

医療検査と自動化

(日本医療検査科学会誌)

Clinical Laboratory Science Journal

理事長からのご挨拶

第34回春季セミナー公告(第2報)

第52回大会公告(第2報)

総説:糖尿病の診断基準とHbA1c…佐藤麻子

2020年度学会予定

第34回春季セミナー/4月5日(日)

例会長・前田士郎 於:沖縄県市町村自治会館

第52回大会/9月24日(木)、25日(金)、26日(土)

大会長・横田浩充 於:パシフィコ横浜



一般社団法人

日本医療検査科学会

The Japan Association for Clinical Laboratory Science

2020
VOL.45
通巻第247号

1

HITACHI
Inspire the Next

継承、そして革新

日立が培ってきた技術と経験をもとに、生化学自動分析装置が、
複合型自動分析装置に進化しました。

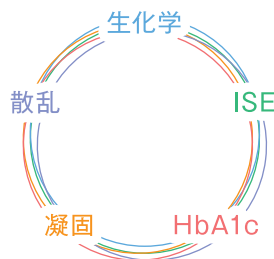
多彩な機能と光学系の新技術の搭載によって、5つの測定を1台に集約。

それぞれの検査機関の業務スタイルにあわせた運用が可能です。

よりよいワークフローを実現する新しい複合型自動分析装置のかたち —
それが、日立自動分析装置3500。

日立自動分析装置

3500



製造販売届出番号: 08B2X10005000042
一般的名称: ディスクリット方式臨床化学自動分析装置
一般医療機器(特定保守管理医療機器該当、設置管理医療機器該当)

株式会社 日立ハイテクノロジーズ
www.hitachi-hightech.com/jp/science/

本社 〒105-8717 東京都港区西新橋一丁目24番14号
お客様サポートセンター (03) 3504-7211

北海道(札幌) (050) 3139-4994 東北(仙台) (050) 3139-4985 中部(名古屋) (050) 3139-4567
関西(大阪) (050) 3139-4878 九州(福岡) (050) 3139-4151

<理事長年頭のご挨拶>

新年、あけましておめでとうございます。

かねてよりお知らせしておりましたように、本年から本学会は日本医療検査科学会(The Japan Association for Clinical Laboratory Science: JCLS)に改称いたしました。これまで本学会は、メディカルテクノロジーと医療の現場をつなぎながら我が国の医療に貢献してまいりました。本学会の創設から50年を経た現在、我が国の検査室の自動化、迅速化は世界をリードし続けております。本学会が検査室の発達に寄与し、このような成果を挙げることができましたのも、“自動化”にかかわられてきたたくさんの方々のお陰であり、学会名改称に際しまして、本学会ならびに関連の諸組織、施設におかれましてご尽力を賜りました皆様に心より感謝申し上げます。

本学会は50年の歴史がございます。50年前に受診していた町の医院で検査機器らしきものと言えば血沈棒と顕微鏡くらいであったのを記憶しております。日々発達するテクノロジーによって、医療における検査では、検体検査のみならず生理検査、細菌検査、画像診断、遺伝子検査と、従来人の手で行われることが多かった領域にも自動測定や迅速な情報処理が適用されるようになって参りました。本学会に対する社会的要求も多様性を増し、大きくなっているように思われます。日本臨床検査自動化学会として築いた確固たる地盤に根を張って、日本医療検査科学会として我々の活動の場を拡張し、本学会のさらなる発展と、より多くの社会貢献を目指してまいりたいと思います。昨年行われた旧名称下での最後の大会となった第51回大会では、3000名近い学会参加者と延べ10,000人を超えるJACLaS EXPO来場者があり、海外からも多数の参加者がありました。本学会の関心領域のみならず活動の場の拡張が求められていることが実感されました。本年は、新名称初の大会として、東邦大学の横田浩充会長の下、9月24日(木)～26日(土)、パシフィコ横浜にて日本医療検査科学会第52回大会が開催されます。大会テーマは「これからの臨床検査のあり方—日本医療検査科学会の幕開け—」です。演題募集期間は4月1日～30日になっております。検体検査領域はもちろんでございますが、生理検査、病理診断、遺伝子診断、細菌検査領域からもたくさんの皆様のご参加を期待しております。

本学会の次の50年への扉は開かれました。新しい領域への扉であり、世界への扉であり、まだ見ぬテクノロジーへの扉であります。本学会の更なる発展と、皆様の益々のご活躍を祈念して、新年のご挨拶といたします。何卒、本年もよろしくお願い申し上げます。

理事長 萱場 広之

日本医療検査科学会(旧：日本臨床検査自動化学会)
第34回春季セミナー公告(第2報)

テーマ：プレジジョンメディスン時代の臨床検査

例会長：前田 士郎 琉球大学大学院先進ゲノム検査医学講座教授
琉球大学医学部附属病院検査・輸血部部长

会期：春季セミナー 令和2年4月5日(日)

会場：沖縄県市町村自治会館(2F ホール)機器展示(2F ホワイエ)
〒900-0029 沖縄県那覇市旭町 116-37
TEL 098-862-8181, FAX 098-862-8183

参加費：2,000円

懇親会：令和2年4月4日(土)18:30～20:30

会場：沖縄県市町村自治会館(2F ホール)

参加費：3,000円

各種委員会：令和2年4月4日(土)11:00～18:00

沖縄県市町村自治会館(4F 会議室)

プログラム委員会、理事会、学術委員長会議、科学技術委員会、POC技術委員会、
遺伝子・プロテオミクス技術委員会、血液検査機器技術委員会、医療情報委員会、
微生物検査・感染症委員会、生理検査委員会、編集委員会、遺伝子 WG1、
遺伝子 WG2、認定 POCCWG



———— プログラム(仮) ————

開会の挨拶 8:55～9:00

理事長 萱場 広之 弘前大学大学院医学研究科臨床検査医学講座 教授
例会長 前田 士郎 琉球大学大学院先進ゲノム検査医学講座 教授

【シンポジウム I】 9:00～11:00

「臨床検査の自動化は変わる～自動測定から自動判定・AIへ(仮)～」

座長：横田 浩充(東邦大学理学部教育開発センター臨床検査技師課程)

松井 啓隆(熊本大学大学院生命科学研究部臨床病態解析学講座)

- 尿沈渣検査
金城 和美(琉球大学医学部附属病院検査・輸血部)
- 血球分類
笠畑 拓志(鹿児島大学病院検査部)
- 細菌同定検査
清祐 麻紀子(九州大学病院検査部)
- 抗核抗体検査
生戸 健一(神戸大学医学部附属病院検査部)

【招請講演 I】 11:00～11:45

座長：村上 正巳(群馬大学大学院医学系研究科臨床検査医学)

「プレジジョンメディスンを支える AI」(仮)

金子 達哉(日本アイ・ビー・エム株式会社)
グローバル・ビジネス・サービス事業
ヘルスケア・ライフサイエンス事業部)

【ランチョンセミナー】 11:50 ~ 12:50

共催：ロシユ・ダイアグノスティックス株式会社

座長：未定

タイトル：未定

演者：田澤義明

【機器・試薬セミナー】 12:50 ~ 14:10

司会：大橋 実(名古屋市立大学病院中央臨床検査部)

山内 恵(琉球大学医学部附属病院検査・輸血部)

【シンポジウムⅡ】 14:10 ~ 15:10

「AI医療の取り組み」

座長：田中 靖人(名古屋市立大学大学院医学研究科病態医科学)

和田 隆志(金沢大学大学院腎病態統御学・腎臓内科学)

- 内視鏡検査における AI 活用(仮題)
北沢 裕人(株式会社 AI メディカルサービス)
- 人工知能技術を用いた高精度・早期診断対応のインフルエンザ検査法(仮題)
田中 大地(アイリス株式会社)
- がんのゲノム医療と AI の取り組み(仮題)
西村 邦裕(株式会社テンクー)

【招請講演Ⅱ】 15:10 ~ 15:55

座長：前田 士郎(琉球大学大学院医学研究科 先進ゲノム検査医学)

『人生 100 年時代を支える行動変容の科学』(仮)

益崎裕章(琉球大学大学院医学研究科内分泌・代謝・血液・膠原病内科)

閉会の挨拶 15:55 ~ 16:05

例会長 閉会の辞

前田 士郎 琉球大学大学院先進ゲノム検査医学講座 教授

次期大会長ご挨拶

横田 浩充 東邦大学理学部教育開発センター臨床検査技師課程 教授

次期例会長ご挨拶

田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科病態医科学 教授

事務局：日本医療検査科学会(旧：日本臨床検査自動化学会)第 34 回春季セミナー事務局

〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町字上原 207

琉球大学医学部附属病院検査・輸血部内

TEL：098-895-3331(内線 2708) FAX：098-895-1436

E-mail：springseminar34@adgenome.skr.u-ryukyu.ac.jp

日本医療検査科学会

第52回大会 大会公告(第2報)

大会テーマ：「これからの臨床検査のあり方
— 日本医療検査科学会の幕開け —」



会 期：2020年9月24日(木)～26日(土)

会 場：パシフィコ横浜

(横浜市西区みなとみらい1-1-1 TEL：045-221-2155)

大 会 長：横田 浩充

(東邦大学理学部教育開発センター臨床検査技師課程 教授)

大会事務局：日本臨床検査自動化学会

TEL：03-3813-6635 FAX：03-3813-6679

E-mail：jidouka@jscla.com

演題募集期間：2020年4月1日(水)～4月30日(木)



プログラム大綱

特別講演 「診療における AI 活用」

記念講演Ⅰ「2020年 臨床検査を新生させ、未来を拓く」

記念講演Ⅱ「これからの臨床検査技師のあり方」

教育講演Ⅰ「臨床検査の原点とは 検体は宝の山」

教育講演Ⅱ「これからの精度管理のあり方」

オリンピック・パラリンピックイヤー記念特別企画シンポジウム

1. シンポジウム(仮題)

1-1. 分子病理検査と検体検査の融合

1-2. 将来を見据えた卒前臨床検査技師教育の改革

1-3. これからの臨床化学検査(酵素活性測定：IFCC 勧告法に対する取り組み)

1-4. これからの生理学的検査(生理学的検査における検体検査データの活かし方)

1-5. これからの血液学検査

1-6. 本学会の国際化

2. 検査値を読むトレーニング 考える臨床検査
3. 共催シンポジウム
 - ・JACLaS 共催講演
 - ・日本医用マスペクトル学会共催シンポジウム
4. 各種セミナー
 - ・モーニングセミナー I および II
 - ・ランチョンセミナー
 - ・機器・試薬セミナー
 - ・サテライトセミナー

体外診断用医薬品

プロトロンビン時間キット

コアグジェネシス® PT (承認番号:23000EZ00046000)

活性化部分トロンボプラスチン時間キット

コアグジェネシス® APTT

(認証番号:230AAEZ00052000)

フィブリノーゲンキット

コアグジェネシス® Fbg

(届出番号:13A2X10027000055)



凝固時間試薬

コアグジェネシス® シリーズ 誕生

液状試薬

用時調製が不要です

オンボード安定性

装置に設置後28日間安定です

操作性を改善

効率よく管理・業務運用ができます

製造販売元



株式会社LSIメディエンス

(本社) 〒101-8517 東京都千代田区内神田一丁目13番4号
お問い合わせ先 インフォメーション TEL.03-5994-2516(平日 9:00~17:45)
URL <http://www.medience.co.jp/>

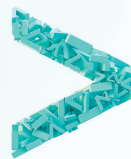
一般医療機器 移動式ディスクリット方式臨床化学自動分析装置
一般医療機器 便潜血測定装置
特定保守管理医療機器 OCセンサーPLEDIA
製造販売届出番号 13B1X90003010009



OC-SENSOR PLEDIA

MORE SIMPLE,
MORE QUALITY

品質も、生活も、「もっと」の声に応えたい



継承と革新から生まれた
分析装置の新基準

- 大量検体への適応
- ユーザビリティの強化
- ランダムアクセス機能の搭載
- 自動システムの充実
- グローバルスタンダードを目指して



製造販売元 **株式会社日立製作所**
〒110-0015 東京都台東区東上野二丁目16番1号

一般医療機器 尿化学分析装置
特定保守管理医療機器 全自動尿分析装置 US-3500
製造販売届出番号 26B3X00001000011

全自動尿分析装置

US-3500

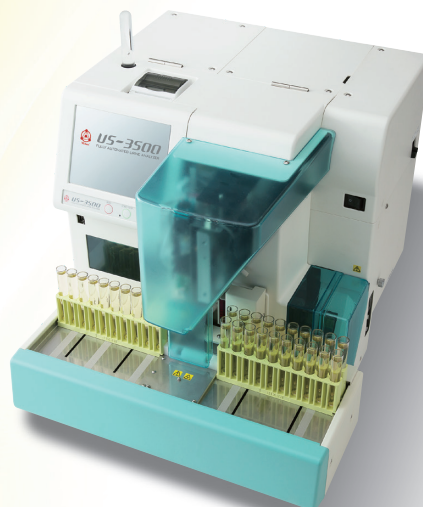
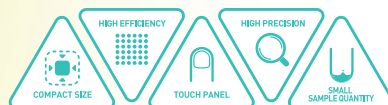
FULLY AUTOMATED URINE ANALYZER

More Accurate, More Efficient

更なる使いやすさを求めて

- コンパクトなボディを実現
- 大量検体に対応
- 使いやすいカラー画面
- より高精度な測定を実現

製造販売元 **テラメックス株式会社**
〒612-8412 京都市伏見区竹田中川原町354



ご使用の際は、本装置に添付の「添付文書」および「取扱説明書」を必ずご参照ください。なお、改良・外観については予告なしに変更することがございますので予めご了承ください。

販売元



栄研化学株式会社

〒110-8408 東京都台東区台東4丁目19番9号

0077 BK

2016年3月作成

目次

学会ニュース

総説

糖尿病の診断基準とHbA1c 佐藤 麻子... (3)

原著

血液凝固反応過程プロファイル解析によるフィブリノゲン濃度の推定
- 特に凝固時間の散乱光強度を利用する方法 - 三宅 佳奈... (9)

臨床検査値の個人内変動と多様性 (血球計数・白血球分画) 磯部 和正... (17)

新規液状化試薬であるコアグジェネシスPTおよびコアグジェネシスFbgの
性能評価 榎谷 亮太... (22)

技術

ASTおよびALT活性測定におけるIFCC対応法試薬の基礎的検討 高橋 祐輔... (32)

「シグナスオートLIP」保存時における過冷却の影響について 渡辺淳之介... (39)

レニン・アルドステロン迅速測定の基本性能評価と日常検査への適用 中村 和之... (44)

当センターにおけるCKD患者を対象としたwhole PTH測定試薬の評価 正木裕美子... (49)

Dimension EXL200によるタクロリムス測定の基礎的検討と
Turn Around Timeの評価 島野志都子... (53)

尿中アルブミン測定試薬「LZテスト'栄研U-ALB」の性能評価と
検体前処理の検討 阿部 広輝... (59)

日立自動分析装置LABOSPECT 008 aの基礎的検討 林 智弘... (67)

血液凝固自動分析装置CP3000を用いたナノピアPAI-1試薬の基礎的検討 木場奈美恵... (78)

症例

多発性骨髄腫治療薬「ダラツムマブ」の蛋白分画検査への影響について 東 真理子... (83)

短報

尿検体におけるVerigene[®]システムを使用した菌種同定及び薬剤耐性遺伝子の
検出感度の検討 須田いつみ... (87)

理事会議事録 (91)

CONTENTS

JCLS News**Review**

Diagnostic Criteria for Diabetes and HbA1c Asako SATO···(3)

Originals

Estimate of Fibrinogen Concentration through Profile Analysis of Blood Coagulation
Reaction Process.

