

第16回科学技術委員会技術セミナー

免疫化学検査の異常データの解釈と対応の仕方

— 科学技術マニュアル第14集（2015）より —

日時：平成27年10月8日（木）

18：00 - 20：30

場所：パシフィコ横浜 会議センター

日本臨床検査自動化学会 科学技術委員会

第16回科学技術委員会技術セミナー

日 時：平成27年10月8日（木）18時～20時30分

場 所：パシフィコ横浜 会議センター

参加定員：150名（学会HPより事前予約してください）

テキスト：学会HPのセミナーテキストを各自プリントしてご持参ください

参加費：大会登録料に含まれます（当日第47回大会の登録手続きをお願いします）

修了証：会員の希望者のみに発行します

テーマ：免疫化学検査の異常データの解釈と対応の仕方

司会・進行：池田 勝義（熊本大学医学部附属病院中央検査部）

大久保 滋夫（東京大学医学部附属病院検査部）

澤部 祐司（千葉大学医学部附属病院検査部）

18:00～18:10

導入（司会者から）

18:10～18:50（質疑応答 5分を含む）

1. 免疫化学検査の異常データの解釈と対応 ……………1

阿部 正樹（東京慈恵会医科大学葛飾医療センター 中央検査部）

18:50～19:15（質疑応答 5分を含む）

2. 検査での異常事例と対処法 その1 ……………10

—自動分析装置から見出された異常値の解析—

亀子 光明（群馬パース大学 保健科学部 検査技術学科）

19:15～19:25 休憩

3. 検査での異常事例と対処法 その2 ……………15

—マクロエンザイム・HAMAと自己抗体の鑑別を中心に—

森山 隆則（北海道大学大学院 保健科学研究所）

19:50～20:15（質疑応答 5分を含む）

4. 検査での異常事例と対処法 その3 ……………20

—検査室で出来る異常反応の気づきと解析方法—発生機序考察まで—

井本 真由美（近畿大学医学部附属病院 中央臨床検査部）

20:15～20:30

総合質疑・まとめ

免疫化学検査の異常データの解釈と対応

阿部 正樹（東京慈恵会医科大学葛飾医療センター 中央検査部）

1. 免疫化学検査の特徴

免疫化学検査の特徴として、①高い特異性、②広い測定レンジ、③近年の全自動測定と測定時間の短縮がその長所としてあげられる。一方で、①交差反応の存在、②地帯現象の存在、③非特異反応の存在、④他の試薬と比較して Lot 間差が発生しやすい、⑤反応の可視の確認が難しいといった問題点がある。

2. 免疫化学検査に干渉を及ぼす要因

1) 測定対象物質との構造類似物質の交差反応

(1) ホルモン、薬剤

測定対象物質と構造が類似する物質が存在する場合、交差反応の発生により偽高値が発生することがある。代表的な生体物質の例として hCG と LH、ACTH とその前駆物質や分解産物などがあるが、抗体の選別により近年のこれらを測定する non-RIA 系試薬での交差反応はほぼ抑えられている。一方で現在も問題となるのが投与薬剤やその代謝産物との交差反応であり、コルチゾールと各種ステロイド剤¹⁾、一部の E2 測定試薬での E2 とステロイド製剤代謝物、一部の GH 測定試薬での GH と GH 受容体拮抗剤、一部の FT3 測定試薬での FT3 とジクロフェナクナトリウムやメフェナム酸製剤といった事例がある。交差反応性の程度は試薬に用いる抗体に依存するため試薬ごとに異なる。

(2) NCA-2

腫瘍マーカーの交差反応として NCA-2 (Nonspecific cross reacting antigen-2) の CEA 測定試薬との反応があげられる。CEA には幾つかの遺伝子ファミリーが存在するが、分子量約 170kDa の NCA-2 は糖タンパク質で胎児便に多く含まれ、成人の消化管でも産生される場合がある。CEA (分子量約 180kDa) と構造が非常に類似していることから、CEA 測定試薬によっては CEA と同様に測定される²⁾。これは各々の試薬に用いられている抗体が異なることによるもので、抗体ごとに CEA 遺伝子ファミリーとの反応性が異なる。そのため、NCA-2 との反応性がある試薬では NCA-2 保有者は明確な異常がないにもかかわらず CEA が高値となる場合がある。現在市販の試薬で NCA-2 との反応性のある試薬は Cobas、AIA、ARCHITECT、HISCL、反応性の低い試薬はルミパルス、UniCel、スフィアライト、Centaur がある。特に NCA-2 の交差反応が問題となるのは紹介患者等の持参データと自施設の結果が異なる場合であり、その際は紹介元と自施設の CEA 測定試薬を確認する必要がある。なお、NCA-2 の出現頻度は比較的高頻度であり、筆者らがランダムに集めた AIA での CEA 値が 10ng/ml 以上を示す検体 50 件をルミパルスで測定した際にも 3 例の乖離例が確認された。このような乖離例は NCA-2 である可能性が高く、異常がないにもかかわらず CEA が上昇するケースでは NCA-2 の存在を疑う必要がある。NCA-2 の同定はブロッティング法等でおこなわれるため容易ではないが、測定値の比較によりあ

る程度の推察は可能である。また、NCA-2 に関してはその臨床的意義は定まっていながらも近年直腸癌の再発症例での有用性に関する報告が幾つかなされている³⁾。

2) 測定対象物質の構造の多様性や不均一性

同一項目であるにもかかわらず、血中に複数の分子量の様式が存在する場合にも測定試薬によって測定値の乖離を生ずる場合がある。代表的な項目として CA19-9 は血中で複数の抗原糖鎖が巨大なムチン様蛋白分子の表面に露出した形で存在するが、その分子量は約 400kDa から約 2,000kDa と幅広く不均一である。このなかで癌由来の CA19-9 は高分子量が多いが、逆に良性疾患の多くは低分子量である。このような CA19-9 の血中での不均一な存在と測定試薬ごとの反応特性の相違が測定値乖離の一因となっている⁴⁾。さらに肝疾患では酸性の緩衝液を用いた RIA 法の測定値と比較して、中性付近の緩衝液を用いた non-RIA 法の測定値が高値になることが指摘されてきた。これは試薬の pH が異なることにより反応性が異なることに依存しており、酸性の緩衝液を用いた一部の non-RIA 試薬では RIA 法と同様な測定値傾向を示している。そのほかにも複数の分子量の様式が存在する項目には PSA、IV型コラーゲン、抗原性の異なる分画が存在する SCC などがあるが、PSA は試薬間の測定値のバラツキが 1992 年以降の各社の試薬改良により大幅に改善された。

3) 測定装置や試薬の状態が関与

種々の要因があるが、なかでもパーマネントプローブを用いた測定機器での腫瘍マーカーなど超高値検体の後の検体へのキャリーオーバーや、感染症検査検体では HBs 抗原濃度が $5 \times 10^6 \text{ng/mL}$ の陽性検体から $0.0001 \mu\text{L}$ の血清が陰性検体に混入しただけでも陽性になるとの報告もあり⁵⁾ 検体汚染も考慮する必要がある。

4) 試薬の構成成分が関与

免疫化学検査試薬の主成分として抗原検出系に用いられる抗体はその由来動物や純度とアフィニティの強さなどにより、交差反応や反応不良を生じることがある。また、抗体検出系での抗原についてもその純度と由来が重要であり、近年広く用いられているリコンビナント抗原では大量に分子量の大きな蛋白質が得られるといったメリットがある反面、合成大腸菌などの宿主由来の夾雑物が混入し偽陽性反応を引き起こすこともある⁶⁾。一方で抗体や抗原以外の成分についても、ブロッキング剤、緩衝液、界面活性剤、担体など多種多様なものが試薬中には存在しており、これらの物質と反応する生体物質が血中に存在する場合、その反応が非特異反応となり異常データとして現れることがある。

5) 検体中の成分の干渉

(1) 異好抗体

抗原検出系の試薬に用いられている抗体はその多くがマウスモノクローナル抗体であり、この抗体と結合し非特異的な反応を起こす血中の抗体（異好抗体）が HAMA (human anti-mouse antibody)⁷⁾ と呼ばれている。HAMA に代表されるヒトの抗動物抗体は、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシなどに対する抗体も確認されており、これらの動物由来の蛋白を用いた試薬では同様に非特異反応が生ずる場合がある。また、異好抗体保有者のもつ抗体が反応する動物種は一種類とは限らず、複数の動物に対する抗体をもつことも多い。HAMA の産生要因は、当初米国で広く用いられていたマウスモノクローナル抗体による癌のミサイル療法により獲得されるケースが多く報告されていたが現在ではその割合は少なく、免疫応答性の HAMA として動物飼育など動物との度重なる接触、輸血、臓器移植、

妊娠、手術後、サプリメントの長期投与、過去のワクチン接種、薬剤投与などがあり、自発的 HAMA として、ウイルス・細菌・寄生虫などの感染、肝疾患や自己免疫性疾患などがあり、手術後に一過性に産生されるケースもある。そのほか、筆者らの経験した事例として、癌の免疫細胞療法後に元々わずかにあったであろう HAMA が増加し、CEA の異常データを生じた症例もあり⁸⁾、治療機会が増加している免疫細胞療法実施患者にも注意が必要である。また、我が国における HAMA の保有頻度は、マウス全血清と反応するタイプが 10.6%でそのうち IgG、IgM 型はそれぞれ 4~6%程度、さらにマウス IgG の F(ab')₂ 分画と反応するタイプが 3.5%で IgG 型が多いとの報告があり⁹⁾、比較的高い頻度で HAMA を有することが確認されている。しかし、HAMA の血中含有量や認識部位の関係、試薬側での防止策などによりこれらすべてが異常データに結び付くわけではない。

HAMA の結合はマウスモノクローナル抗体の Fc 部分に結合することが多い。一方でマウスモノクローナル抗体の超可変領域であるイディオトープとのみ結合する抗イディオタイプ抗体やフレームワーク領域とのみ反応する HAMA などがあり、これらの HAMA は試薬中に添加された非特異反応阻止用の吸収剤も無効であり、吸収処理を行うためには試薬に使用しているモノクローナル抗体そのものを用いる必要がある¹⁰⁾。なお、Fc 部分を認識する HAMA に対しては市販の吸収剤は有効である。

