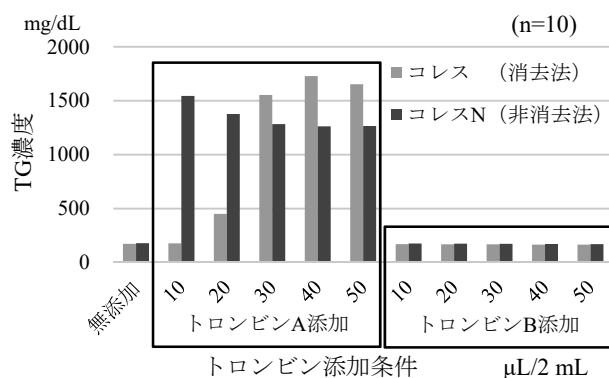


図3. 無添加試料、トロンビンA添加試料、及びトロンビンB添加試料のTG値の比較

- 7) 東京都福祉保健局医療政策部：平成28年度第35回東京都衛生検査所精度管理事業報告書。
- 8) 三宅一徳, 三井田孝, 佐々木由紀子, 他：臨床病理, **60**(suppl), 234, 2012.
- 9) デンカ株式会社：トリグリセライドキットTG-EX「生研」添付文書（2020年4月作成, 第1版）。
- 10) 積水メディカル株式会社：トリグリセライドキットコレステスト®TG添付文書（2017年1月改訂, 第11版）。
- 11) 積水メディカル株式会社：トリグリセライドキットコレステスト®N TG添付文書（2017年2月改訂, 第2版）。
- 12) 伊豆津健一：薬剤学, **72**, 353-358, 2012.
- 13) 日本医薬品添加剤協会安全性委員会：医薬品添加物の安全性（非臨床）に係る手引き－規制情報並びにQ&A－, 平成28年10月3日発行.
- 14) 金原出版株式会社：臨床検査法提要改訂第35版, 1447-1455, 2015.
- 15) 栢森裕三, 河野弥季：臨床検査, **60**, 1444, 2016.
- 16) 山本 肇, 佐竹奏一, 二本柳洋志, 他：医学検査, **65**, 209, 2016.
- 17) 山本 肇, 友野愛花, 齋川健志, 他：生物試料分析, **41**, 205-212, 2018.
- 18) 園田信五, 加藤淳子, 春日信司, 他：臨床検査, **27**, 809-811, 1983.

Investigation of the Cause of Unexpectedly High TG Values in Quality-Controlled Samples

Megumi ICHIKAWA^a, Rie MORIUCHI^a, Takayuki NAKAJIMA^a, Yukiko SASAKI^b, Tomoko KUSANO^a,
Mayuko ODA^a, Midori YANAGIHARA^a, Keiko YOKOYAMA^a, Hiroyuki KONISHI^a and Kazunori MIYAKE^c

The Tokyo Metropolitan Government has assessed the quality of commercially-registered clinical laboratories using external quality surveys since 1982. The survey uses artificial whole blood samples for a biochemical survey. When the sample was distributed to the clinical laboratories, some unexpectedly high triglycerides (TG) values were reported by participating laboratories ; we conducted a series of tests to investigate the cause of these unexpected values. Sample TG concentrations were assessed by adding two types of thrombin reagents, as coagulation components, to the prepared blood. As a result, an unexpectedly high TG value was observed in the sample in which one of the two types of thrombin was added. Next, this abnormal reaction of the thrombin-added samples disappeared at two times dilution. Furthermore, for the sample in which this thrombin was added, TG was measured using two methods: eliminating free glycerin and not eliminating free glycerin. As a result, the non-elimination method showed an abnormally high TG value. Therefore, we suggest that the unexpected high TG value may have been caused by the high concentration of glycerin contained in this thrombin preparation. When preparing a sample for quality control, since the additives of the reagents can affect the measurement, it is necessary to carefully evaluate the reagents set to be added.

Keywords: commercial registred clinical laboratory, external quality survey, blind survey, biochemical blind survey, triglyceride, glycerin

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out

^c Juntendo University Urayasu Hospital
2-1-1, Tomioka, Urayasu-shi, Chiba 279-0021, Japan