– Analytical Method using Scattered Light Intensity of Clotting Time – Akina MIYAKE···(9)

Intra-individual Variation and Diversities in Blood Cell Counts Kazumasa ISOBE···(17)

The Performance Evaluation of Novel Liquid Type Coagulation Reagents;

COAG-GENESIS PT and COAG-GENESIS Fbg. Ryota MASUTANI···(22)

Reports

Fundamental Study of Modified IFCC Reference Methods for

Measurement of AST and ALT Yusuke TAKAHASHI···(32)

Overcooling Effect on 'Cygnus Auto LIP' during Storage Junnosuke WATANABE···(39)

Evaluation of the Precision of Renin and Aldosterone Quick Measurement and

Its Application to Routine Inspection Kazuyuki NAKAMURA···(44)

Evaluation of the New Immunoassay for Full-length Parathyroid Hormone

focused on CKD Patients in Our Center Yumiko MASAKI···(49)

Validation of Tacrolimus Assay by Dimension EXL200 and Evaluation of

Turn Around Time Shitoko SHIMANO···(53)

Validation of "LZ Test EIKEN U-ALB" and Sample Processing for Urine Albumin

Measurement Hiroki ABE···(59)

Evaluation of the LABOSPECT 008 α Hitachi Automatic Analyzer Tomohiro HAYASHI···(67)

Fundamental Evaluation of "Nanopia PAI-1" Assay on CP3000 Namie KIBA···(78)

Case Report

Impact of Daratumumab on Serum Protein Electrophoresis Mariko HIGASHI···(83)

Short Report

Examination of the Detection Sensitivity of the Identification of Bacterial Species and

Resistance Genes using the Verigene[®] System in Urine Samples. Itsumi SUDA···(87)

Board Meeting Minutes (91)

糖尿病の診断基準とHbA1c

Diagnostic Criteria for Diabetes and HbA1c

佐藤 麻子

はじめに

1990年から行われている厚生労働省の国民健康・栄養調査において、わが国の糖尿病が強く疑われる患者は増加し続け、2016年はじめて推計1000万人を突破した(図1)。もはや国民病といってよい疾患である。わが国の糖尿病の90-95%は2型糖尿病である。糖尿病は、長い経過と様々な病態をとるが、その間一貫して症状が乏しいというのが特徴である。特に2型糖尿病発症時にはほとんど症状がないため、健診や医師の積極的な検査によって、糖尿病診断を行う必要がある。糖尿病は、慢性に経過するのに伴い、網膜症、腎症、神経障害などに代表される糖尿病特有の細小血管症や、心筋梗塞・脳卒中などの大血管症を発症し、著しく人生の質を低下させる。糖尿病治療の目標は糖尿病のない人と同じ寿命、同じ質の人生を送れること、すなわち慢性合併症を予防することであり、そのためには早期に糖尿病の診断を行い、早期に介入することが重要である。

2010年日本糖尿病学会(JDS: Japan Diabetes Society)は糖尿病の診断基準の改定を行った¹⁾。その際の大きな改変は、HbA1cが診断基準に組み入れられ、HbA1cと血糖値一回の測定で糖尿病の診断が可能になったことである。糖尿病の早期診断と早期介入を期待する改定であった。それに先立ち、2010年American Diabetes Association(ADA)も糖尿病診断基準を改定している²⁾が、同様にHbA1c

を診断基準に取り入れている。

本稿では、糖尿病診断の歴史の変遷とHbA1cのかかわり、それに伴うHbA1cの国際標準化と今後の課題について意見を述べたいと思う。

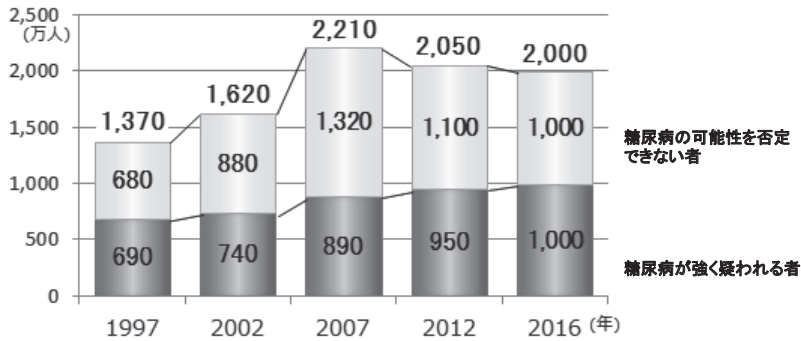
1. 糖尿病診断基準の歴史(表1)

1967年、JDSにおいて糖尿病の診断基準に関する第1次委員会が発足した。その後、約50年、2010年の改訂を含めて、今まで4回の糖尿病診断基準に関する報告を行っている^{1,3,4,5)}。また、2008年には空腹時血糖値の正常域に関する小改訂を行った⁶⁾。

1970年JDSは本邦で初めて経口糖負荷試験(OGTT: Oral Glucose Tolerance Test)における血糖値の判定基準値を提案した。当時は、50gおよび100g糖負荷後の1時間値、2時間値の基準を提示し、区分は正常型、境界型、糖尿病型として耐糖能を表した。この診断基準決定の背景には、糖尿病は特有の症状や合併症を来す疾患で血糖値だけで糖尿病と診断してよいのか、という議論があり、糖尿病の診断は症状や糖負荷試験の結果を総合的に判断して、されるべきであるという基本的立場をとるに至った⁵⁾。このため負荷試験の判定では、耐糖能の区分に「型」を付けるという日本独特の表現が生まれ、現在まで続いている。

1979年National Diabetes Data Group(NDDG)(米)は75gOGTTに基づく診断基準と糖尿病の分類を報告した⁷⁾。同時に軽い耐糖能異常をimpaired glucose tolerance(IGT)とする概念も発表した。1980年WHOの専門委員会もこれに準ずる診断基準を採用した⁸⁾。これらを踏まえ、1982年にJDSは第2次委員会を設置して75gOGTTを用いる診断基準を発表した⁴⁾。欧米にならない糖尿病型は、静脈血漿

Asako SATO
東京女子医科大学 臨床検査科
〒162-8666 東京都新宿区河田町8-1
TEL: 03-3353-8111(ex.28769)
E-mail: sato.asako@twmu.ac.jp



「糖尿病が強く疑われる者」、「糖尿病の可能性を否定できない者」は、総務省統計局「人口推計」の性・年齢階級別の全国人口を乗じて全国推計値を算出し、合計した。

図1 「糖尿病が強く疑われる者」と「糖尿病の可能性を否定できない者」の合計

表1 OGTT判定基準の変遷 (2000年まで)

WHO(1985)	JDS(1970)	NDDG(1979) WHO(1980)	JDS(1982)	ADA(1997) WHO(1998)	JDS(1999)
糖負荷量 50gまたは100g	50gまたは100g	75g	75g	75g	75g
糖尿病域 FBG(全血) ≥ 130 2hBG ≥ 130	糖尿病型 (静脈全血) 50gGTT: 1hBG ≥ 180 2hBG ≥ 130 100gGTT: 1hBG ≥ 180 2hBG ≥ 150 をともに満たすもの	糖尿病 FPG ≥ 140 または(および) 2hPG ≥ 200 NDDGでは30~90分値い づれかが ≥ 200であること	糖尿病型 FPG ≥ 140 または(および) 2hPG ≥ 200	糖尿病 FPG ≥ 126 または(および) 2hPG ≥ 200 (または随時血糖 ≥ 200+ 典型的症状)	糖尿病型 FPG ≥ 126 または(および) 2hPG ≥ 200 または 随時血糖 ≥ 200
境界域 2hBG: 110~129	境界型 糖尿病型でも正常型でも ないもの	IGT FPG < 140 かつ 2hPG: 140~199 NDDGでは30~90分値い づれかが ≥ 200であること	境界型 糖尿病型でも正常型でも ないもの	IGT 2hPG: 140~199 (測定してあれば FPG < 126) IFG 空腹時: 110~125 (測定してあれば 2hPG < 140)	境界型 糖尿病型でも正常型でも ないもの
正常域 2hBG(全血) < 110	正常型 FPG < 110 50gGTT: 1hBG < 140 2hBG < 100 100gGTT: 1hBG < 140 2hBG < 110 のすべてを満たすもの	正常(NDDGのみ) FPG < 115 かつ 2hPG < 140 30~90分値すべてが < 200であること (NDDG: 糖尿病、IGT、正 常以外はnon-diagnostic とする)	正常型 FPG < 110 かつ 1hPG < 160 かつ 2hPG < 120	正常(ADAのみ) FPG < 110 2hPG < 120	正常型 FPG < 110 かつ 2hPG < 140 ただし 1hPG ≥ 180は要注意

静脈血糖値をmg/dL示す(PG: 血漿値、BG: 全血糖)、FPG(FBG): 空腹時血糖値、1hPG(1hBG): 1時間血糖値、2hPG(2hBG): 2時間血糖値

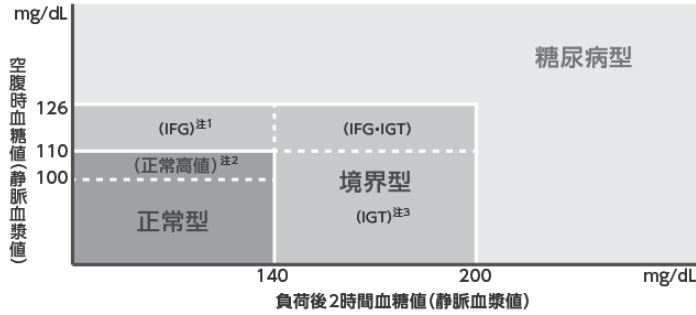
葛谷、内分泌・糖尿病・代謝内科Vol.32 No.1より

で空腹時血糖 140 mg/dL 以上または / および 2 時間値 200 mg/dL 以上としたが、「IGT」という表現は使わず「境界型」を引き続き使用することとした。

1997年 ADA は糖尿病と診断する血糖値の見直しを行った⁹⁾。75gOGTTの2時間値 200 mg/dL 以上の基準に変更はなかったが、空腹時血糖値は 126 mg/dL 以上に引き下げられた。さらに、日常診療では、空腹時血糖値のみで糖尿病の診断をすることを推奨し、空腹時血糖値のみ高値である IFG (impaired fasting glucose) が提唱された。1999年

WHOの委員会もこれに似た提案を行ったが、空腹時血糖値のみではなく臨床の場におけるOGTTの必要性を主張している¹⁰⁾。

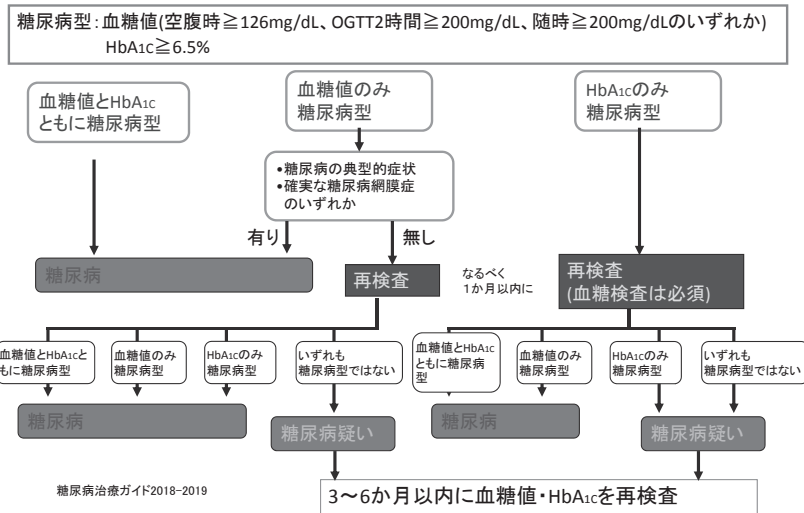
これらの報告を受けて、1999年 JDS は第3次委員会を設け、糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告を発表した³⁾。糖尿病分類については成因分類を重視し、診断に関しては、慢性の高血糖の確認が不可欠であることを反映した改訂である。空腹時血糖は 126 mg/dL 以上、75gOGTTの2時間値は 200 mg/dL 以上、随時血糖値 200 mg/dL 以上のい



注1) IFGは空腹時血糖値110～125 mg/dLで、2時間値を測定した場合には140 mg/dL未満の群を示す(WHO)ただしLADAでは空腹時血糖値100～125 mg/dLとして、空腹時血糖値のみで判定している。
 注2) 空腹時血糖値が100～109 mg/dLは正常域ではあるが、「正常高値」とする。この集団は糖尿病への移行やOGTT時の耐糖能障害の程度からみて多様な集団であるため、OGTTが勧められる。
 注3) IGTはWHOの糖尿病診断基準に取り入れられた分類で、空腹時血糖126 mg/dL未満、75gOGTT2時間値140～199 mg/dLの群を示す。

糖尿病治療ガイド2018-2019

図2 空腹時血糖値および75gOGTTによる区分



糖尿病治療ガイド2018-2019

図3 糖尿病の臨床診断のフローチャート

いずれかがあれば糖尿病型とし、空腹時血糖は110 mg/dL未満、75gOGTTの2時間値は140 mg/dL未満であれば正常型とする。糖尿病型でも正常型でもないものを境界型と区分した(図2)。臨床診断では、糖尿病型が2回以上確かめられれば糖尿病と診断できるが、1回だけのときは糖尿病型と呼ぶことにした。ただし、①典型的な糖尿病症状がある、②HbA1c (JDS) 6.5%以上、③糖尿病網膜症があれば、糖尿病型の血糖1回だけでも糖尿病と診断できるとした。

2003年ADAは空腹時血糖の正常上限を110 mg/dL未満から100 mg/dL未満に引き下げた¹¹⁾。IGTを見逃さないための判断であったが、WHOは2006年、空腹時血糖は100 mg/dL未満の基準は厳しすぎることを、空腹時血糖値のみの診断では大血管障害のリスクを反映しないことを理由に従来通りに戻した。JDSは2008年、空腹時血糖100～110 mg/dLに耐糖能異常者が多いことを認めて、この範囲を正常域の中の正常高値とすることとした⁸⁾。

2010年最後の改定までJDSは慢性の高血糖状態

の確認が不可欠という基本的立場を継承してきた。2010年の改定の最大の特徴はHbA1cを糖尿病型の判定基準に取り入れたことである¹⁾ (図3)。従来通りの血糖値の判定基準にHbA1cが加わり、HbA1cと血糖値がともに糖尿病型であれば1回の測定で糖尿病の診断が可能になった。ただし、HbA1cのみ2回糖尿病型であっても糖尿病とは診断できない。慢性の高血糖状態を反映する指標としてHbA1cが実績を積んできたためと考えられる。

2. HbA1c

HbA1cは、赤血球中のヘモグロビンがグルコースと非酵素的に結合した糖化タンパクで、過去1~2ヶ月の血糖平均値を反映する。血糖コントロールの指標として日常臨床や検診、国内外の大規模臨床研究において汎用されてきた。慢性の高血糖状態を反映する指標として確実な地位を築いたHbA1cであるが、HbA1cを判定基準に入れることに対して問題がないわけではなかった。主な問題について解説する。

1) カットオフポイント

カットオフポイントをどこで決めるかは非常に難しい問題である。糖尿病の慢性合併症には細小血管障害、大血管障害がありこの両者が予防できるカットオフ値が決定できることが理想であるが、大血管障害は高血圧症や脂質異常などの他の因子の関連が強くカットオフ値を決めるには限界があった。そこで、糖尿病において特異性の高い糖尿病網膜症の合併について検討することとなった。本邦では伊東らの報告で、糖尿病網膜症の頻度はHbA1c (JDS) 4.5%以下では0.06%であるがHbA1c (JDS) 6.1~6.5%では0.59%と明らかに上昇しており¹³⁾、カットオフ値を6.1%にした。一方、米国の改定では、48418名を対象としたDETECT-2¹⁶⁾の報告からカットオフ値の存在を得て、値は同様に6.5 (NGSP) %であった。さらに75gOGTTにおける血糖のカットオフ値との整合性もとれていた。今回のJDSの決定は、合併症の発症、血糖値との整合性¹⁷⁾、国際的な値との整合性も取れているものとなった。

しかし、欧米では近年の統計や数学的検討から、HbA1cのカットオフ値にはいまだ議論の余地があり、さらなる疫学研究が必要である^{18,19)}。

2) HbA1cの国際標準化

HbA1cの標準化については課題を残しているところである。日本では1999年の糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告で、糖尿病診断の補助手段としてはじめてHbA1c (JDS) 6.5%を取り入れられた³⁾。このころ、ADAでもHbA1cを診断に入れることの妥当性について検討されていたが、検査の標準化が進んでいないことなどを理由に見送っている⁹⁾。日本では1993年JDSにより「グリコヘモグロビンの標準化に関する委員会」が発足し1994年に安定型HbA1cを測定するために定めた標準物質 (JDSlot1) により標準化された²⁰⁾。その後、1995年に日本臨床化学会 (JSCC: Japan Society of Clinical Chemistry) においても「糖尿病関連指標委員会」が発足し、KO500法により安定型HbA1cをほぼ単離する方法ができ、これを基準測定操作法としてJSCC/JDSと設定した²¹⁾。標準物質JDSlot2よりこのKO500を用いて標準化物質の設定が行われ、日常検査法はこの標準物質にトレーサブルになる標準化が達成された。

一方、欧米では1型糖尿病を対象としたDiabetes Control and Complications Trial (DCCT) 研究のHbA1c基準測定施設 (レファレンスラボラトリー) を引き継ぐ形でNational Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) が発足した²²⁾。当時、NGSP値のトレーサビリティはHbA1cとして±0.7%であり大きすぎたのが問題であった。そもそも、標準化とは、測定対象物の定義、標準化体系として標準物質、基準測定法、ラボラトリーネットワーク、維持管理が必要である。このため、2007年ADA, European Association for the Study of Diabetes (EASD), The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), International Diabetes Federation (IDF) の国際学術4団体によりHbA1c測定の国際標準化に関するコンセンサスステートメントが発表された²⁴⁾。HbA1c (IFCC) はヘモグロビンのβ鎖N末端バリンに糖が共有結合したものをさし、IFCC法をアンカーとする測定体系で結果はmmol/molであらわすこととなった²⁵⁾。しかし、このIFCC値はいまだ一般的ではなく、JDSでは2012年4月より国際的に多くの国が使用しているNGSP値を採用することを決定した。IFCCは標準化がしっかりとれているが疫