(2) 測定対象物質に対する自己抗体

抗核抗体などの自己抗体は加齢によりその出現頻度が増加するといわれているが、筆者らの CEA の自己抗体に関する検討においてもその傾向が示されていた¹¹⁾。これらの自己抗体が原因となる異常データも多数報告されており、具体的な項目としては CEA¹¹⁾、PSA¹²⁾、CA125、SCC、TSH¹³⁾、FT3、FT4、プロラクチン (Prolactin : PRL)、サイログロブリン (Thyroglobulin : TG)、インスリンなどがある。このなかで抗 TG 抗体や抗インスリン抗体は発生頻度も高く、臨床的な意義も明らかになっていることから通常の検査項目として測定されているが、これらも TG やインスリンの測定系に干渉を及ぼす。また、PRL とその自己抗体が結合したマクロ PRL や同様に生成されるマクロ TSH については、生物学的活性がないにもかかわらず高値を示すことから誤った結果の評価を招くことが問題となる。一方でそれ以外の特に腫瘍マーカーの自己抗体と疾患の関連性に関しては、明確な結論には至っていないのが現状であり、干渉による異常データにより臨床診断を誤らせかねないことが問題となる。われわれが測定値に干渉を及ぼす CEA、PSA、SCC、FT3、PRL、TG の 6 項目に対する自己抗体保有症例の検討を行った結果、いずれも免疫グロブリンクラスは IgG であり、これら干渉を及ぼす自己抗体は IgG が主であると考えられた。IgG と項目抗原の結合の結果として、血中での免疫複合体形成による項目抗原の高分子化が確認されており、ゲル濾過による自己抗体解析の際のひとつの指標となる。

自己抗体保有症例の測定値への干渉については、その項目の特性により偽低値を呈する場合と偽高値を呈する場合の双方があり、PSA、CEA、TG のように測定対象物質のエピトープが免疫複合体形成によりマスクされるため、反応が阻害され偽低値を呈するケース。マクロ PRL やマクロ TSH のように免疫複合体形成による高分子化のため、体内クリアランスが低下し血中での残存期間が長くなり¹⁴⁾ 偽高値を呈するケース。さらには、FT3 測定系の抗 T3 抗体のように自己抗体そのものの測定系への関与により異常値が発生するケースに 3 分類される。

(3) 異常蛋白、RF など

異好抗体や自己抗体以外の生体成分では、異常蛋白である M 蛋白、クリオグロブリンやリウマトイド因子 (RF) が異常データをもたらす。これらは特にホモジニアスな系である汎用機で問題となることが多い。汎用機では免疫比濁 (Turbidimetric immunoassay : TIA) 法とラテックス凝集免疫比濁 (Latex immunoassay : LIA) 法が用いられるが、特に TIA 法試薬には乳糜の解消や反応の促進、さらには非特異反応の防止のために PEG をはじめとする水溶性のポリマーや界面活性剤、塩類などさまざまな物質が添加されている。このなかで PEG はその添加濃度は高いと反応は促進されるがブランク値の上昇につながり、さらに高すぎると測定対象物質が凝集するため、塩類を添加することで影響を最小限に回避している。PEG と異常蛋白の非特異反応は、M 蛋白や RF が試薬中の PEG と反応し非特異的な混濁や不溶性の沈殿物を生じることによる。

RF が原因となる非特異反応には、ヘテロジニアスな測定系で HAMA としての干渉を及ぼす場合もある。RF と HAMA の関連性については、RF がヒト抗ヒト抗体である一方で HAMA はヒト抗動物抗体としてその反応性はオーバーラップしており、特に RA 患者の有する RF は HAMA 活性と RF 活性双方に反応を示すケースがある。

(4) フィブリン、マイクロフィブリン

マイクロフィブリンとは採血後の放置時間が短い場合や遠心の条件によって発生する微細なフィブリンであり、固相に結合し偽高値の原因となることがある。マイクロフィブリンの影響を回避するためには採血管の添付文書に従った使用が必要であり、採血後に採血管を確実に転倒混和し遠心まで決められた時間をおく必要がある。また、遠心時間を長めにすることや子検体分注、再遠心も防止効果がある。

(5) 乳糜

ホモジニアスな系では検体の乳糜が影響を及ぼす場合がある。乳糜の影響には TIA 法における偽高値や偽低値、LIA 法による梅毒抗体検査での偽陽性などがあるが、脂質による濁りを除去するために TIA 法試薬にはリポプロテインリパーゼや界面活性剤が添加されている。一方、LIA 法による梅毒抗体検査の乳糜による影響に関しては、TPLA、RPR 法双方の試薬での偽陽性が指摘されており、報告では人工的に作成した乳糜血清と実際の乳糜血清のいずれを用いてもその結果は一定ではなく、濁度の影響だけではなく試薬成分と脂質の反応などラテックスの非特異的な凝集が関与している可能性も指摘されている¹⁵⁾。

(6) 採血管に起因する異常データ

凝固促進剤、管壁への血液吸着を防止する内壁塗布剤、分離剤など、分離剤入り採血管の成分が関与する異常データがある。凝固促進剤にはトロンビンなどの蛋白やシリカ微粒子などが用いられるが、検体中にこの蛋白に対する抗体が存在する場合にはその複合体が LIA 法でのラテックス粒子との非特異的な凝集の原因となり異常データを呈する。また、シリカ微粒子については微粒子そのものがラテックス粒子に吸着し、ラテックス粒子の非特異的な凝集を引き起こした事例が報告されている。一方、内壁塗布剤である水溶性シリコンが関与する LIA 法での CRP 測定系における異常低値や LIA 法のフェリチン測定系における偽低値などがある。このフェリチンの偽低値は、塗布剤の干渉によりラテックス粒子に物理吸着されている抗体が剥離することが原因となっており、ラテックスと抗体との結合を物理的吸着から化学的吸着に変更することにより回避されている。なお、分離剤で

は血中薬物の分離剤への吸着による偽低値が知られているが、ほかにも血清中のリポ蛋白と分離剤とラテックスが複合的に反応し PSA 偽高値を招いた事例もある。

(7) 投与薬剤の影響

交差反応以外にも薬物が異常データに関与することが確認されている。胃粘膜保護剤であるスクラルファートの長期投与で CA19-9 測定値が偽高値を呈した事例では、本剤内服により消化管上皮細胞でのシアリル Lea 抗原が産生誘導されたことが原因ではないかと考えられている。また、同じく CA19-9 の事例として、スルホニル尿素製剤投与後の上昇事例もあり、これはルイス酵素の変異が原因とされている。その他にも男性用の飲む円形脱毛症治療薬であるフィナステリド服用により PSA 値が低下することが知られている。

ホルモンについては、甲状腺ホルモンにおいてイソジン、アミオダロンなどのヨード剤や炭酸リチウム、糖質コルチコイドなどでの合成・分泌が抑制され血中濃度が低下し、リファンピシン、カルバマゼピン、フェニトインによっても代謝亢進による血中濃度の低下が生じる。また、インスリンのアナログ製剤は超速効型と持続型によって構造が異なるため試薬ごとの反応性が異なり血中の活性が測定結果に反映されない可能性もあるため、外因性のインスリンの評価に関しては自施設の測定試薬の傾向を把握しておく必要がある。

3. 測定試薬での非特異反応の回避策

(1) 測定原理の選択

競合法による FT3 測定系では自己抗体である抗 T3 抗体が標識 T3 抗原と反応することにより偽高値を呈する場合がある。この現象の回避には 2 ステップ法が有効である。2 ステップ法であれば固相抗体と検出物質を反応させた後に洗浄操作が行われるため、自己抗体を含む血清成分が洗い流され標識抗原と自己抗体が反応することはない。また、1 ステップ法に用いられているディレイドアッセイも極力血清成分と標識物質の接触を少なくするために工夫された方法である。なお、2 ステップ法の別なメリットとして、1 ステップサンドイッチ法において発生するプロゾーン現象の回避もあげられる。そのほか、LIA 法ではラテックスの粒子径により反応量が異なるために測定結果にも影響を及ぼしかねないことから、複数経の粒子を混合するなど最適な条件が選択されている。

(2) 非特異吸着の回避

EIA 法や LIA 法では固相や担体さらには反応容器の表面への検体中成分の吸着を回避するためにブロッキング剤がコーティングされている。吸着成分にはフィブリンや免疫グロブリンなどの蛋白があり、ブロッキング剤には BSA、カゼイン、その他の動物血清、糖類などが用いられている。

(3) 使用抗体の工夫

既述の通り異好抗体は抗体の Fc 部分に結合することが多いため、試薬に用いられる抗体は Fc 部分をペプシン処理により切断し、F(ab')₂ フラグメントとして用いてきた。しかし、この方法では抗体のアフィニティが低下することもあり、すべての試薬の抗体にこの方法がとれるわけではない。そのため遺伝子組み換え技術により新たに抗体そのものを作り変えたキメラ抗体が用いられるようになってきた。このキメラ抗体は抗体の約 75% の定常領域はヒト由来で残りの可変領域はマウス由来の抗体である。すなわち抗原を認識する部分だけがマウス由来であり、非特異反応の多い部分はヒト由来であることから非特異反

応を回避するものである。

(4) 吸収剤の添加

非特異反応物質そのものを直接抑制する方法として各種の吸収剤が試薬に添加されている。代表的なものに HAMA などの異好抗体に対する吸収剤があり、マウスなど各種動物血清、マウス腹水などが用いられている。この HAMA 吸収剤は市販もされている。また、HAMA 以外の吸収剤については、抗 AL-P 抗体に対する不活性化 AL-P やフィブリン対策のためのヘパリンなどを添加することもある。なお、これらの吸収剤による回避策を施しても検体中の原因物質の含有量が吸収能を上回るために吸収しきれない場合や、吸収剤が原因物質と結合できないなど、万全ではないことを認識しておく必要がある。

(5) 還元剤や塩類の添加

TIA 法や LIA 法などのホモジニアスな系で試薬成分に対する抗体の影響を回避するために R1 試薬中に塩類などの物質を添加することがある。前述の吸収剤を用いない理由は現実的な問題として HAMA 吸収剤が高価であるといった経済的な理由による。