学データなどの実績がない。NGSP値は標準化、特に特定対象物の定義があいまいではあるが、DCCT、UKPDS²⁶⁾など多くの臨床研究に使われた実績がある。昨今、ヨーロッパを中心として、IFCC値を使用する国も増えており今後本当の国際標準化が進められることが望まれる。

3) その他の問題点

HbA1cが診断基準に入ることの利点の一つには75gOGTTに比較してコストや時間的制約がないということである。ヨーロッパで糖尿病の診断のついていない人の3分の1は空腹時血糖値はで糖尿病域に入らず負荷試験でしか糖尿病と判定されない²⁷⁾。食事との関連もなくいつでも測定できるHbA1cはこのような人の診断にも有効である。日本の新しい診断基準では、1回の血糖値とHbA1cで糖尿病の診断ができるため、よりスピーディーに診断をつけられることが利点である。

一方、経済面ではHbA1cの測定は血糖値測定よりは高額になる。さらに、世界では、HbA1cが測定できない地域もある。さらに、すべての人がHbA1cにより糖尿病を診断できるわけではない。貧血はもとより異常ヘモグロビンを有する人もいるからである。この点において、日本のHbA1cのみでは糖尿病と診断できないという診断基準は妥当といえるであろう。

おわりに

診断の改訂は、単純な置き換えではなく、現行診断基準との連続性、エビデンスに基づいた科学的妥当性、海外の診断基準との整合性、臨床現場での実行可能性が必要であり困難な問題である。

診断基準の歴史の中で、日本は糖尿病の診断に関しては、慢性の高血糖の確認が不可欠であるという基本的方針を貫き、国際的整合性をとり、新たな指標を取り入れてきた。一方、米国では、簡易性を優先させた空腹時血糖のみの診断、その後の負荷後血糖の見直しやHbA1cの導入とフレキシブルであるかもしれないが、一貫した方針が見えない。このため、診断基準の改定のたびに糖尿病と診断される集団が変わってしまうリスクがある。

今後は世界全体で同じ診断基準に基づいて糖尿病の診断がつくことが望まれるであろう。現在は先進国でのみ話し合われているが、発展途上国の糖尿病

患者は爆発的に増加しており、疫学的にもグローバルな観点で診断基準を検討していくことが必要である。

世界中で施行でき、糖尿病を早期に発見するためこれからも診断基準を研ぎ澄ませて行くことが必要と思われる。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) Seino Y, Nanjou K, Tajima N, Kadowaki T, Kashiwagi A, Araki E, Ito C, Inagaki N, Iwamoto Y, Kasuga M, Hanafusa T, Haneda M, Ueki K. Report of the Committee of Japan Diabetes Society on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes mellitus. *J Japan Diab Soc* 2010, 53:450-467 (in Japanese)
- 2) American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 2010, 33 (Suppl 1):S62-69
- 3) The Committee of Japan Diabetes Society on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. Report of the Committee of Japan Diabetes Society on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes mellitus. *J Japan Diab Soc* 1999, 42:385-404 (in Japanese)
- 4) Kosaka K, Akanuma Y, Goto Y, Hakura A, Hirata Y, Kawate R, Kuzuya K, Mimura G, Nakayama H, Sakamoto N, Shigeta Y. Report of the committee on the diagnosis of diabetes mellitus. *J Japan Diab Soc* 1982, 25:859-866 (in Japanese)
- 5) Kuzuya N, Abe M, Ueda H, Kuzuya K, Kuzuya T, Kosaka K, Goto Y, Shigeta Y, Baba S, Hirata Y, Horiuchi A, Yamada K, Wada M. Report of the committee on the diagnostic criteria of the oral glucose tolerance test for diabetes mellitus. *J Japan Diab Soc* 1970, 13:1-7 (in Japanese)
- 6) Kadowaki T, Haneda M, Tominaga M, Yamada N, Iwamoto Y, Tajima N, Noda M, Seino Y, Kashiwagi A, Kuzuya H, Ito C, Nawada H, Yamauchi T. Report of the Japan Diabetes Society's Committee on the Diagnostic Criteria for Diabetes Mellitus and Glucose Metabolism Disorder - A new Category of Fasting Plasma Glucose Values: "high-normal". *J Japan Diab Soc* 2008, 51:281-283 (in Japanese)
- 7) National Diabetes Data Group: Classification and Diagnosis of Diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979, 28:1039-1057
- 8) WHO Expert Committee on the Diagnosis and Classification on Diabetes Mellitus:second report. *World*

- Health Organ Tech rep Ser 1980, 646:1-80
- 9) The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997, 20:1183-1197
 - 10) Alberti KG, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998, 15:539-553
 - 11) Genuth S, Alberti KG, Bennett P et al.: Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003, 26:3160-3167
 - 12) World Health Organization: Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/IDF Consultation. World health Org 2006
 - 13) Ito C, Maeda R, Ishida S, Harada H, Inoue N, Sasaki H. Importance of OGTT for diagnosis diabetes mellitus based on prevalence and incidence of retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2000, 49:181-186
 - 14) McCance DR, Hanson RL, Charles MA, Jacobsson LTH, Pettitt DJ, Bennett PH, Knowler WC. Comparison of tests for glycosylated hemoglobin and fasting and two hour plasma glucose concentrations as diagnostic methods for diabetes. *BMJ* 1994, 308:1323-1328
 - 15) Engelgau MM, Thompson TJ, Herman WH, Boyle JP, Aubert RE, Kenny SJ, Badran A, Sous ES, Ali MA. Comparison of fasting and 2-hour glucose and HbA1c levels for diagnosing diabetes; Diagnostic criteria and performance revisited. *Diabetes Care* 1997, 20:785-791
 - 16) Colagiuri S, Borch-Johnsen K. DETECT-2: early detection of type 2 diabetes and IGT. *Diabetes Voice* 2003, 48:11-13
 - 17) Ito C, Maeda R, Ishida S, Sasaki H, Harada H. Correlation among fasting plasma glucose, two-hour plasma glucose levels in OGTT and HbA1c. *Diabetes Res Clin Pract* 2000, 50:225-230
 - 18) Borch-Johnsen K, Colagiuri S. Diagnosing diabetes-time for change? *Diabetologia* 2009, 52:2247-2250
 - 19) Cowie CC, Rusk KF, Byrd-Holt DD, Gregg EW, Ford ES, Geiss LS, Bainbridge KE, Fradkin JE. Prevalence of diabetes and high risk for diabetes using A1C criteria in the U.S. population in 1988-2006. *Diabetes Care* 2010, 562-568
 - 20) Shima K, Endo J, Oimomi M, Oshima I, Omori Y, Katayama Y, Kanazawa Y, Kawai T, Kawamori R, Kanno T, Kiyose H, Nakashima K, Nagamine Y, Baba S, Hoshino T, Amino N. Interlaboratory difference in HbA1c measurement in Japan - A report of the committee on an interlaboratory standardization of HbA1c determination, the Japan Diabetes Society. *J Japan Diab Soc* 1994, 37:855-864 (in Japanese)
 - 21) Takei I, Okahashi M, Kuwa K, Hishinuma Y, Hoshino T, Tani A, Umemoto M, Miyashita T, Ishibashi M, Tominaga M, Nakayama T, Sanke T, Igarashi M, Koka K, Atsumi Y, Amemiya S, Sugo A, Nagamine Y. JSCC/JDS Standard Operating Procedure for HbA1c Measurement. *Jpn J Clin Chem* 2009, 38:163-176 (in Japanese)
 - 22) DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993, 329:977-986
 - 23) Bruns DE. Standardization, calibration, the care of diabetic patients. *Clin Chem* 1992, 38:2363-2364
 - 24) ADA, EASD, IFCC, and IDF. Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement. *Diabetes Care* 2007, 30:2399-4000
 - 25) Kobold U, Jeppsson JO, Dulffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for HbA1c based on peptide mapping. *Clin Chem* 1997, 30:1944-1951
 - 26) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998, 352:837-853
 - 27) The DECODE-study group on behalf of the EDESG. Will new diagnostic criteria for diabetes mellitus change phenotype of patients with diabetes? Reanalysis of European epidemiological data. *BMJ* 1998, 317:371-375

血液凝固反応過程プロファイル解析によるフィブリノゲン濃度の推定 —特に凝固時間の散乱光強度を利用する方法—

Estimate of Fibrinogen Concentration through Profile Analysis of Blood Coagulation Reaction Process. – Analytical Method using Scattered Light Intensity of Clotting Time –

三宅佳奈 高木 豊 田村祥子 末廣勇氣 白井一城
中島由美子 成定昌昭 森本 進 岸 恵 勝部康弘

Abstract Fibrinogen, a key substance in the blood coagulation system, is mainly measured by the Clauss method using an automated coagulation analyzer. And, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), etc. are also measured using an automatic analyzer. The final step of the blood coagulation reaction is Fibrinogen-fibrin conversion. This reaction process is used for blood coagulation tests. So far, we have estimated fibrinogen concentration from analysis of coagulation reaction curves using mathematical method and obtained good results. However, this method is not easy to use because it uses mathematical formulas. In the automated coagulation analyzer (CP3000), since clotting time is calculated based on the coagulation endpoint using a given time ratio, it is thought that fibrinogen concentration can be estimated from the scattered light intensity of clotting time. The correlation coefficient between scattered light intensity and fibrinogen concentration of PT and APTT measured by CP3000 is as good as 0.967 or more. Therefore, the scattered light intensity at the coagulation time can estimate fibrinogen concentration. The scattered light intensity of clotting time by CP3000 can be easily confirmed in the data file, so it seems to be a useful method to estimate the fibrinogen concentration.

Key words scattered light intensity, clotting time, Fibrinogen, PT-derived, CP 3000,

1. はじめに

フィブリノゲンは肝実質細胞で合成、分泌される分子量340kDaの巨大糖タンパクであり、血液凝固系の中心となる重要な物質である。出血部位ではフィブリンを形成して止血血栓をつくる機能の他に、血小板凝集反応にも関与する。また、急性相反応タンパクの1つとしても炎症、外傷、腫瘍などに伴って増加する¹⁻³⁾。フィブリノゲンの測定には患者血漿にトロンビン試薬を添加しフィブリン転化の過程から求めるClauss法の他に、免疫

比濁法、免疫拡散法、塩析法、チロジン法、重量法、PT-drive法 (PT-d法) など様々な測定法があるが⁴⁾、自動分析装置への適応性からClauss法が広く利用されている。また、Clauss法とは別の測定系であるが、プロトロンビン時間 (PT) や活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) などの検査も患者血漿と試薬によるフィブリン転化を利用して自動分析装置にて測定されている⁴⁻⁶⁾。これらの血液凝固検査は凝固反応の安定化フィブリンの形成過程を血漿流動の力学的変化や白濁化過程の光学的変化による凝固プロファイル曲線の解析から凝

Received May 27, 2019; Accepted Jul 8, 2019
Akina MIYAKE, Yutaka TAKAGI, Sachiko TAMURA,
Yuuki SUEHIRO, Kazushiro USUI, Yumiko
NAKAJIMA, Masaaki NARISADA, Susumu
MORIMOTO, Megumi KISHI, Yasuhiro KATSUBE
日本医科大学武蔵小杉病院 中央検査室
〒211-8533 神奈川県川崎市中原区小杉町1-396

Department of Clinical Laboratory, Nippon Medical
School Musashikosugi hospital, 1-396, Kosugi-
machi, Nakahara-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 211-8533
Corresponding author (連絡責任者): 高木 豊
TEL : 044-733-5181
E-mail : takagi-y@nms.ac.jp

固時間を求めており、曲線の吸光度差はフィブリノゲン濃度を反映するため、凝固プロファイル曲線の解析からフィブリノゲン濃度を求める手法がPT-d法として試みられてきたが⁷⁻⁹⁾、凝固終了付近の散乱光は緩やかに変動するため、フィブリノゲン濃度をPT-d法にて測定するには独自のアルゴリズムが必要となる⁴⁾。

これまでに、我々は凝固プロファイル曲線を解析し、数理法で求めた凝固終了点の散乱光強度からフィブリノゲン濃度を推定する試みをおこなってきたが^{10, 11)}、数式を用いるため容易に利用する事が困難であった。しかし、凝固終了点の散乱光強度から凝固時間を求める測定方法では¹²⁾、凝固終了点の散乱光強度は凝固時間の散乱光強度から逆算することも可能と思われ、凝固時間の散乱光強度からフィブリノゲン濃度を推定できると考えた。そこで、血液凝固自動分析装置CP3000 (CP3000)におけるPTおよびAPTTにおいて、凝固時間の散乱光強度からフィブリノゲン濃度を推定する手法を試みたの

で報告する。

2. 対象・試薬および散乱光強度の計測方法

1) 対象

日本医科大学武蔵小杉病院にて血液凝固検査の依頼があった入院・外来患者のPT：628検体およびAPTT：598検体の血液凝固反応過程プロファイルを解析に使用した。なお、本研究は本院倫理委員会の承認を得ている。

2) 測定機器試薬

測定機器は血液凝固自動分析装置CP3000 (CP3000：積水メディカル)を使用し、測定試薬はコアグピアPT-N (積水メディカル)、トロンボチェックAPTT-SLA (シスメックス)、コアグピアFbg (積水メディカル)を使用した。

3) CP3000による測定方法

凝固因子によって起こる凝固カスケード反応において (Fig. 1)、トロンピンによって切断されたフィブリノゲ

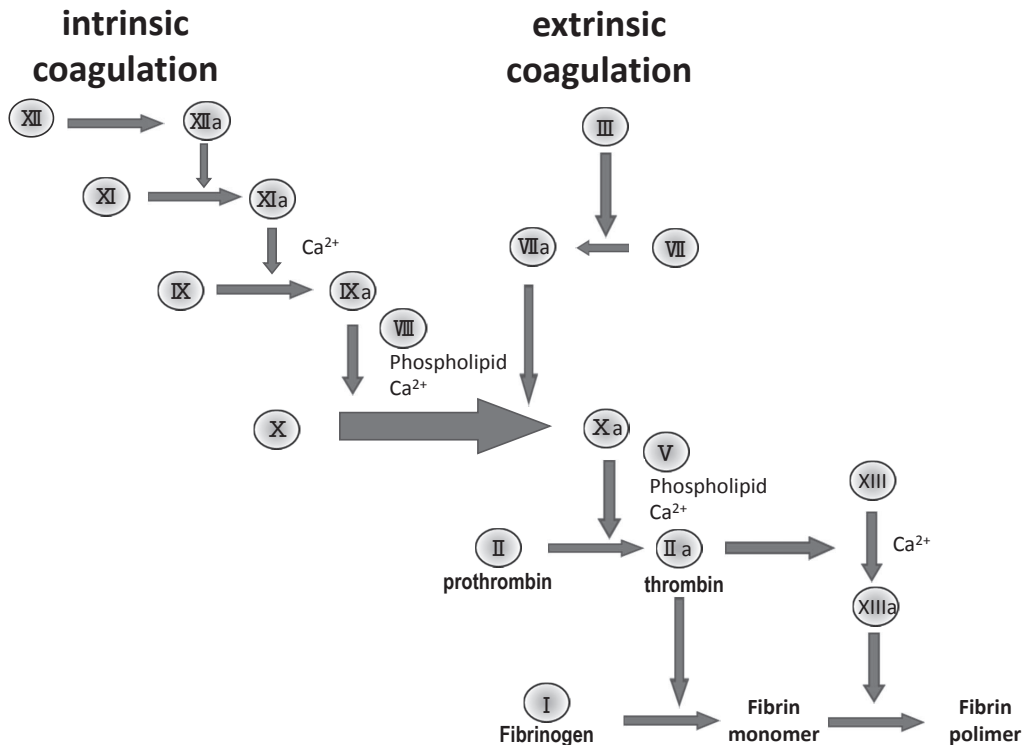


Fig. 1 Outline of the blood coagulation cascade reaction

This figure shows the outline of the blood coagulation cascade reaction. The blood coagulation cascade reaction converts fibrinogen to fibrin at the final stage. Many blood coagulation tests use this reaction. Clotting time is measured from the reaction process of Fibrinogen-fibrin conversion caused by mixing of specimen and reagent.

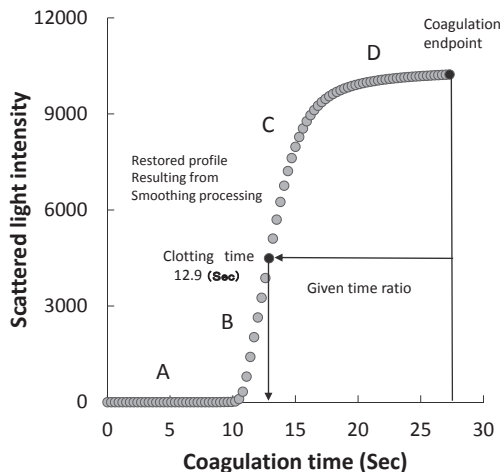


Fig. 2 Characteristic of the coagulation reaction curve by CP3000

This figure shows four processes of scattered light intensity change measured in the blood coagulation reaction process. The coagulation profile in the CP3000 changes to S shape. (A) The initial scattered light intensity increases slowly. (B) The scattered light intensity increases at a substantially constant. (C) The scattered light intensity increases again. (D) The scattered light intensity ultimately converges. Since the measured scattered light intensity fluctuates due to Brownian motion, the CP 3000 smoothes the scattered light intensity and converts it into a restored profile. The coagulation endpoint is defined as a point in time when the restoration profile is integrated at regular intervals and the ratio of adjacent integration results has become constant value. The clotting time calculates based on the coagulation endpoint using a given time ratio.

ンが次々と重合してフィブリンを生成し、逐次増大する分子量や粒径の変化を散乱光強度で計測することができる^{13, 14)}。CP3000では各試薬と血漿の混合で形成されるフィブリンの生成過程を、波長が660nmの高輝度発光ダイオード(LED)を用い、透過光の影響を避けるために入射光軸に対して90°の側方散乱光を0.1秒ごとに計測している。ブラウン運動による揺らぎのある計測データからスムージング処理した復元凝固プロファイルを作成し、一定時間ごとに積算して、隣り合う積算値の割合が一定値となった時点を凝固終了点として特定し¹²⁾、その所定比率における散乱光強度の測定時間を凝固時間としている(Fig. 2)。

3. 方法

1) 凝固時間における散乱光強度の確認方法

測定された凝固時間や散乱光強度は拡大プロファイル画面にて確認する。散乱光強度は目的とする項目の測定データ(Fig. 3A)から拡大プロファイルを表示させると、

主波長データ欄に表示され(Fig. 3B)、測定時間に対するデータが凝固時間における散乱光強度として求める。

2) 凝固終了点と凝固時間における散乱光強度の比率

CP3000では最終散乱光強度の所定比率より凝固時間を求めている。入院および外来患者の3.2%クエン酸加血漿を用い、PTおよびAPTTについて凝固終了点と凝固時間における散乱光強度の比率を解析した。なお、凝固終了点の散乱光強度はCP3000にて確認する事ができないため、凝固反応過程プロファイルのゴンベルツ成長曲線近似による数理法にて求めた凝固終了点の散乱光強度を使用した¹⁰⁾¹¹⁾。

3) 凝固終了点と凝固時間における散乱光強度の比較

入院および外来患者の3.2%クエン酸加血漿を用い、PTおよびAPTTについて凝固終了点と凝固時間における散乱光強度を比較した。

4) 散乱光強度とフィブリノゲン濃度の比較

入院および外来患者の3.2%クエン酸加血漿を用い、凝固時間における散乱光強度とClaus法によるフィブ

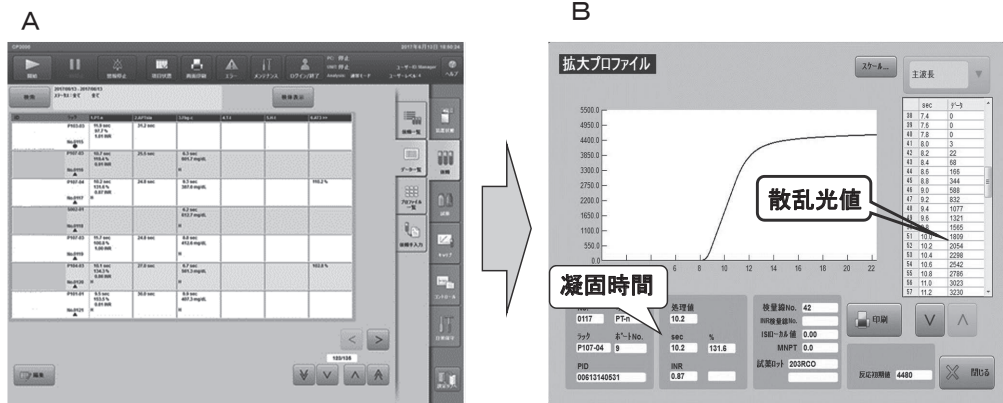


Fig. 3 How to determine the scattered light intensity of the coagulation time
 Clicking on the measurement item field on the data list screen (A) displays the enlarged profile screen. Data on measurement time and scattered light intensity are displayed on the enlargement profile screen (B). The measurement time and the scattered light intensity are displayed in the main wavelength data column. Scattered light intensity uses the data on the right of the clotting time. In this figure (B), the clotting time is 10.2 seconds and the scattered light intensity is 2054.

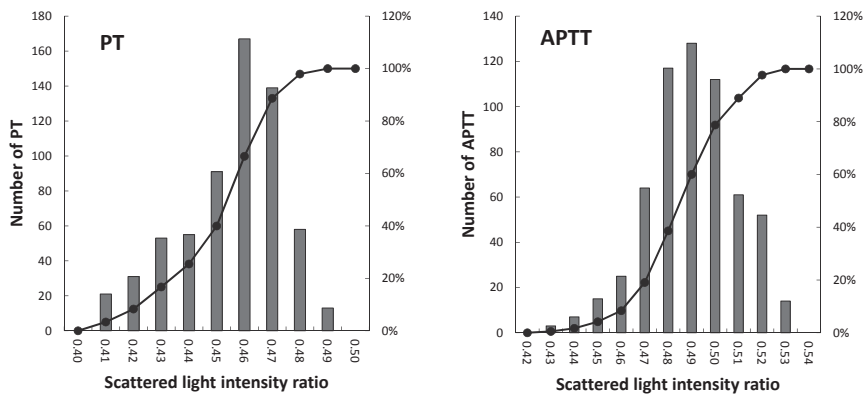


Fig. 4 Histogram of the scattered light intensity ratio at the coagulation endpoint and clotting time of PT and APTT.
 Clotting time is calculated based on the coagulation endpoint using a given time ratio. The average value of PT is 0.45 and the standard deviation is 0.18. The average value of APTT is 0.49 and the standard deviation is 0.19. In addition, the scattered light intensity of coagulation endpoint was calculated from the coagulation profile curve by the mathematical method from the Gompertz growth curve approximation.

リノゲン値を比較した。

4. 結果

1) 凝固終了点と凝固時間における散乱光強度の比率

数理法で求めた凝固終了点の散乱光強度と凝固時間における散乱光強度の比率を解析したところ、PTにおい

ては平均値0.45、偏差標準0.18、最大値0.49、最小値0.40、APTTにおいては平均値0.49、標準偏差0.19、最大値0.53、最小値0.42であった (Fig. 4)。

2) 凝固終了点と凝固時間における散乱光強度の比較

数理法で求めた凝固終了点の散乱光強度と凝固時間における散乱光強度を比較したところ、PTにおいて相関

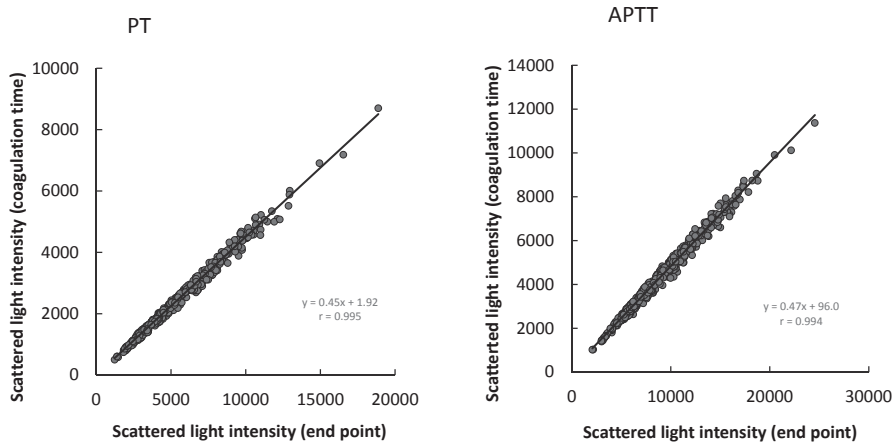


Fig. 5 Comparison of scattered light intensity between coagulation endpoint and clotting time
 Since the scattered light intensity between coagulation endpoint and clotting time is a predetermined ratio, the scattered light intensity between coagulation endpoint and clotting time is a good correlation.

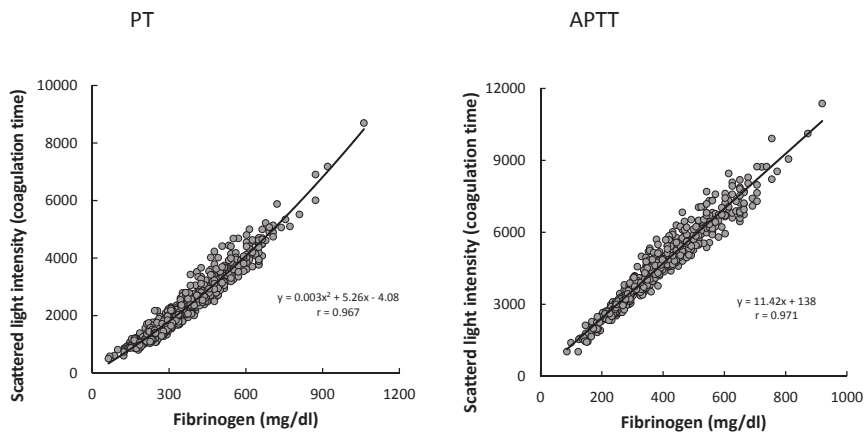


Fig. 6 Comparison of scattered light intensity of clotting time and fibrinogen concentration
 The scattered light intensity at clotting time was compared to the fibrinogen concentration. Since the correlation of the scattered light intensity between the coagulation endpoint representing the fibrinogen concentration and the clotting time is good, the fibrinogen concentration can be estimated from the scattered light intensity at the clotting time.

係数 $r = 0.995$, 回帰式 $y = 0.45x + 1.92$, APTTにおいては相関係数 $r = 0.994$, 回帰式 $y = 0.47x + 96.0$ であった (Fig. 5)。

3) 凝固時間における散乱光強度とフィブリノゲン濃度の比較

Clauss法によるフィブリノゲン濃度と凝固時間にお

ける散乱光強度を比較したところ、PTにおいて相関係数 $r = 0.967$, 回帰式 $y = 0.003x^2 + 5.26x - 4.08$, APTTにおいては相関係数 $r = 0.971$, 回帰式 $y = 11.42x + 138$ であった (Fig. 6)。フィブリノゲン濃度と凝固時間における散乱光強度の相関関係が良好であることから、フィブリノゲン濃度を推定する事は可能であると思われた。

5. 考察

凝固反応の進行に伴うフィブリノゲンのフィブリン転化により、分子量や粒径が増大するため、凝固反応過程の変化は散乱光を用いて計測することができる。

凝固プロファイル曲線の最終散乱光強度は血漿中のフィブリノゲン量と連動し、直線性があり¹⁰⁾、凝固時間と凝固終了点の散乱光強度は所定比率の関係にあると考え、凝固時間の散乱光強度からフィブリノゲン濃度の推定を試みた。CP3000における凝固過程の散乱光強度変化はFigure2のようにS状のシグモイド曲線を描き、(A)から(D)の4過程を経て反応が終了する。凝固反応が終了すると散乱光強度の増加は無くなるが、散乱光は揺らぎを伴いながら計測されるのでガラガラと変動するため、凝固終了点は凝固反応プロファイルを一定時間ごとに積算して、隣り合う積算値の割合が一定値となった時点としている。凝固点の解析方法はパーセント検出法、微分法や変曲点法など様々な方法があるが⁴⁾、CP3000は専用のアルゴリズムで特定した凝固終了点の所定比率における時間を凝固時間 (Sec) としている。本研究ではCP3000の凝固終了点における散乱光強度を確認することができないため、凝固プロファイルをゴンベルツ成長曲線で近似して求めた凝固終了点の散乱光強度を使用した^{10, 11)}。

PTおよびAPTTの凝固時間と凝固終了点における数値法の散乱光強度は相関係数が0.994以上と良好な結果を示し、散乱光強度の比率もPTにおいては平均値0.45、標準偏差0.18、APTTにおいては平均値0.49、標準偏差0.19と一定の比率範囲にあることから、凝固時間と凝固終了点の散乱光強度においても所定比率にあると推測し、凝固時間の散乱光強度からもフィブリノゲン濃度が推定できると考えた。そこで、フィブリノゲン濃度と凝固時間の散乱光強度の比較をおこなったところ、APTTにおいては1次回帰にて相関係数が0.971と良好な結果が得られたが、PTの1次回帰では低値において乖離する検体が見られたため、2次回帰を用いて解析したところ相関係数が0.967と良好な結果が得られた。

Clauss法によるフィブリノゲン濃度の測定は、クエン酸ナトリウムを添加して得た血漿を用い、フィブリノゲンからFPAが遊離する反応にてフィブリン検出の初期反応を測定する方法であり、トロンビンとフィブリノゲンの濃度に依存する一次反応である¹⁵⁾。また、フィブリノゲンにはA α 鎖をもつ高分子量フィブリノゲンの他に凝固時間が異なる二つの低分子化フィブリノゲンが存在し、凝固反応の速さは分子量が小さくなるにしたがっ

て遅延する¹⁶⁾。Clauss法は検体を希釈して過剰のトロンビンを用いることで分子多様性や線溶亢進患者、抗凝固薬治療患者などによる測定誤差を回避しているが^{16, 17)}、本法では高濃度以外は10倍希釈にて測定しているため、低濃度フィブリノゲンにおいて反応時間の遅延による感度低下などが危惧される¹⁸⁾。一方、試薬にカルシウムが含まれているPTおよびAPTTは安定化フィブリンの形成過程から測定している。しかし、反応溶液総量に対するサンプル量比率は同じであるがフィブリノゲン濃度を表す最終散乱光強度は必ずしも一致しない。血液凝固は反応が進むと分子量や粒径が増大し散乱光は変化する。その際、フィブリン量が多く、絡み合いが複雑であればその変化はさらに大きくなり、凝固検出の正確性や測定感度も向上する^{19, 20)}。また、pH・電気伝導度・浸透圧などの反応環境でもフィブリン重合反応は変化する^{20, 21)}。そのため、測定試薬にはフィブリンとの絡み合いを複雑にさせるデキストランなどの高分子物質や反応溶液の環境を最適にする物質を含有させているが、その組成や含有量は試薬ごとに異なる。フィブリノゲン濃度が100mg/dl付近ではAPTTはPTの約1.7倍の散乱光強度を示すように、散乱光強度の差は各試薬組成などによる反応性の違いと推察できる。フィブリン塊の粒径は光源波長より大きくなるため、測定はMie散乱の対象と考えられるが、凝固反応過程はゲルからゾルへ変化し、様々な大きさの粒子が分子量を増大させるため均一粒子系よりも複雑である²²⁾。測定機器では全信号からノイズや乳びなどを含むバックグラウンド信号を取り除き、目的の光散乱信号のみをより多く取り出すことで測定精度や感度などを向上させている^{14, 23)}。また、低活性検体ほど後方の低角度域に散乱光ピークがシフトする傾向が確認されており¹⁴⁾、低濃度域では測定感度が低下する可能性がある。これらのことから、PTの1次回帰におけるフィブリノゲン低値検体の乖離はClauss法の検体希釈や測定原理による影響とも考えられるが、今回使用したフィブリノゲン試薬は低域の直線性が約28mg/dlまで確認されている²⁴⁾。光散乱の測定原理および低域の散乱光強度値から推察すると、PT-N試薬を用いたCP3000による測定では低域の最終散乱光強度がフィブリノゲン濃度を正しく反映できないために乖離したと考えられる。このことはPTよりもAPTTの散乱光強度が大きいことから推察できる。しかしながら、APTTはヘパリンやリン脂質に対する自己抗体等の影響を受けるため注意が必要である。また、PTおよびAPTT試薬の多くは、本来フィブリノゲンの測定を考慮して作られたものではなく、専用のキャリブレーションも存在しない。そのた

め、正確なフィブリノゲン濃度を求めるのは極めて困難であり、現状では凝固時間の散乱光強度がフィブリノゲン濃度と相関することによる推定にとどめる必要がある。

これまでに、我々はCP3000の凝固プロファイル曲線の数理解析にて求めた最終散乱光強度からフィブリノゲン濃度の推定を試み良好な結果が得られているが¹¹⁾、数理法は計測データを取得し数式による計算が必要となるため、容易に利用する事は困難である。今回検討した凝固時間の散乱光強度は分析装置より容易に確認できるため、リアルタイムに利用する事が可能である。近年、反応過程を分析し、異常データや異常反応などを検出する試みが行われている。特に生化学の分野では反応系に起因する異常を検出する様々な方法が報告されている²⁵⁾。また、血液凝固分野においても凝固波形のパターンが臨床病態を示すことがあると報告されており^{26, 27)}、凝固プロファイル曲線の解析は新たな情報をもたらす可能性がある。散乱光強度はフィブリノゲン濃度を反映していることからフィブリノゲン濃度の推定のみならず、サンプリング量の指標などにも用いることが可能であり、検査結果の信頼性向上にも有用の方法と考えられる。しかし、強乳び検体やトロンビン阻害剤を服用した患者の検体は凝固プロファイル曲線の乖離や凝固時間の延長傾向が知られている^{6, 18, 28, 29)}。また、試薬は組成や製造方法が異なり、凝固点検出方法などの測定方法が測定機器によって異なる。そのため、本検討はCP3000によるPT-NおよびAPTT-SLA、Fbg試薬による結果であり、他の組み合わせでは同じ結果がでるとは限らないと思われる。