4. 非特異反応発見の糸口

筆者が約 10 年余りにわたる慈恵医大附属病院で経験した感染症を除く非特異反応ならびにその疑い症例全 24 例についてその発見のきっかけを調査したところ、第 1 位は「臨床医からの指摘」であり、約半数を数えた。また、それに次ぐのは「他の測定方法との結果不一致」であり全体の 25% を占める。これは試薬検討や研究用に日常検査とは異なる方法で測定を行ったときに発見し得た事例である。以上のように全体の約 7 割が実際の日常検査の一連の流れではなくそれ以外の要因で発見し得たことから、いかに日常検査のなかで非特異反応を発見することが難しいかが理解頂けるであろう。とはいえ、日常検査の中での発見の糸口を列挙すると以下ようになる。

① 前回値との大幅な測定値の相違、② 年齢・性別からありえない測定結果、③ 異常高値・異常低値、④ 初回測定値と希釈測定値の不一致、⑤ 関連項目の結果との矛盾、⑥ 同一検体での再現性不良、これに前述の⑦ 臨床医からの指摘、⑧ 他の測定方法との結果不一致が加わる。

5. 免疫化学検査における異常データの解析方法について

解析の手順は結果が非特異的な反応によるものなのかを確認し、干渉物質の特定を行う。第 1 段階として患者情報の収集が必要となるが、これは性別、年齢、疾患名、臨床症状、使用薬剤などであり、これらの情報は発見の糸口として解析の重要な情報となる。ここでは抗原検出検査を中心に解析のための確認試験を示すが、詳細は科学技術マニュアル第 14 集をご参照頂きたい。

- (1) 精度管理状況の確認
- (2) 他の測定装置で測定を行う
- (3) 同一機器で測定を行っている他の項目の結果確認
- (4) 汎用機測定の場合のタイムコース確認
- (5) 汎用機測定の場合の試験管内の目視確認
- (6) 希釈試験

多くの場合、原血清で高値を示した異常検体は希釈により原因物質の濃度が低下し、非特異反応の影響が弱まるため直線性に欠ける。このことから HAMA などの干渉を確認するために段階希釈にて実施される。なお、HAMA による偽高値を示しながら希釈直線性が保たれるケースもあり、直線性が良好な非特異反応があることも念頭におく必要がある。

(7) 添加回収試験

簡便かつ有効な非特異反応の確認試験として特に自己抗体の関与を確認する際に有用である。試薬専用の標準物質を原血清に一定の割合で添加し、添加後の測定値の変化を確認する。自己抗体が関与する非特異反応で回収率の低下が確認される。

(8) 免疫グロブリン吸収試験（免疫グロブリン除去）

非特異反応には免疫グロブリンが関与するケースが多いことから、その吸収により異常値が解消されることを確認する。なお、本試験は抗原検出系検査の確認試験として用いられ、抗体検出系の検査には不向きである。

(9) プロテイン G や A による免疫グロブリン吸収

(10) 市販の HAMA 吸収剤など動物血清成分による吸収試験

(11) LIA 法における抗体未感作ラテックス、酵素標識法における標識酵素など試薬成分での吸収試験

(12) PEG 処理

PEG の脱水作用を利用したいわゆる塩析法により免疫グロブリンを非特異的に沈殿・除去する確認試験も有用である。本法は T3 やプロラクチン、SCC などの比較的分子量の小さい成分に対する自己抗体の確認試験に効果的である。

(13) 検体の不活性化

(14) 酸加熱抽出試験

特に CEA での非特異反応確認の際に広く用いられている抽出試験である。

(15) ノイラミニダーゼ処理

CA19-9 や DUPAN-2 のようなシアル化された糖鎖抗原における非特異反応の確認時に有効な方法である。

(16) 還元処理

IgM が関与する非特異反応では DTT や 2-ME 処理によりその関与を確認することが可能である。

(17) 検体の再遠心（高速遠心を含む）

フィブリン、マイクロフィブリンの影響回避のために検体の再遠心が用いられる。カットオフ値付近の陽性例の確認のため、感染症検査で広く用いられている。

(18) ゲル濾過分析

高速液体クロマトグラフィー（High performance liquid chromatography : HPLC）などのゲル濾過分析により非特異反応の原因物質の分子量を特定することが可能である。疑われる検体を HPLC により篩分け、その溶出液を測定し、横軸にフラクション番号、縦軸に測定濃度をとり分子量分布図を作成する。同時に流したマーカーや同一条件で流した対照検体の分布もあわせてプロットすることにより、測定物質本来の分子量と非特異反応物質の分子量の関係がわかる。

(19) ウェスタンブロット法

(20) 抗体検出検査の確認試験

感染症などの抗体検出検査の異常データの確認には、主として抗原添加による中和試験が実施される。この試験に用いる試薬は抗体検出試薬に用いられている抗原と同一のものを使用する必要があるが、すべての抗体測定系試薬に対応する中和試薬が発売されていないのが現状である。また、感染初期や抗原変異時に出現する抗体には無効な場合もある。以上をふまえた抗体検出検査の確認には以下のような確認試験があげられる。

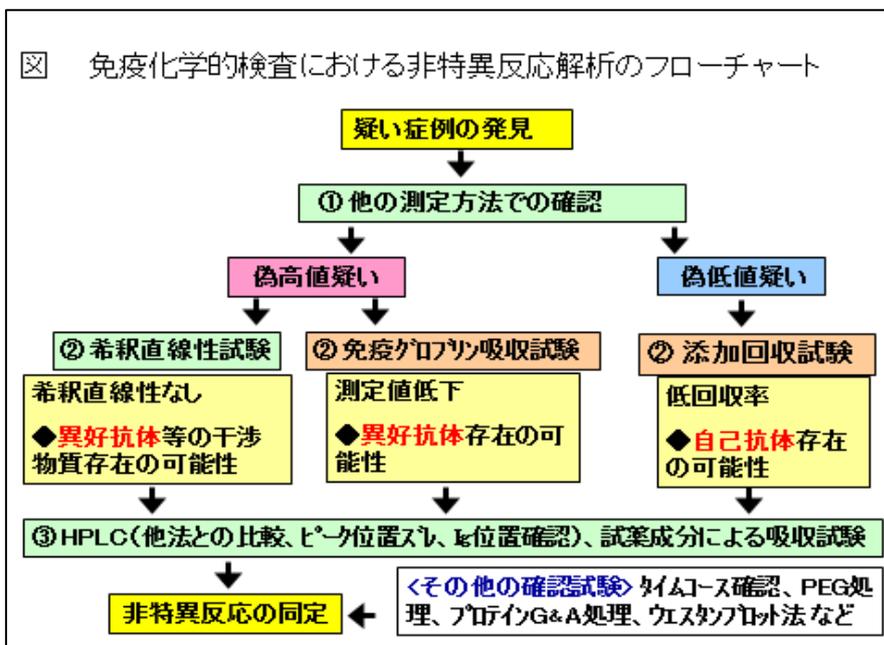
- ① 患者背景の確認
- ② 他の測定方法での検査を行う
- ③ 抗原添加による中和試験
- ④ 希釈試験
- ⑤ 免疫グロブリン吸収試験

中和試験などで非特異反応の存在が確認された場合、その原因としてどのクラスの免疫グロブリンが関与していたかを確認するために用いられる。

- ⑥ 試薬成分での吸収試験
- ⑦ 検体の不活性化
- ⑧ 検体の再遠心（高速遠心を含む）
- ⑨ ウェスタンブロット法

6. 免疫化学検査の異常データへの対応の流れ

筆者らが実施している非特異反応解析のフローチャートを図に示した。一部試薬メーカーの協力を必要とする部分もあるが参考にして頂きたい。



7. 検査室で日常から注意すべき事項と対処法

以下の事項を日頃から認識しておくことが必要である。

- ・免疫化学検査には非特異反応のリスクがあることを認識する

- ・ 試薬の組成、測定原理を理解しておく
- ・ 原因究明のための技術を身に付け、手段を常備する

前述の通り、免疫化学検査の異常データを結果打ち出し時に発見することは難しく、発見の糸口に医師からの指摘が最も多いことから日頃から臨床医との風通しの良い関係を構築する必要がある。

非特異反応を含めた異常値解析への対処は多大な労力と時間、さらに場合によっては追加試験のコストといった負担が発生する。しかし、患者に不利益を被らせないためにも臨床検査の専門家の責務として日常的に取り組む必要があり、検査室の力量が問われるところである。そして問題発見時は可能な限り原因を究明し、最終的に解析結果を公表する姿勢が必要であると考えられる。

【文献】

- 1) 阿部正樹: non-RIA のコルチゾール測定法での各種ステロイドとの交差反応性. 検査と技術 2006 ; 34: 688-690
- 2) 黒木政秀. CEA の抗原性とその測定法.検査と技術 1995 ; 23 : 845-852
- 3) Hanada H,et al.Early detection of colorectal cancer metastasis and relapse by recognizing nonspecific cross-reacting antigen 2 in commercial carcinoembryonic antigen assays.Clin Chem 2009;55:1747-1751
- 4) 阿部正樹ほか.CA19-9 測定値の市販 4 試薬間での比較について. 医学検査 1995 ; 44 : 1040-1045
- 5) 出口松夫.感染症マーカー正確な結果を得るためのポイント!?.JJCLA 2011 ; 36 : 219-222
- 6) 上田一仁. (3) リコンビナント. Medical Technology 2013;47:742-746
- 7) Kricka LJ.Human anti-animal antibody interferences in immunological assays.Clin Chem 1999; 45:942-956
- 8) 阿部正樹ほか.癌免疫細胞療法実施後に CEA 偽高値を呈した患者血清の検討.臨床病理 2011 ; 59 : 763-769
- 9) 新井祐司ほか.免疫学的測定法の干渉作用の検討.医学検査 2000 ; 49: 768-772
- 10) 森山隆則ほか.ヒト IgM 型抗マウス抗体(HAMA)による血清 CA - 125 測定における偽陽性反応の解析.臨床検査 1996 ; 40 : 607-610
- 11) 阿部正樹ほか:抗 CEA 自己抗体による CEA の低値現象.検査と技術 2012;40:162-163
- 12) 阿部正樹ほか.数種のイムノアッセイ法において PSA 偽低値を呈した前立腺癌患者血清の検討. JJCLA 2008;33:805-811
- 13) Sakai H,et al.Falsely elevated thyroid-stimulating hormone (TSH) level due to macro-TSH. Endocr J 2009;56:435-40
- 14) Hattori N, et al. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: bioassay and clearance studies of PRL-immunoglobulin G complex.J Clin Endocrinol Metab 1997;82:3107-3110.
- 15) 坂栗まゆみほか.梅毒ラテックス免疫凝集試薬における乳ビの影響.JJCLA 2003;28: 711-713