6. まとめ

CP3000における凝固時間と凝固終了点の散乱光強度は所定比率の関係にあり、凝固終了点の散乱光強度とフィブリノゲン濃度は良好な相関関係にある。Clauss法にて測定したフィブリノゲン濃度と凝固時間の散乱光強度においても良好な相関関係が得られたことから、凝固時間の散乱光強度からフィブリノゲン濃度を推定することは可能であると思われる。

本論文の要旨は第66回日本医学検査学会(2017)で発表した。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) 和田英夫, 長谷川圭, 坂口茜, 他:「【出血性疾患と臨床検査】出血傾向を示す代表的な疾患と臨床検査播種性血管内凝固症候群(DIC)」, *Medical Technology*, 2016;44:355-360.
- 2) 和田英夫, 松本剛史, 青田卓実, 他:「新しい検査から注目の検査まで臨床検査の"今"を網羅 今日の新しい臨床検査 選び方・使い方 血栓症マーカー」, *日本医事新報*, 2015;4778:38-42.
- 3) 財川英紀, 新保敬:「凝固・線溶検査の基礎とポイント 3.Fibrinogen」, *Medical Technology*, 2014;42:585-588.
- 4) 阪田光彦, 高宮脩:「凝固検査の測定原理とその特徴」, *Sysmex Journal*, 1998;21:1-7.
- 5) 栢森裕三:「凝固検査の標準化とその現状」, *生物試料分析*, 2009;3:347-348.
- 6) 涌井昌俊, 藤森佑多, 片桐尚子:「凝固検査を化学する(解説/特集)」, *臨床化学*, 2017;46:95-104.
- 7) I.J.Mackie, A.S.Lawrie, S.Kitchen, et al.: "A performance evaluation of commercial fibrinogen reference preparations and assays for Clauss and PT-derived fibrinogen", *Thromb Haemost*, 2002;87:997-1005.
- 8) Jeme WALLACE, Robert A. Dahms.: "Study of the PT-derived Fibrinogen Assay on the Sysmex CA-1000 and CA-5000 Automated Coagulation Analyzers", *Sysmex Journal International*, 1994;4:88-95.
- 9) A.S.Lawrie, S.J.McDonald, G.Purdy, et al.: "Prothrombin time derived fibrinogen determination on Sysmex CA-6000", *J Clin Pathol*, 1998;51:462-466.
- 10) 高木豊, 間宮一夫, 常木美智子, 他:「ゴンバルツ曲線を利用したプロトロンビン時間凝固プロファイル解析によるフィブリノゲン量の推定」, *JJCLA*, 2015;40:144-149.
- 11) 高木豊, 小河原佳奈, 田村祥子, 他:「血液凝固反応過程プロファイル解析によるフィブリノゲン濃度の推定—特に数理法にて求めた凝固終了点を利用する方法—」, *医学検査*, 2018;67:475-481.
- 12) 須長宏行:「全自動血液凝固分析装置コアプレスタ2000の特長とその有用性(測定原理からミキシングテストまで)」, *生物試料分析*, 2009;32:386-392.
- 13) 飯村康夫, 櫻林郁之介, 河合忠:「免疫グロブリンの検査法 光散乱法による定量」, *日本臨床*, 1984;42:1209-1213.
- 14) 大石晴樹, 他:「レーザー光散乱法を用いた多用途血液凝固測定装置の開発」, *JJCLA*, 1984, 9:64-70
- 15) Higgins DL, Lewis SD, Shaffer JA: Steady state kinetic parameters for the thrombin-catalyzed conversion of human fibrinogen to fibrin. *J Biol Chem*; 258:9276-9282, 1983
- 16) 巽典之: フィブリノゲン定量のための日常的標準測定法(案), *臨床病理*, 2001;49:1273-1279.

- 17) 橋本仙一郎：トロンビン時間法によるフィブリノーゲンの定量, 臨床病理;1973;21:615-620.
- 18) 島津千里：「血液検査 血液凝固検査 血液凝固自動測定機器によるPT, APTT, フィブリノーゲンの測定において, 高ビリルビン, 乳び, フィブリノーゲン低値検体では測定値をそのまま報告してはならない」, Medical Technology, 2001;29:1503.
- 19) 日本特許. 東亜医用電子, 米村勝, 血液凝固試薬, 特願平3-246740. 1991-8-30. 特許
- 20) 松本博志, 高山鉄郎, 松永仁, 他：合成高分子素材の血液凝固因子活性におよぼす影響について とくにポリプロピレンとその共重合体ならびにポリアמיד系化合物(ナイロン)について, 人工臓器;1982;11:908-911.
- 21) 米村勝, 他：「プロトロンビン試薬の反応機序(解説)」, Sysmex J, 1998;21:98-104.
- 22) 岩井俊昭 岡本卓 朝倉利光：光散乱現象研究の展開 - 単一散乱から多重散乱まで -, 応用物理;1994;63:14-22.
- 23) 日本特許. 島津製作所, 谷水弘治, 鈴木一弘, 血液凝固分析装置, 特開平2010-217059. 2010-9-30. 特許
- 24) 西村敏治, 菊地美幸, 堀内啓：液状フィブリノーゲン測定試薬「コアグピアFbg」の基礎的検討, 医学と薬学;2007;58:447-452.
- 25) 山本慶和：「反応過程を用いた反応系に起因する異常の検出」, JJCLA, 2009;34:163-169.
- 26) 松本剛史, 和田英夫：「凝固マーカーと凝固波形解析(解説/特集)」, 臨床病理レビュー, 2004;130:66-72.
- 27) 松本 智子：MT Seminar 凝固波形解析の活用法と見方(解説), Medical Technology, 2018;46:66-71.
- 28) 野木 岐実子, 川杉和夫, 松澤真由美, 他：「直接型トロンビン阻害薬ダビガトラン投与時におけるプロトロンビン時間, 活性化部分トロンボプラスチン時間の変動」, 医学検査, 2017;66:478-485.
- 29) 加藤庸介：「検体検査のピットホール(血液学検査)」, 臨床病理, 2016;64:586-594.

臨床検査値の個人内変動と多様性 (血球計数・白血球分画)

Intra-individual Variation and Diversities in Blood Cell Counts

磯部和正^{1)*} 内藤麻美²⁾ 南木 融³⁾ 川上 康¹⁾

Abstract *Aim:* Factors contributing to data variability arise from measurement processes, intra-individual biological variation, and individual differences due to genetic or other factors. We previously reported such intra-individual variation in 13 serum constituents. Here, we here examined the intra-individual variation in blood cell counts.

Method: We recruited 33 volunteers (9 men and 24 women, aged 25–61 years). A 2-mL blood sample was obtained at 5 pm 4 times within a period of 2 months from each participant to measure blood constituents (RBC, Hb, Ht, PLT, RET, WBC, Band%, LYM%, MONO%, EOS%, BASO%).

Results: The mean intra-individual coefficient of variation was less than 5% for RBC, Hb and Ht; 5% to 10% for PLT and WBC; and more than 10% for RET and WBC fractions. Interestingly, Ht levels significantly correlated with AST ($r=0.523$, $p=0.002$) and ALT ($r=0.533$, $p=0.001$).

Conclusion: Blood cell count data from 33 healthy individuals showed marked individual differences. Therefore, we emphasize that, with respect to blood cell counts, defining 'normal' is to be done carefully.

Key words blood cell counts, intra-individual variation, diversities

1. はじめに

生理的変動幅については本邦においても数多くの報告がなされている。

生理的変動幅は、電解質においては小さいものの、含窒素成分や酵素、糖、脂質においては変動の大きい項目がある。変動の大きい項目であっても、個人によってその変動幅は大きく異なる。しかしながら個々の生理的変動は平均化して精度管理の指標として用いることが目的であり、個人のバラツキの原因などについて検討はあまりなされていなかった。われわれは生化学検査項目13項目において検討を行い既に本誌に報告した¹⁾。

血球計数における生理的変動幅の報告は少なく、本邦

においては和田らの報告²⁾があるのみである。望月ら³⁾は末梢血球数および血小板凝集能の日内変動について報告している。Katsunumaら⁴⁾は、総白血球数が日内変動や年次変動を示すが、その変動幅は個人によって異なるとしている。Baldwaら⁵⁾は、好中球が午前到低値夕方高値の日内変動を示し、女性の性周期、喫煙などの影響を受けると報告している。Neriishiら⁶⁾は、Hb, Htの季節変動が日本においてはあると報告している。

このように生理的変動に関する報告はあるが、変動幅が個人によって異なる点に着目した検討報告は少ない。今回、血球計数および白血球分画においても同様に体内変動の個体間差について検討を行い、先行研究との比較を行い、さらに相関関係について回帰分析による検討を

Received Jul. 17, 2019; Accepted Sep 20, 2019
Kazumasa ISOBE^{1)*}, Asami NAITO²⁾, Toru NANMOKU³⁾, Yasushi KAWAKAMI¹⁾

¹⁾筑波大学医学医療系臨床検査医学

Faculty of medicine, University of Tsukuba, Japan

²⁾つくばi-Laboratory LLP

Tsukuba i-Laboratory LLP

³⁾筑波大学附属病院検査部

Division of Laboratory, University of Tsukuba Hospital, Japan

*Corresponding author: Kazumasa Isobe

Tel/Fax: 81-29-853-3054

E-mail: k-isobe@md.tsukuba.ac.jp

Table 1 Assay tests, reference intervals and measurement methods.

	項目名	単位	基準範囲	測定方法
血球計数	RBC	10 ⁴ / μ L	男性 427-570 女性 376-500	シーフローDC 検出法
	Hb	g/dL	男性 14-18 女性 12-16	SLS-ヘモグロビン法
	Ht	%	男性 40-52 女性 33.5-45.0	シーフローDC 検出法
	PLT	U/L	150-350	
	RET	%	8-22	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー
	WBC	/ μ L	4000-9000	
白血球分画	SEG	%	45-55	目視確認
	Band	%	3-6	
	LYM	%	25-45	
	MONO	%	4-7	
	EOS	%	1-5	
	BASO	%	0-1	

行った。

2. 対象および方法

1) 対象

筑波大学の職員、学生、筑波大学附属病院の職員に対し被験者募集広告の掲示により本研究への参加を呼びかけ、被験者を募集し研究の対象とした。健康成人ボランティア33名（男性9名、女性24名：年齢25～61歳）について対象とした。健康人とは明らかな疾患を有せず投薬もない人とした。

2) 方法

個人内変動の個人間差：健康成人ボランティア33名に対し、2017年4月から6月までの各月1回午後5時に採血を行い、直ちに自動血球分析装置（sysmex XN3000）で測定を行った。白血球分画の目視は顕微鏡を用いた。得られた結果から、個人ごとに変動係数（CV%）を算出して、個体内変動の大きさとした。

なお、本研究は筑波大学附属病院の臨床研究倫理審査委員会の承認（H28-230）を得ている。

3) 検討項目

血球計数検査：RBC、Hb、Ht、PLT、RET、WBC、Band、LYM、MONO、EOS、BASO

測定項目の単位、基準範囲、測定方法、装置についてはTable 1に示した。運動習慣、BMI、喫煙についても調査を行った。

4) 統計方法

Friedman検定によって評価し、 p 値が0.05未満を有意であるとした。関連多群多重比較にはDunnett法を用いて対照群との差の有意性について評価した。正規性の検討は、 χ^2 乗検定、歪度検定、尖度検定を用いた。相関はPearson解析を用いて相関係数と確率を求めた。重回帰分析を行い相互の相関関係について検討を行った。赤血球数と関連が考えられるLD、AST、ALT値および性別も加えて検討をおこなった。

解析ソフトはStatflex ver.6（アークテック株式会社）を用いた。

3. 結果

1) 各検査項目の個人間の分布解析

Table 2に各検査項目33人分の検査値の最低値、平均値、最高値とSD、CVをそれぞれ示した。

個人間の平均値の変動係数は、10%以下のものはRBCやHtであり、10-30%のものはHb、PLT、RET、WBC、LYM%であり、30%以上のものは、Band%、

Table 2 Values for inter-individual variations in the test results. We recruited 33 volunteers (9 men and 24 women, aged 25 – 61 years). For each participant, we measured the levels of 11 blood constituents and calculated the values.

項目名	最低値	平均値	最高値	SD	CV%
RBC 10 ⁶ /μL	3.51	4.55	5.34	0.37	8.09
Hb g/dL	8.7	13.3	16.2	1.57	11.8
Ht %	29.3	40.6	48.0	3.99	9.83
PLT U/L	146	282.1	456	66.8	23.7
RET %	8.0	14.1	27.0	3.76	26.6
WBC 10 ³ /μL	4.2	6.86	10.1	1.36	19.9
Band %	0	0.41	5.0	0.88	216
LYM %	14.0	35.2	61.0	8.71	24.7
MONO %	1.5	4.79	11.0	2.06	42.9
EOS %	0	2.98	15	2.61	87.3
BASO %	0	0.96	3.0	0.83	86.2

Table 3 Values for intra-individual variations in the test results. We recruited 33 volunteers (9 men and 24 women, aged 25 – 61 years). For each participant, we measured the levels of 11 blood constituents 4 times within a period of 2 months and calculated the values.

項目名	最低 CV 値%	平均 CV 値%	最高 CV 値%	SD	CV
RBC	0.22	2.70	6.37	1.91	70.7
Hb	0.73	2.65	5.37	1.41	53.1
Ht	0.56	2.52	6.1	1.60	63.57
PLT	0.23	5.15	16.3	3.17	61.6
RET	0	16.1	179	30.5	189
WBC	0.9	8.11	17.0	4.33	53.4
Band	41.7	143	173	41.8	29.2
LYM	2.75	15.7	52.4	10.4	65.9
MONO	0	31.5	81.1	18.7	59.5
EOS	0	51.6	125	27.7	53.6
BASO	0	73	173	40.6	55.6

Table 4 Correlations (r) among the values of the laboratory tests. The correlations among the mean values of the 9 laboratory tests are summarized below.

	SEX	AST	ALT	LD	RBC	Hb	Ht	PLT	RET
AST	0.509 0.003**								
ALT	0.474 0.005**	0.816 0.000**							
LD	0.187 0.296	0.639 0.000**	0.598 0.000**						
RBC	0.210 0.240	0.379 0.030*	0.416 0.016*	0.313 0.076					
Hb	0.454 0.008**	0.498 0.003**	0.516 0.002**	0.263 0.000**	0.671 0.000**				
Ht	0.408 0.019*	0.522 0.002**	0.533 0.001**	0.316 0.000**	0.753 0.000**	0.981 0.000**			
PLT	-0.242 0.175	-0.158 0.381	-0.250 0.144	-0.091 0.314	-0.181 0.314	-0.496 0.003**	-0.473 0.005**		
RET	0.045 0.805	-0.023 0.898	0.293 0.098	-0.077 0.672	0.270 0.129	0.365 0.037*	0.311 0.078	-0.304 0.0859	
WBC	-0.228 0.202	-0.158 0.381	0.061 0.738	-0.017 0.925	0.050 0.784	-0.255 0.152	-0.258 0.148	0.572 0.001**	0.064 0.726

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ in bold

MONO%, EOS%, BASO%であった。

すなわち赤血球数関連は概ね個人間差は小さいが、PLT, RET, WBCは個人間差が大きいことが示された。

2) 各検査項目の個人内変動の分布解析

Table 3に各検査項目の33人分の個人内変動の最低値、平均値、最高値とSD、CVを示した。

個人内の変動係数の平均値は、5%以下の小さいものはRBC, Hb, Htであり、5-10%の中程度のものはPLT, WBCであり、10%以上の大きいものはRET、白血球分画であった。健常人であってもバラツキ具合は個人によって異なり、まったく変化のない人から大きく変わる人までいた。

3) 各検査項目の相関 (Table 4)

性別との関連が認められたのは、AST, ALT, Hb, Htであった。

個人ごとの平均値の比較では、ASTは、ALT($r=0.816$, $p=0.000$), LD ($r=0.639$, $p=0.000$), RBC ($r=0.379$,

$p=0.030$), Hb ($r=0.498$, $p=0.003$), Ht ($r=0.522$, $p=0.002$)に高い相関が認められた。ALTでは、LD ($r=0.598$, $p=0.000$), RBC ($r=0.416$, $p=0.016$), Hb ($r=0.516$, $p=0.002$), Ht ($r=0.533$, $p=0.001$)に高い相関が認められた。当然ながらRBC, Hb, Ht間に高い相関が認められた。

またPLTはHb ($r=-0.496$, $p=0.003$), Ht ($r=-0.473$, $p=0.005$)には有意な負の相関が認められた。WBC ($r=0.572$, $p=0.001$)とは有意な正の相関が認められた。RETはHb ($r=0.365$, $p=0.037$)と正の相関が認められた。

4. 考察

今回の赤血球関連の項目は個人間変動も個人内変動も小さかった。和田らの報告²⁾でも同様の数値であった。これは恒常性を保つことが生命維持に共通に重要であるためと考えられる。血球計数は測定機器の精度向上により、日常検査の正常管理血球の変動係数は非常に小さい。

血球計数の機種間差や個人内変動の大きい個人が問題となるかもしれない。健常人の変動要因としては、女性の生理、激しい運動、多量の飲水などが考えられる。季節変動も大きな要因と考えられるが、この影響も個人差があると報告されている⁶⁾。

血小板、網状赤血球、白血球関連の項目は個人間変動も個人内変動も大きかった。これらの項目はそれぞれの項目によってダイナミックに変動することで生命活動に寄与していると思われる。Katsunumaら⁴⁾も同様に1962年に総白血球数の個人内の変動が各個人によって異なりその変動パターンも違うと報告している。12人の健常人男性を対象としたTurkの計数板を用いた50年前の検討報告ではあるが実に洞察力に富んだ研究である。これらの項目においては、変動幅の違いが多様性によるものなのかあるいは環境や生活習慣によるものなのか変動要因の解析が必要と思われる。健常人の変動要因としては、微小な出血や感染などが考えられる。好中球の変動要因としては、日内変動・喫煙・女性の性周期などが報告されている⁵⁾。

検査値の項目間の関連を検討するために平均値の回帰分析を行ったところ、いくつかの項目間で有意な相関が認められた。有意な性差が認められたのは、AST、Hb、Htであり、これは女性の生理のための出血が要因であると思われる。

AST、ALTはLD、RBC、Hb、Htと有意な相関が認められた。健常人における血清AST、ALT値は大量に存在する赤血球由来なのかもしれない。すなわち溶血を起こしていなくとも、AST、ALTが血球から滲みだしているものと考えられる。健常人の基準範囲においてAST、ALTは赤血球由来なのかもしれない。

またPLTはHb、Htと有意な負の相関が認められた。これは生体内で起きている微小な出血に対してPLTの増減が逆相関しているのかもしれない。WBCとは有意な正の相関が認められたが、出血や炎症などに共同して増減しているのかもしれない。

様々な生体成分は合成から運搬そして分解・排泄に至るまでの過程において調節され、成分によっては恒常性が保たれていると考えられ³⁾⁻⁵⁾、その一つ一つの過程はおそらく個人の遺伝的多様性によって異なっているものと思われる。それに加えて各個人の生活習慣や環境などが影響して健常人における多様性を生み出しているのであろう。

5. 結語

健常人の血液検査基準範囲の分布は検査項目によって幅の狭い赤血球数から幅の広い白血球分画まで様々である。理想的には個人の基準範囲を求めておくべきとされている。今回の検討では、血液学的検査項目の変動係数も個人によって異なることを明らかにした。検査値の生理的変動幅は個人によって異なっている。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) 井上慶子, 及川仁, 南木融ほか. 日本臨床検査自動化学会誌2019;44(3):193-199.
- 2) 和田結, 辛島貴人, 井上恵ほか. 血液凝固検査・血球計数・生化学検査の生理的変動幅と許容誤差限界の設定. 臨床化学 2003;32:200-209.
- 3) 望月則子, 小椋盛孝, 丸山一伸ほか. 健常成人男子を対象とした臨床検査値の日内変動. 臨床薬理 20(1):215-216, 1989.
- 4) Katsunuma H, Koizumi A. A contribution to the knowledge of normal variation in total leucocyte count. Jpn J Physiol. 1962;12(3):251-256.
- 5) Baldwa VS, Goyal RK, Garg KC, et al. Physiological and clinical studies on norms and variations in counts of circulating basophile leucocytes. Jpn J Physiol 1977;27(1):13-26.
- 6) Neriishi S, Fukushima K, Sagan LA. Seasonal variation in hemoglobin concentration and hematocrit value. Jap J Trop Med Hyg. 1973;1(1):39-50.

新規液状化試薬であるコアグジェネシスPT およびコアグジェネシスFbgの性能評価

The Performance Evaluation of Novel Liquid Type Coagulation Reagents; COAG-GENESIS PT and COAG-GENESIS Fbg.

榎谷亮太¹⁾ 森田一馬¹⁾ 牧亜矢子¹⁾
門脇 淳²⁾ 久保田芽里¹⁾ 岡田仁克¹⁾

Abstract We evaluated new prothrombin time (PT) and fibrinogen reagents developed by LSI MEDIENCE. COAG-GENESIS PT (PT-LSIM) contains human recombinant tissue factor and synthetic phospholipids. COAG-GENESIS Fbg (Fbg-LSIM) is based on thrombin time method. Within-run coefficient of variation (CV) and between-day CV of PT-LSIM were obtained in the range of 0.27, 1.28% and 0.53, 1.37% respectively. As well, within-run CV and between-day CV of Fbg-LSIM were obtained in the range of 1.13, 1.38% and 0.94, 1.54% respectively. The correlation between PT-LSIM and reference reagent, and between Fbg-LSIM and reference reagent were $y = 1.064x - 0.624$ ($r = 0.985$), $y = 0.945x - 16.02$ ($r = 0.999$) respectively. The extrinsic coagulation factor sensitivity of PT-LSIM were good as well as the reference reagent. Dilution linearity of Fbg-LSIM was up to 700 mg/dL and its low limit of detection was 24 mg/mL.

Our study suggests that PT-LSIM and Fbg-LSIM are stable and sensitive as well as the reference reagents. Furthermore, we expect that new liquid type reagents may contribute the efficiency of the laboratory users for omitting the reconstitution process.

Key words PT, Fibrinogen, liquid type reagent

1. はじめに

プロトロンビン時間 (prothrombin time: 以下PT) は血管外の因子である組織因子が第VII因子を活性化することによって始まる外因系凝固反応を反映する検査であり¹⁾, 第VII因子をはじめとするビタミンK依存性凝固因子の欠乏や肝障害, 播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation: 以下DIC) など, 種々の臨床症状に応じて凝固時間が延長する。また, PTは古くからワルファリン服用時のモニタリング

に有用かつ重要な検査であり²⁾, 近年では直接経口抗凝固薬 (direct oral anticoagulants: 以下DOACs) 服用時の指標としてもその有用性が検討されている³⁾。

フィブリノゲン (fibrinogen: 以下Fbg) は分子量が約33万の巨大な可溶性の急性期相蛋白であり, 凝固反応に最も重要な蛋白である。凝固カスケードの働きで生成されたトロンビンの作用によりFbgはフィブリン塊となり, 凝固第XIII因子が最終的に不溶性の安定化フィブリンを形成させることで凝固反応が完了する。血中Fbg測定にはトロンビン時間法 (Clauss法)⁴⁾, 免疫比濁法, 免疫拡散法, 血液凝固反応過程プロファイル解析

Received Apr. 8, 2019; Accepted Aug. 16, 2019

Ryota MASUTANI¹⁾, Kazuma MORITA¹⁾, Ayako MAKI¹⁾, Atsushi KADOWAKI²⁾, Meri KUBOTA¹⁾, Yoshikatsu OKADA¹⁾

¹⁾大阪医科大学附属病院中央検査部

〒569-8686 大阪府高槻市大学町2-7

²⁾株式会社LSIメディエンス 診断薬事業本部

〒289-2247 千葉県香取郡多古町水戸字水戸台1460-6

¹⁾Central Laboratory, Osaka Medical College Hospital, 2-7 Daigaku-machi, Takatsuki, Osaka 569-8686, Japan

²⁾LSI Medience Corporation, 1460-6.Mitodai, Mito, Takomachi, Katori-gun Chiba 289-2247, Japan

Corresponding author: 榎谷亮太

TEL: 072-683-1221 (代)

E-mail: kns065@osaka-med.ac.jp

Table 1 The composition of reagents.

PT	試薬名	組成	ISI	メーカー
検討試薬	コアグジュネシス PT (PT-LSIM)	遺伝子組み換えヒト組織因子/合成リン脂質	1,019 ^{※1}	LSIメディエンス社
対照試薬	ヒーモスアイエル リコンビラスチン2G (PT-IL)	遺伝子組み換えヒト組織因子/合成リン脂質	1,030 ^{※2}	アイ・エル・ジャパン社

※1 添付文書に記載のISI
※2 当院設定のlocal SI

Fbg	試薬名	組成	トロンビン単位 (IU)	メーカー
検討試薬	コアグジュネシス フィブリノゲン (Fbg-LSIM)	ウシトロンビン	100	LSIメディエンス社
対照試薬	ヒーモスアイエル フィブ.C (II) (Fbg-IL)	ウシトロンビン	35	アイ・エル・ジャパン社

によるPT-derived法⁵⁾などがあり、現在本邦において最も汎用されているのはClauss法である⁶⁾。Fbg測定において、特に臨床的に意義が高い低濃度域における検査の正確性および検出感度が重要である。

現在、市場に流通しているPTおよびFbg試薬の多くは凍結乾燥品であるため、試薬を使用する際は溶解などの用時調製を行う必要がある。国際標準化機構 (international organization for standardization: 以下ISO) で求められる品質保証を担保するにあたって、正確な凝固検査を行うためには適切な試薬の調製は必要不可欠であるが、時として試薬の調製不良のため溶解した試薬が使用出来ないことが生じる。試薬の溶解時におけるピペッティング操作や溶解にかかる手順は不確かさの一因であり⁷⁾、試薬調製の不良によるコストの増大や試薬溶解の煩雑さは検査の担当者にとって負担になっている。そのため、活性化部分トロンボプラスチン時間試薬と同様にPTおよびFbg試薬においても液状化試薬が望まれている。

今回我々は、LSIメディエンス社から新規に発売された用時調製不要の液状化PT試薬であるコアグジュネシスPT (以下PT-LSIM) および、Clauss法を原理とする用時調製不要の液状化Fbg試薬であるコアグジュネシスFbg (以下Fbg-LSIM) の基礎的性能評価を行う機会を得たので報告する。

2. 材料及び方法

1) 材料

(1) 対象

当院検査部に提出され、同意が得られた患者の3.2% クエン酸ナトリウム加血漿の残余検体435検体および、同意が得られた健康人ボランティア45検体を使用した。本検討は大阪医科大学臨床研究倫理審査委員会の承認 (承認番号 2347) を得て行なった。

(2) 測定機器

測定機器には全自動臨床検査システムSTACIA (LSI

メディエンス社) を用いた。

(3) 測定試薬

a) PT

検討試薬としてコアグジュネシスPT (PT-LSIM) (LSIメディエンス社) を、対照試薬としてヒーモスアイエルリコンビラスチン2G (以下PT-IL) (アイ・エル・ジャパン社) を用いた。

b) Fbg

検討試薬としてコアグジュネシスFbg (Fbg-LSIM) (LSIメディエンス社) を、対照試薬としてヒーモスアイエル フィブ.C (II) (以下Fbg-IL) (アイ・エル・ジャパン社) を用いた。

なお、試薬の組成はTable 1に示す。

2) 方法

(1) 併行精度

PT-LSIM, Fbg-LSIMともに、正常域および異常域の自家調製プール血漿 (n = 20) を用いて、それぞれ20回連続で測定し、平均値、標準偏差 (standard deviation: 以下SD) および変動係数 (coefficient of variation: 以下CV) を算出した。

(2) 日差再現性

併行精度で用いたものとは異なる正常域および異常域の自家調製プール血漿 (n = 20) を -80℃で凍結保存した。これを使用時に37℃恒温槽にて3分間融解して用いた。試薬を機器に搭載した状態で二重測定した平均値をその日の測定値とし、10日間の平均値、SDおよびCVを算出した。

(3) 共存物質の影響

干渉チェック・Aプラス (シスメックス社) を用いて抱合型ビリルビン (以下ビリルビンC)、遊離型ビリルビン (以下ビリルビンF)、溶血ヘモグロビン、乳びの影響を確認した。干渉チェック・Aプラスは添付文書に従ってそれぞれ10濃度を作製し、各濃度の検体を二重測定した平均値を比較して、PT-LSIMにおけるPT測定への影響および、Fbg-LSIMにおけるFbg測定への影

響を確認した。なお、共存物質が0濃度との比較で、変化率が10%以内である場合に影響無しと判定した。

(4) 対照試薬との相関

a) 患者検体のPTの相関

無作為に抽出したルーチン検査終了後の患者残余検体435例を用いて、PT-LSIMとPT-ILにおける凝固時間の相関係数を算出した。

b) ワルファリン服用検体におけるPTの相関

ワルファリン服用患者で国際標準比 (international normalized ratio : 以下INR) が2.0以上の検体71例を用いてPT-LSIMとPT-ILにおけるINR値での相関係数を算出した。PT-LSIMの国際感度指数 (international sensitivity index : ISI) は添付文書に記載のメーカー表示値を使用し、PT-ILは、ヒーモスアイエル ISIキャリプレート (アイ・エル・ジャパン社) を用いてローカルSIを設定した。

c) 肝機能障害患者検体におけるPTの相関

肝機能障害患者検体にはChild Pugh 分類⁸⁾が7点以上の検体 (n=52) を用いてPT-LSIMとPT-ILにおける活性%での相関係数を算出した。PT-LSIM及び、PT-ILの活性%は、それぞれ各メーカー推奨の標準血漿であるコアグジュネシス キャリプレーター (LSIメディアエンス社) およびヒーモスアイエル キャリプレーション血漿 (アイ・エル・ジャパン社) を用いて作成した検量線から算出した。

d) 患者検体のFbgの相関

PTの相関と同様に、無作為に抽出したルーチン検査終了後の患者残余検体50例を用いてFbg-LSIMとFbg-ILにおける相関係数を算出した。

(5) 健常人検体測定値の比較

健常人ボランティア45名から採取した検体を用いてPT-LSIMおよびPT-ILのPT秒を測定した。測定した検査値の分布中央の95%である、95%信頼区間 (confidence interval : 以下CI) を算出し、95%CIにより設定した健常人検体の測定範囲を比較した。同様に、健常人ボランティア45名から採取した検体を用いてFbg-LSIMおよびFbg-ILを測定し、95%CIにより設定した健常人検体の測定範囲を比較した。

(6) 外因系凝固因子感受性

PTが正常値検体 (n=20) を用いて作製した正常プル血漿とアイ・エル・ジャパン社の凝固因子欠乏血漿であるヒーモスアイエル ファクター II, ヒーモスアイエル ファクター V, ヒーモスアイエル ファクター VII, ヒーモスアイエル ファクター Xを用いて、各因子濃度がそれぞれ100%, 80%, 50%, 20%, 10%, 5%

および1%未満になるように混合してPT-LSIMおよびPT-ILを用いてPTを測定した。

(7) 希釈直線性および検出感度

Fbg高値検体を用い、希釈バッファーであるファクターダイリュエント (アイ・エル・ジャパン社) を用いて10段階に希釈し、それぞれ二重測定した平均値を散布図にプロットしてFbg-LSIMにおける高濃度域の直線性を確認した。同様に、ヒーモスアイエル キャリプレーション血漿を用いて低濃度域の直線性を確認した。さらに、Fbg-LSIMの検出感度を確認するため、ヒーモスアイエル キャリプレーション血漿を用いてFbgの理論値が50, 40, 30, 20, 10mg/dLになるように希釈し、それぞれのポイントを10重測定した。測定することができたポイントにおける平均値 \pm 3SDが重ならない最小値を検出感度と設定した。なお、Fbgが100mg/dL以下の検体はすべて通常測定時の検体量を二倍にした濃縮モードで測定した。

(8) ヘパリン抵抗性試験

ヘパリンナトリウム注1万単位/10mL「ニプロ」(ニプロ社) をヒーモスアイエル キャリプレーション血漿に、それぞれ未分画ヘパリン濃度が0.0~2.0 IU/mLとなるように0.2 IU/mLずつ添加した検体を作製し、抗トロンビン作用のある未分画ヘパリンの混入がFbg-LSIMおよびFbg-ILのFbg測定に与える影響を確認した。

3. 成績

1) 併行精度

併行精度のCVはPT (sec) において正常域1.28%, 異常域0.27%と良好であり、PT (%), PT (INR) においてもすべて3%未満と良好だった。同様にFbgにおいて正常域1.13%, 異常域1.38%と良好であった (Table 2)。

2) 日差再現性

日差再現性のCVはPT (sec) において正常域1.37%, 異常域0.53%と良好であり、PT (%), PT (INR) においてもすべて3%未満と良好だった。同様にFbgにおいて正常域1.54%, 異常域0.94%と良好であり (Table 2), 試薬を機器に搭載した状態における10日間の測定値は安定していた (Fig. 1)。

3) 共存物質の影響

PT-LSIM, Fbg-LSIMともにそれぞれ、ビリルビンCおよびビリルビンFは20.6 mg/dL, ヘモグロビン濃度は500 mg/dL, 乳びは1590ホルマジン濁度まで影響を認めなかった (Fig. 2-a, Fig. 2-b)。

Table 2 Reproducibility data of PT-LSIM and Fbg-LSIM.