検査での異常事例と対処法 その 1
—自動分析装置から見出された異常値の解析—

亀子 光明 (群馬パース大学 保健科学部 検査技術学科)

青木 義政 (九州大学病院 検査部)

1) はじめに

臨床化学の分野で抗原抗体反応を利用する測定法には、溶液内で起こった抗原抗体複合体を光学的に生化学自動分析装置や専用測定装置を用いて測定する免疫比濁法 (turbidimetric immunoassay : TIA), 免疫比濁法 (nephelometric immunoassay : NIA), ラテックス凝集免疫法 (latex agglutination immunoassay : LAIA) がある。また、高感度測定法として酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay : EIA), 酵素結合免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA), 蛍光物質を標識に用いる蛍光酵素免疫測定法 (fluorescent enzyme immunoassay : FLEIA), 化学発光性化合物を標識として用いる化学発光免疫測定法 (chemiluminescence immunoassay : CLIA), 酵素を標識物質として、その活性を化学発光反応で測定する化学発光酵素免疫測定法 (chemiluminescence enzyme immunoassay : CLEIA), ルテニウム錯体を標識物質に用い電荷を加える電気化学反応による酸化還元反応で発光させて測定する電気化学発光免疫測定法 (electro chemiluminescence immunoassay : ECLIA) などの測定法が用いられる。しかし、これらの測定法は、抗原抗体反応を利用する測定系のため、様々な非特異反応が報告されている¹⁾。

本セミナーでは、免疫反応における留意点と 3 例の事例について解説する。

2) 免疫化学分析法における抗原抗体反応の留意点

(1) プロゾーン現象 (prozone phenomenon) ・フック現象 (hook phenomenon)

高濃度の検体では、本来の値より低値に測定されることがある (プロゾーン現象)。この現象は TIA, NIA, LAIA や 1 ステップ法の EIA で良く認められる。一方、フック現象は、ELISA で認められる現象でプロゾーン現象とは異なり検量線は抗原過剰域でプラトーとなり、実際の検量線は抗原過剰域からやや下がった釣り針様の検量線を描くため、極端な測定値の減少は認められない。

(2) 免疫化学分析法に影響を及ぼす誤差要因¹⁾

免疫学的測定法では、非特異反応や偽反応は避けては通れない問題であり、主な誤差要因として以下に示す生体成分や試薬や標準物質による誤差要因がある。

- a. 生体に由来する因子：非特異反応を起こす生体成分として、リウマチ因子 (rheumatoid factor : RF), クリオグロブリン (cryoglobulin : Cg), 異好抗体 (heterophile antibody : hAb), M 蛋白などが含まれるほか、測定物質類似成分があり類似構造のため交差反応を起こすことがある。RF, M 蛋白, Cg 陽性患者血清では異常高値または異常低値を示すが、これらは反応タイムコースをチェックすることで確認できる。しかし、hAb として知られるヒト抗マウス抗体 (human anti-mouse antibody : HAMA) を持つ患者では、異常値を示しても現行の測定系では反応過程が確認できないため、臨床症状と測定値が乖離することを臨床医から指摘されて異常値であることに気が付くことがある。マウスモノクローナル抗体 (monoclonal antibody : mAb) を用いる測定試薬では、この現象がよく認められるので、異常値と考えられる場合は希釈直線性を確認し、直線性が無い場合は HAMA の影響を考える必要がある。HAMA の影響を受ける項目として、CA125, CA19-9, CEA, PSA, TSH, hCG などがある。この他の影響を与える生体成分としてフィブリンがあり、凝固が不十分であると血清分離後に血清中にフィブリン析出して、それが担体等に付着して非特異反応を起こす原因となる。
- b. 測定試薬成分に由来する因子：試薬成分として反応セル内での発泡防止や反応セルへの吸着防止などの目的で界面活性剤が、測定感度の増感目的でポリエチレングリコール (polyethylene glycol : PEG), ブロッキング剤としてウシ血清アルブミン BSA (bovine serum albumin : BSA) などが用いられるが、これらの試薬が測定値に影響を与えることが多い。PEG, 界面活性剤は非特異的な濁りを生じさせ TIA などでは正誤差を、BSA に対する hAb を持つ患者では偽陽性を、リコンビナント抗原を用いた抗体検査 (梅毒トレポネーマ抗体, HIV 抗体検査など) では、抗原性の違いから偽陰性または偽陽性を示すことがある。
- c. 分析機に由来する因子：攪拌子, 洗浄ノズル, サンプルノズルなどの分析機器の整備不良は、測定系に大きな影響を及ぼすため日常点検は重要となる。

3) 異常事例と対処法

(1) M 蛋白血清が影響した事例²⁾

- a. 事例内容：この事例は、S 状結腸癌の患者 (81 歳, 男性) で、検査データを Table 1 に示すように、*印を付けた項目、血清アルブミン (Alb) 値が 9.2 g/dl と総蛋白 (TP) の測定値 8.8 g/dl よりも高値を、直接ビリルビン (D-Bil) の測定値では、-6.2 mg/dl とマイナス値を、血清鉄 (Fe) の測定値は 25 μ g/dl と低値を示したことから、その異常値の原因解析が始まった症例である。尚、この患者は、IgG- λ 型の M 蛋白があることが、解析の途中で判明し、この異常値の原因が M 蛋白であることが後から分かった事例である。

Table 1. 主な臨床データ

項目	測定値	項目	測定値	項目	測定値
TP	8.8 g/dl	Alb	9.2* g/dl	UA	6.0 mg/dl
TTT	0.1 K.U.	ZTT	0.8 K.U.	UN	20 mg/dl
T-Bil	0.3 mg/dl	D-Bil	-6.2 * mg/dl	CRE	1.0 mg/dl
Fe	25* µg/dl	Ca	9.0 mg/dl	CRP	0.2 mg/dl

Alb は、自動分析装置を変えても同様な結果であり、2 倍希釈しても高値を示したが、免疫比濁法に変えて測定すると 2.6 g/dl、タンパク分画での Alb%からの計算値では、3.5 g/dl となることから、Alb の値は 3 g/dl 前後と推定され、BCG 法での値が異常高値と考えられた。

b. 異常値の原因解析方法：

- ・ 反応タイムコースの確認： Alb 測定では反応時間の経過とともに吸光度が減少し続け、10 分間の測光時間内に反応は終了しなかった。D-Bil 測定では第 2 試薬添加直前に吸光度の著しい上昇を認め、Fe 測定でもブランク反応で、反応時間の経過とともに吸光度の減少を認めるなど、反応タイムコースの異常が確認された。

c. M 蛋白の影響の解析：M 蛋白の存在により異常高値を示す場合、反応過程で M 蛋白の非特異反応が推測されるため、患者血清と測定に用いた各試薬を試験管内で自動分析装置でのパラメータと同じ比率で加えたところ明らかな混濁凝集が認められた。異常を示した項目は、本来、比色定量により測定されるが、この事例では、比濁法の原理が作用し、濁度変化が測定結果に反応タイムコースに影響を与え、異常値を示す結果となった。混濁する原因として、試薬の pH やイオン強度、試薬中に含まれる界面活性剤が考えられるが、今回、異常を来たした項目の第 1 試薬の pH は全て酸性領域 (pH 約 4.0) にあり、この試薬 pH が反応に影響を与えたことが明らかとなった事例である。

d. 対処法：M 蛋白は時として、異常反応を示すため、TP、ZTT、TTT が高値を示す場合は、M 蛋白を疑い、反応タイムコースに異常が無いかを把握する必要がある。M 蛋白以外では、クリオグロブリン陽性血清、自己免疫陽性血清でも異常高値が認められるため、関連する検査項目をチェックする事が必要となる。クリオグロブリン陽性血清は検体を冷蔵保存すると白濁沈殿物が認められるので、異常データを示した検体は、冷蔵保存し翌日に沈殿の有無を確認すると良い。

(2) 分析機からのメッセージで AST 値の異常が明らかとなった事例³⁾

a. 事例内容：分析機上で直線性異常 (LIN.) が示されたことで解析が始まった事例で、初回検査で AST 280 IU/L、翌日の再検で 358 IU/L と測定値が上昇した

ことから異常検体である可能性が示唆された事例である。

b. 異常値の原因解析方法：

- ・ 反応タイムコースの確認：LIN.コメントのため、反応タイムコースを確認すると、通常、第2試薬添加後、吸光度は比例的に減少（直性上に沿って）するが、この事例ではやや緩やかな弧を描く吸光度変化を示している。本事例のように、保存により測定値が異なり反応カーブに異常が認められる場合は、AST 結合性免疫グロブリンの存在が示唆される⁴⁾。
- ・ 免疫グロブリン結合性の確認：AST アイソザイムと免疫固定法を実施して、アイソザイムでの異常の有無と AST が IgG と結合していることを確認した症例である。

- c. 対処法：通常、AST が 45 IU/L 以上、AST/ALT 比が 2.0 以上の患者血清では、約 13%の頻度で AST 結合性免疫グロブリンの存在が示唆されるので、この情報が異常検体解析の手がかりとなる⁴⁾。しかし、本症例は ST/ALT 比が 1.0 であり、LIN.コメントが無ければ見逃した事例であるので、分析機からうたがわれるコメントには注意する必要がある。