		Normal range				Abnormal range			
			PT		Fbg		PT		Fbg
		sec	%	INR	mg/dL	sec	%	INR	mg/dL
Within-run (n = 20)	mean	11.7	108.8	1.04	364.7	28.4	26.6	2.55	104.2
	SD	0.15	3.02	0.01	4.1	0.08	0.09	0.01	1.4
	CV	1.28	2.78	1.31	1.13	0.27	0.34	0.27	1.38
Between-day (n = 11)	mean	12.0	103.4	1.06	339.1	27.9	27.2	2.51	92.1
	SD	0.16	2.99	0.01	5.2	0.15	0.19	0.01	0.9
	CV	1.37	2.89	1.39	1.54	0.53	0.69	0.54	0.94

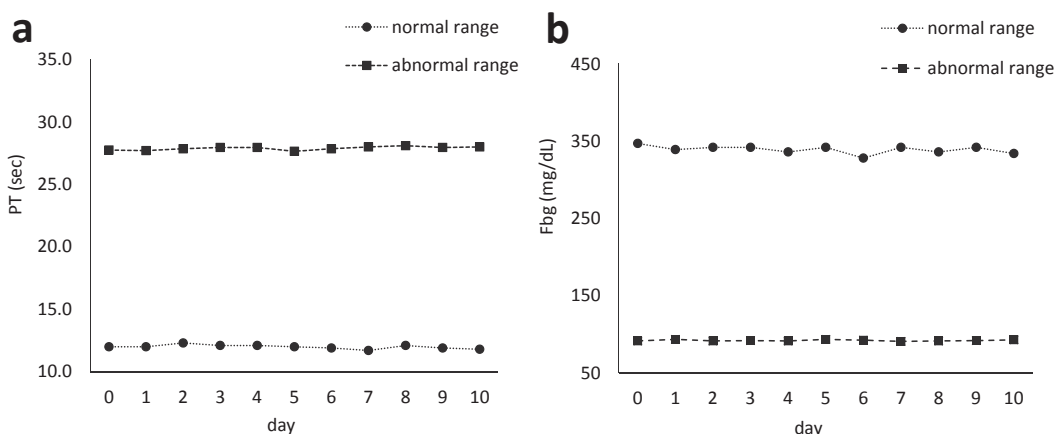


Fig. 1 Stabilities of PT-LSIM (a) and Fbg-LSIM (b) for ten days.

4) 対照試薬との相関

a) 患者検体のPTの相関

相関回帰式 $y=1.064x - 0.624$, 相関係数 $r=0.985$ といずれも良好な成績を示した (Fig. 3-a)。

b) ワルファリン服用検体におけるPTの相関

相関回帰式 $y=0.928x+0.359$, 相関係数 $r=0.986$ といずれも良好な成績を示した (Fig. 3-b)。

c) 肝機能障害患者検体におけるPTの相関

相関回帰式 $y=0.834x+0.864$, 相関係数 $r=0.931$ といずれも良好な成績を示した (Fig. 3-c)。

d) 患者検体のFbgの相関

相関回帰式および相関係数はいずれも良好であったが、矢印で示した乖離例を1例認めた (Fig. 3-d)。乖離例を除いた相関回帰式 $y=0.945x - 16.02$, 相関係数 $r=0.999$ であった。乖離検体の詳細は、ヘパリン起因性血小板減少症 (heparin-induced thrombocytopenia: HIT) 疑いのため直接トロンビン阻害薬であるアルガトロバンが投与された患者検体であった。乖離検体において、アルガトロバンが試薬中のトロンビンに作用して

Fbg-ILが偽低値となった可能性を考え、トロンビンを試薬として用いるClauss法とは別法としてPT-ILを用いたPT-derived法によるFbg値を確認した結果、Fbg-ILが34 mg/dLであったのに対してPT-derived法のFbg値は330 mg/dLであり、Fbg-LSIMの313 mg/dLと同等の結果となった (Table. 3)。

5) 健常人検体測定値の比較

結果はPT-LSIMが10.8 - 12.5秒, PT-ILが11.1 - 12.9秒とPT-LSIMはPT-ILより0.3秒程度短縮傾向であった (Fig. 4-a, Fig. 4-b)。同様にFbg-LSIMが216 - 377 mg/dL, Fbg-ILが235 - 389 mg/dLとFbg-LSIMはFbg-ILより20 mg/dL程度低値傾向であった (Fig. 4-c, Fig. 4-d)。

6) 外因系凝固因子感受性

因子濃度が5%までは両試薬でほぼ同等であったが (Fig. 5-a~d), 凝固第II因子 (以下F.II) では因子濃度が5%未満ではPT-ILのほうが感受性が高く (Fig. 5-a), 凝固第X因子 (以下F.X) では因子濃度が5%未満ではPT-LSIMのほうが感受性が高かった

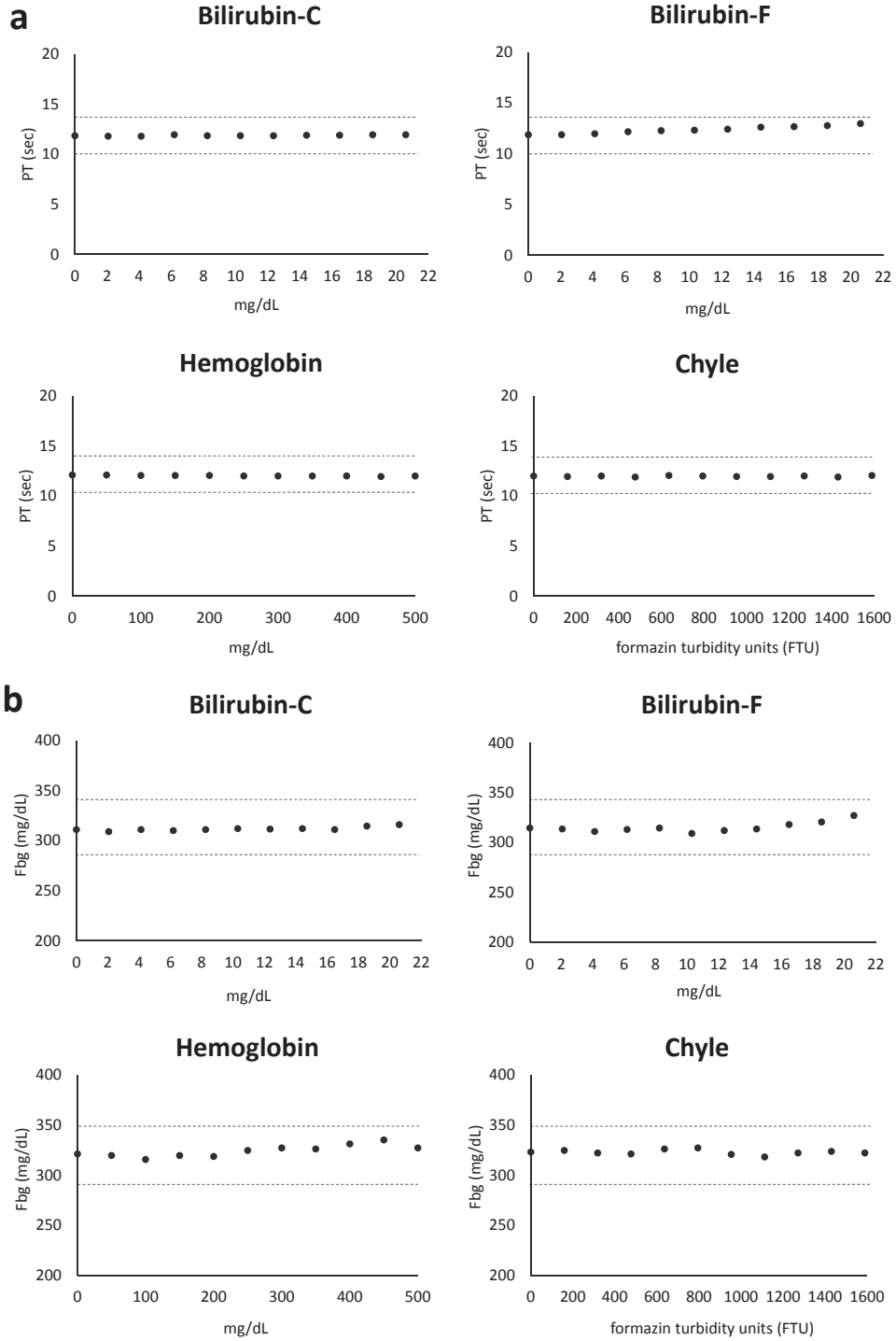


Fig. 2 Effect of interfering substances in PT (a) and Fbg (b). Dashed line shows the limit of acceptable range.

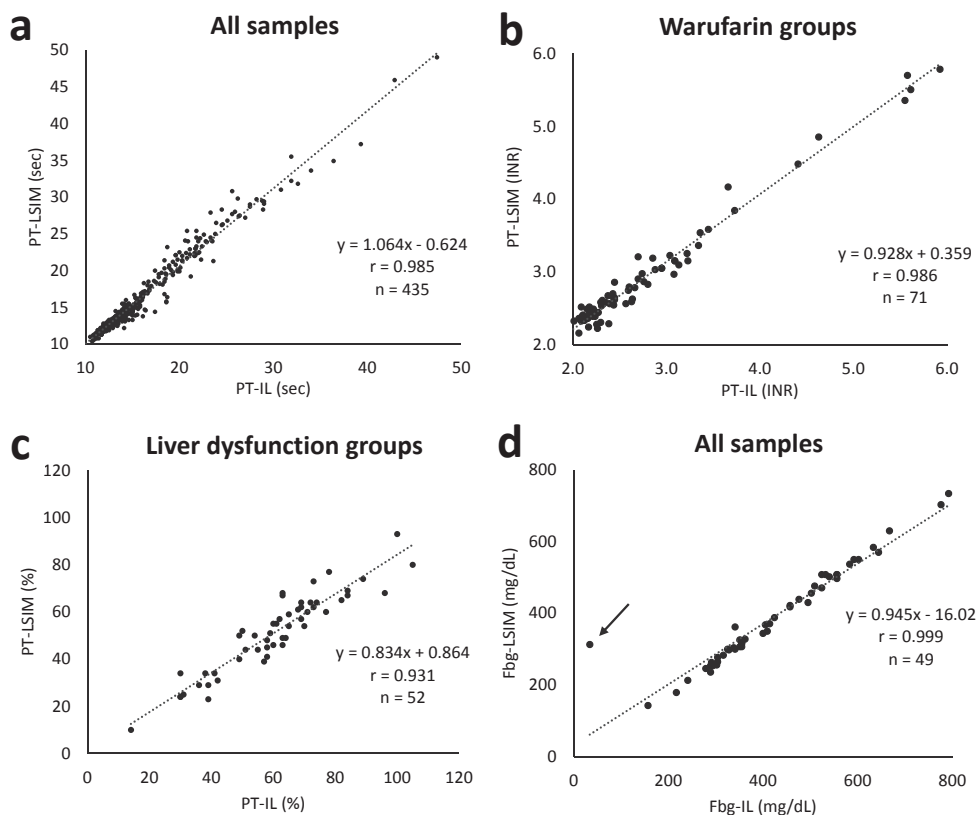


Fig. 3 Correlation between PT-IL and PT-LSIM, Fbg-IL and Fbg-LSIM. (a) All samples of PT (sec) (b) Warfarin groups of PT (INR) (c) Liver dysfunction groups of PT (%) (d) All samples of Fbg. Arrowed line shows an argatroban administered sample.

Table 3 Fbg data of an argatroban administered sample.

method	Fbg-LSIM	Fbg-IL	Fbg-PT-derived
mg/dL	34	313	330

(Fig. 5-d)。凝固第V因子および凝固第VII因子では両試薬ほぼ同等の成績であった。

7) 希釈直線性および検出感度

高濃度域における直線性は今回確認し得た700 mg/dL付近まで良好であった (Fig. 6-a)。低濃度域は30 mg/dL付近まで良好であった (Fig. 6-b)。また、Fbg-LSIMにおける検出感度は24 mg/dLであった (Fig. 6-c)。

8) ヘパリン抵抗性試験

Fbg-ILでは未分画ヘパリンの濃度依存性に低値傾向となったが、Fbg-LSIMではヘパリン濃度0.0 IU/mLとの比較で、ヘパリン濃度2.0 IU/mLまで変化率が10%以

内であり影響を認めなかった (Fig. 7)。

4. 考察

今回我々はLSIメディエンス社より新規に開発された液状化試薬であるPT-LSIMおよびFbg-LSIMの基礎的性能評価を行った。基礎性能として、併行精度および試薬を機器に搭載した状態で測定した10日間の日差再現性はPT-LSIM、Fbg-LSIMともに、いずれもCVが3%未満と良好で測定値は安定しており、日常検査において十分適応可能であった。

PTではワルファリンのモニタリングに重要なINRの試薬間差は臨床的に問題となるが、今回検討したINRが2.0以上の検体71例における相関も良好であり、日常診療でモニタリングされている患者検体においてもPT-LSIMはPT-ILと同等の検査結果を報告することが可能であると思われた。また、肝機能の評価の指標とし

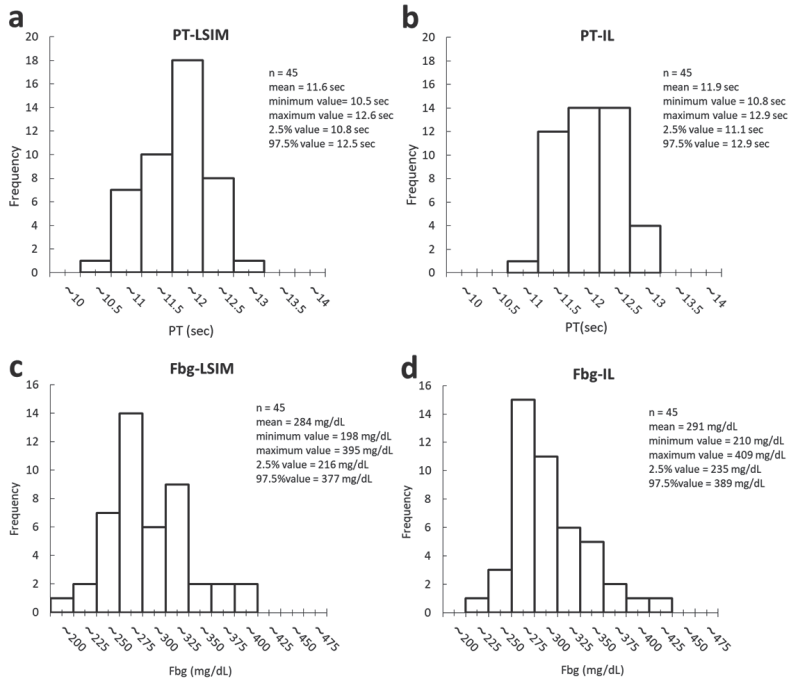


Fig. 4 Data of healthy volunteer plasma.
 (a) PT-LSIM (b) PT-IL (c) Fbg-LSIM (d) Fbg-IL

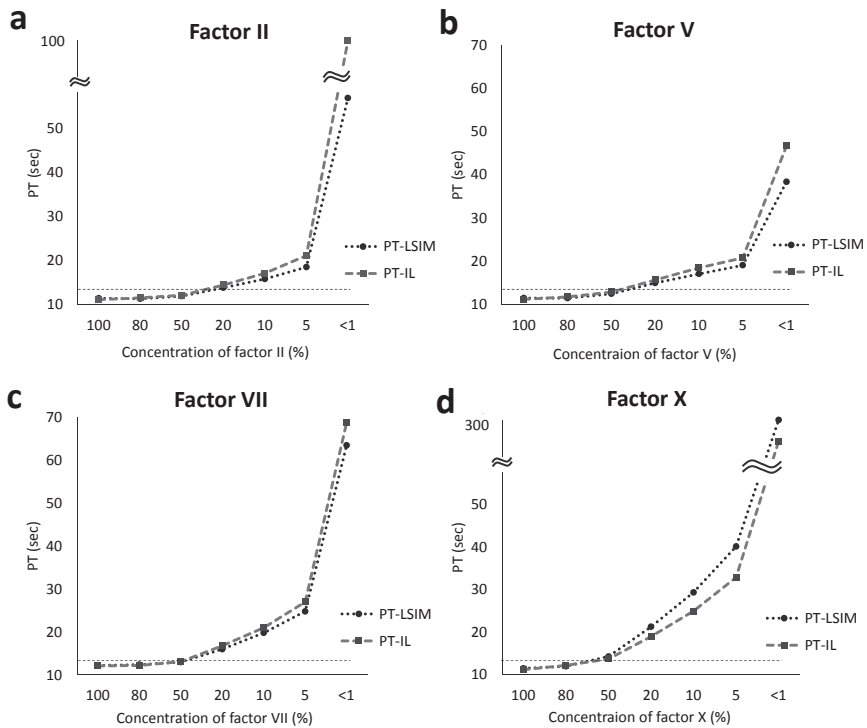


Fig. 5 Extrinsic coagulation factor sensitivity.
 (a) Factor II (b) Factor V (c) Factor VII (d) Factor X
 Dashed line shows the limit of normal range of PT.