(3) 血清 Ca 値が異常低値を示した事例⁵⁾

- a. 事例内容：酵素法による血清カルシウム (Ca) を測定したところ、3.2 mg/dl と異常低値を示し、この患者血清だけに認められた事例である。

b. 異常値の原因解析方法：

- ・ 他法との比較：常用基準法である原子吸光法では 8.7 mg/dl となり大きな乖離が認められた。その後、試薬内容が変更されたため、再度、新試薬で測定したところ 9.0 mg/dl と正常値内に測定され、原子吸光法での測定結果とほぼ一致した。
- ・ 試薬組成の違いによる影響の解析：試薬組成の違いは、従来法ではブタ膵液由来のアミラーゼ (Amy) を用いるのに対し、新法ではヒト唾液由来の Amy を用いているので従来法で使用した Amy と被検血清との反応性を検討した。
- ・ オクタロニー法による解析：オクタロニー法では、ブタ膵液由来 Amy と患者血清のウエル間に明らかな沈降線が認められ、患者中にブタ膵液 Amy に対する抗体が存在する事が示唆され、この抗体が測定系に影響を及ぼす原因であることが明らかとなった事例である。

- c. 対処法：この事例のように、試薬組成の中に、ヒト由来以外の物質が含まれ異常値が認められる場合は、hAb を疑い患者血清とその物質の反応性をオクタロニー法などで確認すると良い。

4) まとめ (異常検体発見への糸口)

以上の事例から分かるように、日常検査で異常か否かの判断は、検査結果の不一致、異常測定結果、臨床医からの問合せ(臨床所見との乖離)等により発覚する場合が多い。異常が認められる原因として、被検血清、使用試薬、使用機器に起因する事が考えられるが、多くの場合は被検血清に由来している。特に、M 蛋白陽性患者血清や自己免疫陽性血清で多く認められる。

また、近年は採血管に由来する現象として、高速凝固促進剤の入った真空採血管で採血した場合、良く転倒混和して凝固を確認してから遠心分離をしないと、分離後に血清中にわずかではあるがフィブリンが析出し、これが反応セルや試薬に含まれるラテックス担体等にトラップされ偽陽性を起こす危険性がある。

ここで紹介した事例の解析には、特に特殊な装置や試薬を使用しなくても解析が可能であり、臨床検査技師の知識を持ってすれば、日常検査の中で十分行えることである。臨床検査技師は、分析専門家として臨床に役立つ情報を絶えず報告する義務があるため、異常値を見逃さないよう心掛ける必要がある。

(図は省略したが、詳細は日本臨床検査自動化学会誌 2015 ; 40 (Suppl. 1) : 37-43 を参照されたい。)

文献

- 1) 大竹皓子, 渡辺勝紀. 免疫検査異常の解析の仕方: その1. 日本臨床検査自動化学会誌 2010;35 (Suppl. 1):81-115.
- 2) 青木 義政. 酸性条件下で不溶化する IgG4- λ 型 M 蛋白が引き起こした検査値への影響. 臨床検査 2013;57:1153-1158.
- 3) 青木 義政, 坂口 恵理, 櫻井 博文, 亀子 光明ほか. 自動分析装置での反応過程異常を契機として見出した AST 結合性免疫グロブリンの 1 例. 医学検査 1999;48:1584-1588.
- 4) Moriyama T, Nobuoka M, Makino M. Incidence and properties of aspartate aminotransferase-immunoglobulin complexes in patients with a high serum aspartate to alanine aminotransferase ratio. Clin Chim Acta 1990 ; 190 : 47-56.
- 5) 丸山 聡, 青木 義政, 阿藤 泉, 吉澤 亜弥子ほか. 唾液由来 α -アミラーゼを用いた血清総カルシウム測定酵素法液状試薬の有用性-良試薬への変更が功を奏した 1 例-. 現代医療 2003;35:576-580.

検査での異常事例と対処法 その2

—マクロエンザイム・HAMA と自己抗体の鑑別を中心に—

北海道大学大学院保健科学研究院 病態解析学分野 森山隆則

はじめに

免疫検査における非特異反応の基本的な考え方および事例についてはすでに報告¹⁾しているが、本稿においては具体的な対処法を中心に解説する。異常反応の放置は検査過誤・医療過誤に発展することになり、検査室の責任は大きい。

近年、海外において臨床検査の様々なエラーについて事実を包みか隠さず明らかにし注意喚起する総説や論文が発表されている²⁻⁷⁾。我が国では単発の検査過誤に発展しかねない報告が多いがこのような報告は大変意味深い。臨床検査は病院をもとより広く保健医療に貢献する立場にあり、個別のデータ管理の重要性は言うまでもないことである。

1. 免疫学的酵素検査法における異常反応

1.1. 異常反応の具体例

マクロエンザイム（酵素・免疫グロブリン複合体）は古くて新しい検査過誤となるものとして考えられていることから、著者らは本年、マクロエンザイムを網羅した総説を公表した⁸⁾。出現頻度に関する著者らのデータでは、健常者（集団検診受診者）でマクロ LD が 0.36%、患者群（AST/ALT 2.0 以上）で 13.7% の高頻度でマクロ AST が検出されている。

近年、臨床検査の現場から電気泳動装置が消えてしまい、検査データに責任を負えない状況になっていることは大きな問題である。血清酵素の免疫学測定法として腓型アミラーゼと CK-MB 測定法がある。これらの測定において、患者血清中にマクロアミラーゼとマクロ CK (type-1) が存在していると、当然、試薬中の抗唾液型アミラーゼ抗体や抗 CK-M 抗体の反応が妨害されることになる。その結果、場合によっては総活性より腓型アミラーゼと CK-MB 活性が上回るという矛盾データもあり得ることになる。CK-MB 測定法においては、さらにミトコンドリア CK (マクロ CK type-2) が存在する場合、抗 CK-M 抗体が反応しないことから type-1 と同様な影響が生じることになる。近年、改良型の試薬も開発されているが細心の注意が必要となる。表-1 に、マクロ CK 症例における CK-MB 測定結果を示す⁹⁾。

表-1 マクロ CK type-1 および type-2 の CK-MB 測定値と関連情報

Case	CK (U/L)	MB (U/L)	Activation Energy (kJ/mol)	kDa	Bound Immunoglobulin	Isozyme Specificity
1	151	126	45.2	310	IgG-κ, λ	BB
2	159	157	27.0	330	IgG-κ	BB
3	2,505	2	51.4	230	IgA-κ, λ	MM
4	138	104	63.4	230	IgA-λ	MM
5	5,505	2	44.7	330	IgA-κ, λ	MM
6	76	86	100.0 (>75)	160, 1,000	NT	NT
7	111	148	51.9	310	IgG-λ	BB
8	122	192	63.9	310	IgA-λ	ND

MB, Immunological test for CK₂ (CK-MB) activity; NT, Not-tested; ND, Not-determined; BB, CK₁ isozyme; MM, CK₃ isozyme.

ここでマクロエンザイムの一般的な特徴について以下に箇条書きで示す。

- 1) 臨床経過と矛盾する持続性の高活性を示す（疾患関連性でもみられる）
- 2) 酵素の結合サイトによっては活性を示さないこともある
- 3) アイソザイム電気泳動で異常パターンを示す（結合免疫グロブリンにより見かけ上正常パターンを示すこともある）
- 4) 高分子酵素であることを証明する
- 5) 結合免疫グロブリンで通常は IgG および IgA であるが混合型もみられる
- 6) 母体由来の酵素結合性 IgG により児に一過性の異常高値を示すこともある

1.2. マクロエンザイムの同定法

結合免疫グロブリンの同定法その他詳細については著者らの総説を参考にさせていただきたい⁸⁾。同定法としては、免疫電気泳動法、免疫固定法、免疫向流法および免疫混合法がある。ここでは電気泳動装置がなくても実施可能な免疫混合法について紹介する。すなわち本法は、概ね抗血清（Dako 社の場合）と被検血清を 5 : 1 程度にマイクロチューブにて混合し冷蔵庫にて 1 昼夜放置後、形成された沈殿物を PBS (pH7.4) で十分洗浄後（最低 3 回）に酵素発色試薬を加え（0.5 ml）、吸光度を測定する。図-1 にマクロ AST の同定結果を示す。

図-1 免疫混合法によるマクロ AST 結合免疫グロブリンの同定結果



IgG,IgA-λ type macro AST

2. 免疫検査項目の非特異反応

2.1. 高感度微量免疫自動分析装置への理解

特に化学発光法を原理とする分析装置では、分析系に「チリや埃」等はあるてはならないことは周知のことである。室内はもとより分析装置周囲と本体を清潔に保つことが必要である。自動分析装置の定期メンテナンスにのみに依存してはならない。また、血清分離操作においてミクロフィブリン等があった場合は、固相に吸着し洗浄操作が不十分になることもあり、さらに比色の妨害因子となりうることも予想される。自験例では、特に感染症の検査において比較遠心力 (G) を上げて再度遠心分離することで陰性化した事例を何度となく経験している。

2.2. 非特異反応の分類

免疫学的非特異反応は下記に大きく分類されるが前述のメカニクなエラーを除くと避けられない内因性の原因がほとんどである¹⁾。そのため、異常反応は試薬メーカーの責任にのみ転化しただけでは、その検査室の問題解決能力の向上には繋がらない。免疫検査には非特異反応は必ず起こりうる現象として捉え学習し準備しておくことが肝要である。

- 1) 真空採血管の分離剤およびコーティング剤が免疫反応に影響（特に血中薬物濃度測定）する事例
- 2) 測定対象物質に対する自己抗体が内在する事例

- 3) 測定対象物質と交差反応を示す物質は存在する事例
- 4) 免疫反応抑制因子（投与薬物とその代謝産物・試薬成分と反応する因子）が内在する事例
- 5) 固体（コーティング剤含む）への非特異反応因子が内在する事例
- 6) M 蛋白・リウマチ因子などの異常蛋白が影響する事例
- 7) 試薬中の吸収剤をすり抜けて反応する異好性抗体が内在する事例
ヒト抗マウス抗体（HAMA）やヒト抗ウサギ抗体（HARA）等による偽陽性反応

2.3. 非特異反応の解析法

前述の1～7の全ての解決法を網羅できないが一般的な解析法について紹介する。

1) 希釈直線性の確認

非特異反応因子が内在する場合は直線性が認められない。

2) 患者血清のゲル濾過を実施し測定対象物質の溶出プロフィールの検討

測定対象物質が正規の分子量の位置に溶出されるかについて確認する。

すなわち理論上、自己抗体の関与がある場合には高分子ピークが確認され、異好性抗体の関与が推定される場合には対応する免疫グロブリンの位置に溶出される。図-2はTSH測定でみられたIgG型HAMAのゲル濾過の検討事例を示した。本法による検討は、IgG型HAMAとIgG型自己抗体を区別する際には不可欠な方法となり極めて重要である。すなわち、理論上、自己抗体の事例の場合は、フリーの物質と免疫複合体（IgGより高分子）が検出されることになる。

3) ポリエチレングリコール（PEG）6000沈殿法

非特異反応因子が患者血清の免疫グロブリンが推定される場合一般的に利用される方法である。すなわち、25% PEG600溶液（PBS, pH 7.4）と患者血清を等量混合し直ちに遠心分離（3,000回転30分）する。そこで上清を測定対象物質とする。しかし、確かにこの濃度のPEG6000沈殿法で電気泳動上、 γ 分画は消失することを確認されるが粘稠度が極めて高くなり分析試料としては不適である。

4) 免疫吸収法

本法は、前述の免疫混合法とは反対に上清中の対象物質を測定し特異抗体で吸収されるか否かを判定する。やはり最適比が重要となることから注意が必要となる。また、ピットホールとして使用する特異抗体中に測定対象物質が稀に含まれることがあり注意が必要となる。CA125様物質を含む抗体に遭遇し大変混乱した症例がある。

5) 原理の異なる方法での再検査

最初に、まず検査に従事するに際して、項目ごとに、原理はもとより一次抗体に分

けて二次抗体の種類・由来を最低限整理しておく必要がある。従って再検査に際してはもちろん原理の異なるあるいは抗体の異なる方法での実施が重要となる。同じ抗体を使用しても酵素免疫測定法で異常反応を示すが放射免疫測定法では異常反応を示さないという IgG 型 HAMA の事例を CA19-9 測定においてを経験している。そこでは放射性物質を標識する際の抗体の処理方法が HAMA の反応部位を減少もしくはマスクすることが推定された。

おわりに

臨床検査の専門家である臨床検査技師は検査の実施・管理にはじまり検査のコンサルテーション全てに責任を負う立場にある。したがって本稿で取り上げられた“免疫検査における非特異反応”なるものが稀な現象であったとしても見逃す事ができないし、このような現象に直面したときこそ、その対応に検査側の信頼が問われ真価が発揮されることになる。

文献

1. 森山隆則, 中野恵一, 田村彰吾. 免疫検査における非特異反応, *Medical Technology* 41: 724-729, 2013.
2. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clin Chem* 53: 1338-1342, 2007.
3. Goswami B, Singh B, Chawla R, Mallika V. Evaluation of errors in a clinical laboratory: a one-year experience. *Clin Chem Lab Med* 48: 63-66, 2010.
4. Kalra J. Medical errors: overcoming the challenges. *Clin Biochem* 37: 1063-1071, 2004.
5. Kalra J. Medical errors: impact on clinical laboratories and other critical areas. *Clin Biochem* 37: 1052-1062, 2004.
6. Kalra J. Medical errors: an introduction to concepts. *Clin Biochem* 37: 1043-1051, 2004.
7. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 44: 750-759, 2006.
8. Moriyama T, Tamura S, Nakano K, Otsuka K, Shigemura M, et al. Laboratory and clinical features of abnormal macroenzymes found in human sera. *Biochim Biophys Acta* 1854: 658-667, 2015.
9. 森山隆則, 信岡学, 高杉佑一, 他. Macro creatine kinase type 1 および type 2 の生化学的性状. *生物物理化学* 33: 313-317, 1989.

検査での異常事例と対処法-3

—検査室で出来る異常反応の気づきと解析方法—発生機序考察まで—

井本真由美（近畿大学医学部附属病院 中央臨床検査部）

このテキストは、「科学技術マニュアル第 14 集・免疫化学検査の異常データの解釈と対応の仕方 検査での異常事例と対処法-3」をまとめたものである。詳細は本書を参照されたい。今回、他の演者と重なると思われる部分を除き、異常事例解析を中心とした。

1、はじめに

日常検査のなかでは自動分析機器を使用して膨大なデータが報告されている。その中には、前回値との乖離を認める、再現性が得られない、希釈直線性が得られない等の検体に遭遇することがあり、また臨床所見と合わないと依頼医から問い合わせを受けることがある。さらに、測定機器、試薬の変更時や、外注検査の院内導入時には、以前の測定系との間に、測定値が乖離する検体を認める場合がある。これらの乖離には様々な原因があるが、種々の異常反応（非特異反応）である可能性が高い。これは免疫化学的定量測定においてみられやすい¹⁻³⁾。この異常反応は、検体側の問題として、ヒト抗マウス抗体 (HAMA) などの異好抗体や、M 蛋白、クリオグロブリン、リウマトイド因子があり、試薬側では、ポリエチレングリコール (PEG) や界面活性剤の種類や濃度の関わり⁴⁾ や緩衝液組成 (pH) 等による影響が報告されている⁵⁻⁶⁾。しかし異常反応の発見は困難であり、見逃してしまうこともある。今回、我々が経験した事例をあげて、異常値の気づきと発生機序解析、さらに検査室の対応についてまとめてみた。

2、異常反応の実例

1) 症例 1: 腎疾患患者の尿中 β_2 -マイクログロブリン (β_2 -m) 測定時に発生した偽高値症例

①現象

尿生化学検査自動分析装置の機器更新のため、AU480 (ベックマンコールター) が導入された。以前から β_2 -m 測定試薬は、A 社から B 社に変更が決定しており、日立 7170 形 (旧測定装置) との相関確認中に乖離検体に遭遇した。旧測定装置日立 7170 形 (測定原理 ラテックス凝集法) による、A 社試薬では、 β_2 -m: 668 ng/mL に対し、新測定装置 AU480 (測定原理 ラテックス凝集法) による B 社試薬では 1,580 ng/mL であった。

②患者

10 歳代、男性 診断名: 慢性糸球体腎炎、肉眼的血尿 尿化学測定値: Na 22.0 mmol/L、K 56.9 mmol/L、CL 158.9 mmol/L、Cre 263 mg/dL、UN 1,349 mg/dL、Ca 8.1 mg/dL、Pi 241.8 mg/dL、Mg 12.1 mg/dL、TP 42 mg/dL、Glu 4 mg/dL であり、UN と Pi が異常高値であった。

③ 異常検体の解析

◆希釈直線性: B 社 β_2 -m 測定での希釈直線性をみたと、原倍で 1,580 ng/mL、2 倍希釈で 349.7 ng/mL ($\times 2 = 699.4$)、4 倍希釈で 171.2 ng/mL ($\times 4 = 684.8$) と B 社測定値には希釈直線

性を認めず、4 倍希釈以上で整合性が得られた。

◆反応曲線の確認：B 社試薬では、第一試薬添加後に異常な吸光度の上昇を認めた。

我々は、患者は高 Pi 血症であること、希釈すると偽高値が改善すること、第一反応時に異常反応を生じることを B 社に情報提供した。そこで、B 社における原因追究が始まった。

④ B 社における原因追究と対応

異常反応モデルの確立：リン酸緩衝液を対象として、 β_2 -m を測定第一試薬と混和した際の吸光度を測定したところ異常な上昇を観察し、無機リン濃度 130 mg/dL 以上で β_2 -m 測定値に正誤差出現することを見出した(表1)。

表 1 リン酸緩衝液の違いによる β_2 -m 試薬の反応

リン酸緩衝液 (mM)	無機リン (mg/dL)	β_2 -m (ng/mL)
0	0	0
20	65.4	0
40	130.7	170
60	196.1	710
80	261.4	600
100	326.8	410

第一試薬中の異常な濁りを感知するために、分析パラメーターを変更してエラーフラグが立つようにした。さらに、患者検体中の無機リンおよび蛋白成分が第一試薬中の干渉反応除去剤と反応して白濁したため、試薬製造方法を変更して問題を解決した。改良前と改良後の試薬による患者検体の β_2 -m の反応曲線を図 1 に示した(図 1, 表 2)。改良試薬では第一試薬が入った後、濁りの影響がなくなった。今回の症例は、機器更新時に遭遇した試薬変更に伴った乖離例である。もし、試薬変更時にこの異常反応に気づくことが出来なかったならば、高 Pi 血症の検体は高値に報告していたかもしれない。我々の情報提供と B 社の迅速な対応で試薬の製造方法変更にて問題を解決できた症例である。

表 2 患者検体における現行試薬と改良試薬の β_2 -m 値比較

B 社データ

検体ID	Pi (mg/dL)	現行品		改良品
		β_2 -m (ng/mL)	2 倍希釈値	β_2 -m (ng/mL)
No.1	261	1563 Z	603	596
No.2	200	1584 Z	571	591
No.3	132	234	174	230
No.4	248	110	89	104
No.5	135	584	533	586
患者 No.31	242	1677 Z	610	613

測定装置 AU480

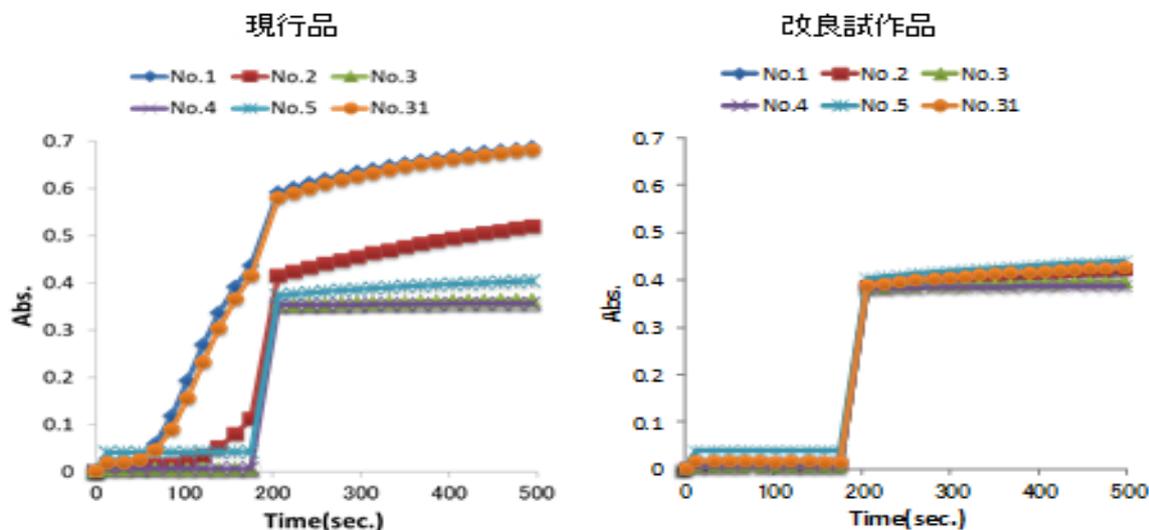


図1 患者検体による β_2 -mの反応曲線

2) 症例2:PIVKA-II測定時に一過性に非特異反応が認められた混合型クリオグロブリン血症

① 現象

電気化学発光免疫測定法 (ECLIA 法) を原理とした ED 社測定試薬による PIVKA-II 測定時に再現性が得られない患者検体に遭遇した。患者検体はクリオグロブリン強陽性検体であり、室温での測定で一回目 323 mAU/mL、二回目測定が 213 mAU/mL と再現性が得られなかった。

② 患者

40歳代、男性。両下肢脱力に伴う歩行困難にて当院検査入院となった。下記の結果より、混合型クリオグロブリン血症、慢性C型肝炎、腎機能障害と診断された。

主な検査所見 TP 7.4g/dL、ALB:2.6g/dL、BUN 20 mg/dL、血沈:83 mm/h、RBC $4.31 \times 10^6/\mu\text{L}$ 、IgG 1,920 mg/dL、IgA 486 mg/dL、IgM 2710 mg/dL、血清蛋白分画で γ 位に異常蛋白帯 38.5% (2.3g/dL)、尿中 BJP 陽性、クリオグロブリン試験 強陽性、RF 180 IU/mL であり、骨髓像は形質細胞 1.1%であった。

③ 患者 IgM- κ 型M蛋白の免疫化学的および物理化学的特徴⁷⁾

- ・クリオグロブリンの型は、IgM- κ 型M蛋白とポリクローナル IgG による混合型であった。
- ・クリオグロブリンは通常のものとは異なり、40℃以上でないと可溶化しなかった。
- ・自己 IgG 以外に他者 IgG やウサギ IgG との結合を認めた。

④ 異常検体の解析

異常反応を起こした患者検体は、クラリオフェレーシスとメチルプレドニンパルス療法で治療中に採取された血清である。上記に記載したが、室温での測定値に再現性がなかったため、以下の検討を行った。

◆56℃10 分間加温後測定:753mAU/mL であった。

- ◆希釈直線性:反応溶液による希釈では、×2:1,242、×5:1,775、×10:2,210 mAU/mL、生理食塩水では、×2:1,696、×5:2,455、×10:2,750 mAU/mLと希釈によっても整合性を認めなかった。
- ◆発光カウントの波形解析:正常反応検体と比較すると、患者測定 1 回目、2 回目および、希釈直線性時の波形に明らかなピークタイムのズレが確認された(図 2)。

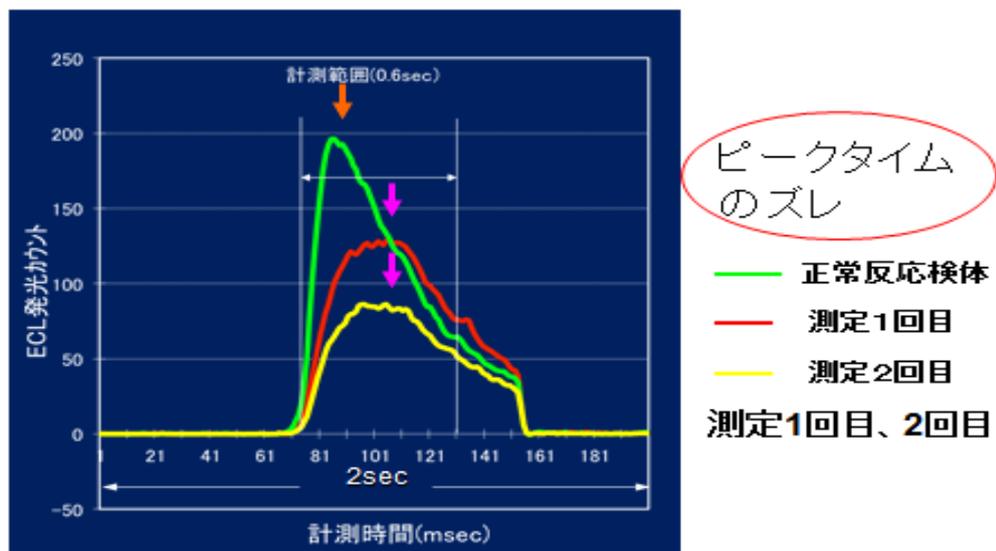


図2 発光カウント波形解析(1)

- ◆フィブリノゲン添加実験:奇異なことに、異常値は非特異反応が判明した当日にのみ認められ、その後の経過中には認められなくなった。また、非特異反応を起こした検体は、冷蔵および凍結保存後に異常値が出現しなくなった。そこで、非特異反応を起こした原因として、クリオグロブリン以外の要因として、フィブリノゲンを疑った。そこで、患者検体に 0~200 mg/dL に段階希釈したフィブリノゲンを 9:1(検体:フィブリノゲン)の割合で添加し、反応を観察した。その結果、表 3 に示したようにフィブリノゲン添加濃度 0~100 mg/dL では、測定値も 27~28 mAU/mL と安定していたが、200 mg/dL では測定値 46 mAU/mL と高値化し、発光カウントの波形にもピークタイムのズレを確認できた(表 3)。そして異常検体を一晚 4℃で保存後、測定すると、表 4 に示すように、異常を認めなくなった(表 4)。

表 3 フィブリノゲン添加試験後の異状の有無

添加 Fib 終濃度(mg/mL)	定量値 (mAU/mL)	カウント	Peak-Time	異状の有無
0	28	568.7	460	無
25	27	555.3	440	無
50	28	575.8	440	無
100	27	558.2	470	無
200	46	879.4	480	有

表 4 異状検体冷蔵保存後

測定値	定量値 (mAU/mL)	カウント	Peak-time	異状の有無
7月27日	46	879.4	480	有
7月28日	26	543.5	434	無

⑤ 発生機序考察

今回の非特異反応の発生は、クリオグロブリンおよび、治療の影響によるフィブリノゲンが影響して、1)測定系第1反応(30℃)において固相(PIVKA-IIモノクローナル抗体結合ビーズ)に検体由来のフィブリノゲンや異好抗体の性質をもつクリオグロブリンが非特異吸着 2) この吸着は洗浄操作でも解離せず、3)さらに第2反応でルテニウム標識プロトンビンウサギポリクローナル抗体と結合して発光に至ったことが推定される(図3)。この検体を冷蔵および凍結保存することで、フィブリノゲンがフィブリンとなり、異常反応は起こらなくなったことが確認された。

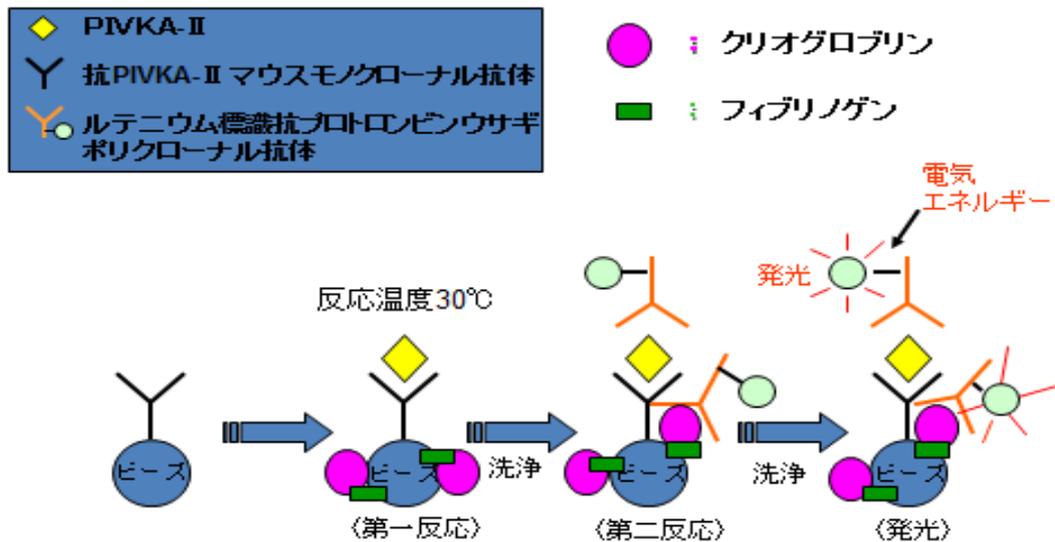


図3 非特異反応の発生機序について

3) 症例3 異好抗体の関与が確認された PIVKA-II 偽高値例

①現象

当検査室では、症例2で紹介した ED 社測定装置の後継機種として、CLEIA 法(化学発光酵素免疫測定法)を原理とする F 社機器を使用して PIVKA-IIを測定している。今回、患者の PIVKA-II値が前回と比較し高値であったことから、検査室再検マニュアルに従い希釈再検したところ、初回値 295mAU/mL に対し、10 倍希釈すると 20mAU/mL と低下した症例に遭遇した。

②患者

60 歳代男性、B型肝炎キャリアとして外来フォロー中であった。2012 年 11 月 9 日 PIVKA-II 測定値が、初検値 295mAU/mL であった。しかし同年 4 月 9 日の前回測定値が 20mAU/mL であったことから、測定担当者が再検マニュアルに従い、10 倍希釈すると 20 mAU/mL となり偽高値が発覚した。主な検査所見は、TP 7.2 g/dL, ALB 4.4 g/dL, RF 667 IU/mL, IgG 1,040 mg/dL, IgA 357 mg/dL、

IgM 202 mg/dL、血清蛋白分画ではM蛋白陰性であった。

③異常検体の解析

◆遠心処理：再検マニュアルに従い、患者血清を高速遠心（15,000rpm、5 分間）後測定すると、初検値 295 → 162 mAU/mL と低下した。

◆希釈試験：専用希釈液を用いて、患者血清を 5 倍希釈すると 実測値 10mAU/mL となり、換算値で 50mAU/mL となり、さらに 10 倍希釈すると 実測値 2 mAU/mL となり、換算値で 20 mAU/mL となった。

◆他機種および原理の異なる機器での測定：原理 CLEIA 法（W 社）では、23 mAU/mL、原理 LBA-EATA 法（W 社）では、15 mAU/mL となった。

◆PEG 処理：免疫グロブリンの影響を回避するために PEG 処理を行い、その前後の測定値について対照と比較した。対照患者では、処理前 161 mAU/mL → 75 mAU/mL（PEG 処理後 47%）に対し、患者では 処理前 295 mAU/mL → 7 mAU/mL（PEG 処理後 2%）となり、免疫グロブリン除去により、偽高値が改善した。真値は約 14 mAU/mL 前後であると考える。

◆異好抗体の定性：ラテックス凝集免疫比濁法を原理とする正常動物（ヤギ、ウシ、ウサギ、マウス）IgG 結合ラテックス試薬（E 社）を使用し、7170S形自動分析装置（H 社）による異好抗体の定性試験を行ったところ、ヒト抗ウシ抗体（HABA）とヒト抗ヤギ抗体（HAGA）が検出された。これらを 200mM 2-メルカプトエタノール（2-ME）溶液（検体：2-ME=1:1）による還元処理を行うと、表 5 に示したように低値となった。RFに関しては、還元処理されたデータはないが、著者らの経験から低値化することが予想される。

表 5 異好抗体の定性試験 還元処理前後

	(Dabs.)		
	HARA ウシ	HAGA ヤギ	HARA ウサギ
未処理	1,871	1,967	1
還元処理	41	39	1

Dabs:吸光度変化量

◆非特異吸収剤による検討：非特異吸収剤を抗体結合粒子液に添加した試薬で検体を測定し、吸収効果を確認した。吸収剤には IgM 非特異用（種類の異なる抗ヒト IgM 抗体）、IgG 非特異用（ヒト IgG 抗体）、IgA 非特異用（ヒト IgA 抗体）、フィブリン非特異用（抗フィブリン抗体）および ALP 非特異用 各吸収剤を抗体結合粒子液に添加し、検体原液を測定した。測定結果を表 6 に示した。IgM 非特異用吸収剤 2により、未処理測定値 46 mAU/mL に対し、31 mAU/mL（67%）となり吸収効果が認められた。

表 6 非特異反应用種々の吸収剤による測定値の変化

		IgM性		IgG性	IgA性	フィブリン	ALP
	未処理	吸収剤 1	吸収剤 2	吸収剤 3	吸収剤 4	吸収剤 5	吸収剤 6
測定値 (mAU/mL)	46	54	31	59	47	55	47
対未処理比 (%)	100%	117%	67%	128%	102%	120%	102%

④ 発生機序考察

PEG 処理により、非特異反応が除去されたことから、免疫グロブリンの関与による偽高値が示唆された。また超遠心により軽度低下し、ウシおよびヤギに対する IgM クラスの異好抗体が検出されたこと、さらに、非特異吸収試験の結果から、非特異反応は検体中の IgM 抗体と推定されたことより、患者 IgM が RF と異好抗体活性をもち、血清中で免疫複合体を形成し担体や標識二次抗体に非特異的に結合反応を起こし偽高値をもたらしたと考える。また、我々は本症例以外にもプレスト PIVKA-II で偽高値を経験している。この偽高値の症例では、患者血中には微量 M 蛋白が存在したが、非特異反応を起こしていた原因は、M 蛋白ではなく、ポリクローナルな IgG であった⁸⁾。

3、考察およびまとめ

今回は、我々が経験した 3 症例を例にあげたが、これ以外にも、ミュータスワーク i30 における AFP 偽低値例⁹⁾や、クリオグロブリンの性質をもつ IgM- κ 型 M 蛋白の影響でグリコアルブミン (GA) がマイナス打ちした症例、F 社機器による PIVKA-II 測定で、整合性を得られなかった偽低値例など、数々の症例を経験している。GA のマイナス打ちは、PEG 処理をすることで回避できたし、PIVKA-II の偽低値例は、他メーカーの協力により他機種で測定してみたが、ED 社の ECLIA 法機器でのみ非特異反応を起こさないことが判明した。ED 社による PIVKA-II 試薬の非特異反応防止策への取り組みについては文献 8 を参照にしていきたい⁸⁾。我々の経験上、非特異反応には免疫グロブリン異常を認めることが多く、基本的な異常免疫グロブリン解析法を会得しておく必要がある¹⁰⁾。そして異常反応の最初の気づきは、いずれも、現場の担当技師が前回値と異なることや、初回値で高値であるため、希釈再検をして発見した等、機器導入時に作成した再検マニュアルを皆が厳守し発見されているのは幸いなことである。

著者は、以前、雑誌社からの依頼で、試薬に起因する異常反応のうちポリエチレングリコール (PEG) と界面活性剤の種類と濃度が測定値に及ぼす影響について免疫グロブリン測定試薬について検討した⁴⁾。その結果、市販されている試薬では、各社ともに非特異反応が出現しにくい条件を見出して異常反応を極力、抑える努力をされていることがわかった。しかし、検体側の問題として、いかなる条件においても非特異反応が出現しやすい検体も存在することが判明した。表 7 に乖離検体の特徴と主な検査値を示した。単に M 蛋白や高 γ グロブリン血症が存在するだけではなく、RF 異常高値や IgG4 異常高値さらには、他の検査項目においても非特異反応が出現した検体など、極めて特殊な検体においては、非特異反応を起こしやすいことが判明した。かつて MMP-3 測定試薬に非特異反応が頻発していた時期があったが、競合する試薬が世にでてからは、MMP-3 測定試薬の非特異反応が減少し、患者にとっても有益な状態となった。

以上のことから、日常検査において、希釈再検値が初回測定値から予想される値と整合性を得られず、希釈直線性のない症例に遭遇したら非特異反応を疑い、整合性の得られる測定値 (真値) を求めることが大切であり、また、どうしても整合性が得られない場合、他機種での測定や PEG 処理やプロテイン A 処理で免疫グロブリンの影響を除きどうなるかをみていただきたい。非特異反応に気づいたら、すぐに試薬メーカーに解析を丸投げするのではなく、検査室で出来ることは数々あるため、根本的な原因、発生機序は不明でも、真値を求め、いち早く臨床に返すことが重要であると考え。現場における非特異反応の解析により、真値を報告できることはもちろんのこと、メーカー側の試薬改良にもつながる。そしてこれらの異常反応への気づきや解析能力こそが真の臨床支援であると考え。

表7 乖離検体の特徴と主な臨床検査値

検体	検体の特徴	IgG	IgA	IgM	RF	IgG4
		mg/dL	mg/dL	mg/dL	IU/mL	mg/dL
A	高 γ グロブリン血症	4,741	900	1,190*	12,800	600
B	高 γ グロブリン血症	7,572	161	40	97	5,100
C	AFP 非特異反応	1,268	496	147	2	NT
D	IgA- κ 型 M 蛋白	478	1,230	164	2	NT
E	高 γ グロブリン血症	3,057	1,670	159	86	NT
F	IgM- κ 型 M 蛋白+クリオグロブリン	902	142	1,650	200	NT

*: 希釈測定, NT: not test

4、最後に

日常検査のなかで、異常反応に気づける眼を持つために、研修会や学会に参加したりして新しい知識や情報を得、常に外向きにアンテナを張り日常検査に臨みたい。今回のセミナーが異常反応に遭遇した時に少しでもお役に立てれば幸いである。

参考文献

- 1) 大竹皓子、加野象次郎:免疫学的測定法における干渉. 検査と技術 25:207-213, 1997
- 2) 渡辺勝紀、羽角安夫、吉野学 他:ラテックス凝集免疫比濁法における干渉反応の解析. JJCLA 26:26-32, 2001
- 3) 渡辺勝紀:リウマトイド因子検査の実際と問題点 臨床検査 58(9):1010-1017, 2014
- 4) 井本真由美:事例で学ぶ免疫検査異常値への対応 事例編 1)試薬に起因する異常反応 (1)ポリエチレングリコール(PEG)・界面活性剤 Medical Technology 41(7):730-736, 2013
- 5) 日本臨床検査自動化学会:自動分析異常の解析技術マニュアル及び自動分析運用指針 Ver.1.7(2010. 9.1)、日本臨床検査自動化学会会誌. 35(supple.1):81-127, 2010
- 6) 青木義政:事例で学ぶ免疫検査異常値への対応 事例編 1)試薬に起因する異常反応事例編(2)試薬組成(酵素、緩衝液に反応する免疫グロブリン) Medical Technology41(7):737-741,2013
- 7) 井本真由美 古垣内美知子 森嶋祥之 他:血中および尿中に低分子 IgM が出現した混合型クリオグロブリン血症の一例 臨床病理 56 (supple) P149, 2008
- 8) 井本真由美:血漿タンパクが免疫学的測定系に影響を及ぼす機序—肝切除後に認められた PIVKA-II 偽高値について—JJCLA 36(2):223-226,2011
- 9) 井本真由美、山田俊幸 免疫自動分析装置ミュータスワコーi30 測定 AFP の偽低値解析と患者特性について 電気泳動 59, 2015(in press)
- 10)井本真由美 上裕俊法:電気泳動法を利用した血漿タンパクの分析:免疫グロブリンの異常と解析方法について. 近畿大学医学雑誌 34(2):153-159,2009