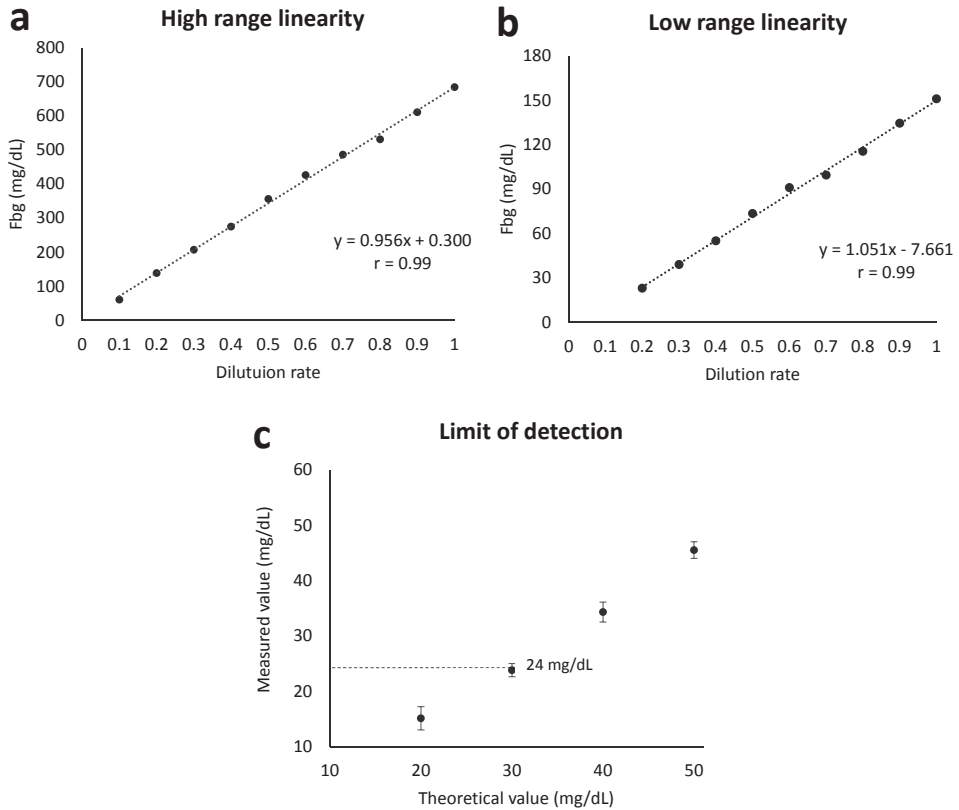


Fig. 6 Dilution linearity and limit of detection of Fbg-LSIM.
(a) High range linearity (b) Low range linearity (c) limit of detection

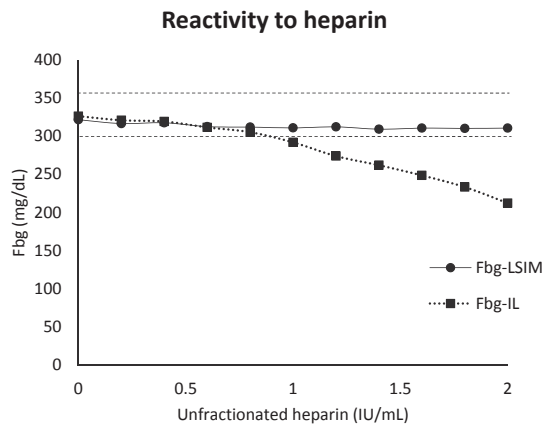


Fig. 7 Reactivity to heparin of Fbg-LSIM and Fbg-IL.
Dashed line shows the limit of acceptable range.

て用いられるChild-Pugh分類で肝障害度B以上となる7点以上を対象として確認した肝機能障害検体における相関も良好であった。上記のワルファリン群および肝機能障害群を含むPT-LSIM (sec)における対照試薬との全体の相関は良好であった。しかしながら、ワルファリン群や肝機能障害群のようにPTが高度に延長した検体では、PT-LSIM (sec)はPT-ILに比して回帰直線の傾きが $y=0.9$ 程度とやや短縮傾向であった(データ示さず)。これは、今回検討に用いたPTの検量線において、PTが100%となる基準秒数がPT-ILで12.18秒であったのに対してPT-LSIMで11.30秒と短かったため、高度に延長した検体においてはPT-LSIMとPT-ILで若干の差が生じたと推察され、検量線に用いた標準血漿がPT-LSIMとPT-ILで異なる標準血漿を用いたためであると考えられた。

なお、今回検討に用いた試薬はいずれも組成がヒト遺伝子組み換え組織因子であるため国際感度指数(international sensitivity index : ISI)がほぼ1.0に近い試薬であったが、ISIが大きい試薬や、組成がヒト以外の生物由来の試薬との相関関係は確認出来なかった。今後、組成の異なる試薬を用いた詳細な比較検討が必要であると思われる。

PTと同様に、Fbg-LSIMと対照との相関は良好であった。FbgはDICや肝機能障害時に低値となり、Fbgが約60 mg/dL以下になると出血傾向になるとされる⁹⁾。特に、DICでは抗凝固療法を行いながらFbg値を確認する必要があるため、抗凝固療法の影響を受けずにFbgを正確に測定することが重要である。Clauss法を原理としたFbg測定において、試薬中のトロンビン濃度が低いFbg試薬を用いた場合、HITが疑われた際の抗凝固療法として用いられるアルガトロバンやダビガトランエテキシラートメタンスルホン酸塩(商品名:プラザキサ)などの抗トロンビン剤、ならびに高濃度のヘパリンが混入もしくは投与された検体において偽低値になることが知られている¹⁰⁾。今回検討したヘパリン抵抗性試験ではFbg-ILが未分画ヘパリンの濃度依存性に低値傾向となったのに対して、Fbg-LSIMは未分画ヘパリン濃度が2.0 IU/mLまで影響を受けずに測定可能であった。アルガトロバン投与検体においてもFbg-ILではFbg-LSIMおよびPT-derived法によるFbg値よりも低値となった。Fbg-LSIMは試薬に含まれるトロンビン濃度が約100単位となっているため抗トロンビン剤やヘパリンの影響を受けずに測定することが可能であったと思われる。Fbg-LSIMにおける検出感度においても、今回検討に使用したSTACIAで測定した場合、24 mg/dLという低濃

度まで測定可能であり、DICや小児領域におけるL-アスパラギナーゼ(商品名:ロイナーゼ)などの化学療法に伴うFbgの低下時¹¹⁾においても十分測定可能であると思われた。

健康人検体の測定値では、Fbg-LSIMは対照試薬に比べて約20 mg/dL程度低値傾向であり、PT-LSIMは対照試薬に比して測定秒数が短縮傾向であった。

PT-LSIMにおける外因系凝固因子感受性はF.IIでは因子濃度が5%未満ではPT-ILのほうが感受性が高く、F.Xでは因子濃度が5%未満ではPT-LSIMのほうが感受性が高い傾向となった。近年、抗Xa阻害剤の抗凝固作用の指標としてPTの有用性が検討されている³⁾。今回の検討ではDOACs服用検体における比較検討は行っていないが、PT-LSIMにおけるDOACs服用検体のPTの測定感度についても今後検証されることを期待したい。

今回、本検討で用いたPT-LSIMおよびFbg-LSIMの最大の特長は液状化の試薬という点である。従来の凍結乾燥品の試薬では、自施設にて検査前に試薬溶解を行う必要がある。こうした、用時調整が必要な試薬を用いる場合、試薬の溶解不良により精度管理の許容範囲が外れることはISOにおいて不確かさの要因としても知られている⁷⁾。一方、液状化試薬は開封後直ちに使用出来るため、試薬溶解にかかる煩雑な手順を省略し、不確かさの要因を除外することが可能である。このことは、精度管理の許容範囲が外れた場合の可能性として、試薬溶解手順を除外できるため、問題解決に早期に対応が可能であると思われた。また、液状化試薬で不安視される試薬の安定性においては、管理血漿を用いた検討でPT-LSIM、Fbg-LSIMともに、試薬を機器に搭載した状態で最大30日までの日差再現性が良好であったことを確認している(データ示さず)。

本検討により、LSIメディエンス社の新規凝固試薬は、基本性能は良好であり対照試薬とも良好な相関性を示し、ルーチン検査において十分使用可能な性能を有すると考えられた。

5. 結論

LSIメディエンス社から新規に開発された液状化試薬であるコアグジュネシスPTおよびコアグジュネシスFbgの性能評価を行った結果、基本性能は良好であり日常診療において十分使用可能であった。またコアグジュネシスFbgは抗トロンビン薬や高濃度のヘパリンが投与もしくは混入しているような検体でも影響を受けずに測定可能であった。今回検討した試薬はいずれも用時調整不要な液状化試薬であるため、凍結乾燥品で煩雑であ

った試薬溶解の手間が省け検査室の効率化に寄与出来ると思われた。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) Quick A.J. Hemorrhagic diseases and thrombosis. Philadelphia Lea and Febiger 1966.
- 2) 坂寄輔, 内藤澄悦. ワーファリン服用患者における国際標準比 (INR) の正確性と信頼性—プロトロンビン時間とトロンボテストの凝固因子感受性に関する特性の比較—. 臨床病理 2010;58(8):779-785
- 3) Shimomura D, Nakagawa Y, Kondo H, et al. The Influence of assay selection on prothrombin time measured in patients treated with rivaroxaban for non-valvular atrial fibrillation. J Clin Lab Anal. 2016;30(6):941-946
- 4) Clauss V.A. Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. Acta Haematologica. 1957;17:237-246
- 5) 高木豊, 小河原佳奈, 田村祥子ら. 血液凝固反応過程プロファイル解析によるフィブリノゲン濃度の推定—特に数理法にて求めた凝固終了点の散乱光値を利用する方法—. 医学検査 2018;67(4):475-481
- 6) 高宮脩. 血液検査の標準化と現状:フィブリノゲン. 生物試料分析 2009;35(5):371-379
- 7) 久保野勝男. 臨床検査室の認定—トレーサビリティと不確かさの考え方—. 臨床病理 2009;57(6):584-592
- 8) 日本肝癌研究会編. 臨床・病理 原発性肝癌取扱い規約 第6版. 2015
- 9) 松尾収二. フィブリノゲン低値. 検査と技術 2006;34(7):696-697
- 10) Lindahl TL, Baghaei F, Blixtel IF, et al. Effects of the oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays. Thromb Haemost. 2011;105(2):371-378
- 11) Truelove E, Fielding AK, Hunt BJ: The coagulopathy and thrombotic risk associated with L-asparaginase treatment in adults with acute lymphoblastic leukaemia. Leukemia. 2013;27:553-559,

ASTおよびALT活性測定におけるIFCC対応法試薬の基礎的検討

Fundamental Study of Modified IFCC Reference Methods for Measurement of AST and ALT

高橋祐輔¹⁾ 梅森祥央²⁾ 浅沼康一²⁾ 高橋 聡²⁾³⁾

要旨 IFCC対応法試薬における、ASTおよびALT活性測定の基礎的検討を行った。その結果、併行精度は良好であった。PALPの添加にも拘らず、試薬は15日間安定し、室内精度も良かった。直線性は、ASTで2,342 U/L、ALTで2,430 U/Lまでみられた。一方、溶血ヘモグロビンの添加により、赤血球中のASTとALTが加わり正の干渉を受けた。JSCC標準化対応法との相関は良好であったが、測定値は本法で15~20%の高値を示した。それぞれ乖離例を認め、IFCC法で測定可能なアポ酵素の各症例における逸脱量が原因と考えられた。本試薬は基本性能に優れ、PALPを添加しても試薬安定性が良好なことから、日常検査に有用と考えられた。

Key words Modified IFCC reference method, JSCC reference method, aspartic aminotransferase, alanine aminotransferase, apoenzyme

1. はじめに

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase, EC 2.6.1.1; AST) は、心臓 (155U/g)、肝臓 (140U/g)、骨格筋 (100U/g)、腎臓 (90U/g)、膵臓 (30U/g)、脾臓 (15U/g) など、多くの臓器組織中に存在する¹⁾。一方、アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase, EC 2.6.1.2; ALT) は肝臓 (45U/g)、腎臓 (20U/g)、心臓 (7U/g) などに限局する¹⁾。また、ASTおよびALTは、赤血球中に血漿中の40倍あるいは7倍多く含まれる¹⁾。両者は、これらの臓器傷害により組織細胞内から血液中へ逸脱する酵素である。両酵素には、細胞質由来のcytoplasmic-AST (c-AST) とc-ALTや、ミトコンドリア由来のmitochondria-AST (m-AST) とm-ALTが、それぞれ

存在する。さらに、これらは、補酵素であるビタミン誘導体ピリドキサルリン酸 (pyridoxal phosphate; PALP) と結合したホロ酵素と、PALPが結合していないアポ酵素に、分けられる¹⁻³⁾。

日本臨床化学会 (Japan Society of Clinical Chemistry; JSCC) 勧告法では、c-ASTとc-ALTのホロ酵素のみを測定するために至適条件が設定された⁴⁻⁶⁾。そのため、JSCC勧告法試薬にはPALPは含まれない。一方、国際臨床化学連合 (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; IFCC) が示す勧告法では、ホロ酵素のみならず、アポ酵素も測定対象としているため、PALPを含んだ試薬を用いている^{7, 8)}。

近年、グローバルハーモナイゼーションの必要性が強く認識されるようになり、日本独自の測定方法では、国際的なトレーサビリティや治験への参加が困難な状況に

Received May 24, 2019; Accepted Jun. 5, 2019
Yusuke TAKAHASHI, Yoshifumi UMEMORI, Teruo ENDOH, Masaaki SHINAGAWA, Koichi ASANUMA, Satoshi TAKAHASHI

¹⁾北海道医療大学医療技術学部臨床検査学科

²⁾札幌医科大学附属病院検査部

³⁾札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座
〒002-8072 札幌市北区あいの里2条5丁目1

¹⁾Department of Clinical Laboratory Science, School of Medical Technology, Health Science University of Hokkaido

²⁾Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital

³⁾Department of Infection Control and Laboratory Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

2-5 Ainosato, kita-ku, Sapporo, Hokkaido 002-8072

Corresponding author: 高橋祐輔

TEL: 011-778-8931 FAX: 011-778-8941

E-mail: ysk-tkhs@hoku-iryo-u.ac.jp

なりつつある。すなわち、JSCC法からIFCC法への測定法の移行が、議論されている^{2, 3, 9)}。そこで今回我々は、富士フィルム和光純薬(株)から自動分析装置搭載用に新たに開発された、ASTおよびALT活性測定用のIFCC対応法試薬について、その基本性能を検討した。

2. 対象および方法

1) 対象

札幌医科大学附属病院の外来および入院患者から採血した、残存血清およびヘパリンリチウム加血漿を用いた。なお、本検討は、当院臨床研究審査委員会の承認(整理番号:292-43)を経て、後ろ向き観察研究として実施した。

2) 試薬および測定機器

測定試薬として、LタイプワコーAST IFCCおよびLタイプワコーALT IFCC(いずれも富士フィルム和光純薬(株))を、PALPをそれぞれの第1試薬で溶解調製後、用いた。比較対照には、JSCC標準化対応法のクイックオートネオAST JS-HLSまたはクイックオートネオALT JS-HLS(いずれもシノテスト(株))を使用した。いずれの試薬も、自動分析装置LaboSPECT008(日立ハイテクノロジーズ(株))に搭載し、メーカー指定のパラメーターにて、測定を行った。

3) 結果の解析

各検討の解析には、日本臨床化学会が配布している定量測定法のバリデーション算出用プログラムValidation-Support-V3.5を、用いた。

3. 検討方法および成績

1) 併行精度

3濃度のプール試料を20回連続測定したところ、変動

係数(CV)はASTで0.24~3.00%、ALTで0.24~2.68%であった(Table 1)。

2) 試薬安定性および室内精度

-80℃で凍結保存した3濃度の試料を15日間連続でそれぞれ1日2回測定を行い、試薬安定性および室内精度を調べた(Fig. 1, Table 2)。なお、初日にメーカー指定のキャリブレーターにて2点較正を行い、2日目以降は生理食塩水によるブランク補正のみを実施した。その結果、いずれの濃度域でも検討期間内で初日の測定平均値±5%を超える変動はみられず、その間の総合CVはASTで0.39~2.36%、ALTで0.90~1.89%であった。

3) 希釈直線性

希釈直線性を検討するため、高活性プール試料を生理食塩水で10段階希釈後3重測定した。その結果、ASTで2,342U/L、ALTで2,430U/Lまで、それぞれ直線性が得られた(Fig. 2)。

4) 共存物質の影響

プール試料(AST:170U/L、ALT:130U/L)に、5段階の濃度の健常者由来溶血ヘモグロビン、乳糜、抱合型ビリルビン、非抱合型ビリルビン(干渉チェックAプラス;シスメックス(株))、およびL(+)-アスコルビン酸(富士フィルム和光純薬(株))をそれぞれ添加後3重測定し、これらの影響を調べた(Fig. 3)。共存物質未添加時の平均値±5%を超えた場合を、影響ありとした。その結果、抱合型ビリルビンおよび非抱合型ビリルビンは20mg/dL、乳糜は1,660FTU、L(+)-アスコルビン酸は50mg/dLの添加まで、測定値は安定していた。また、ASTとALTの両者で、溶血ヘモグロビンの添加濃度依存性に測定値が上昇し、その程度はASTで著明であった。

Table 1 Repeatability.

	AST (n = 20)			ALT (n = 20)		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High
Mean (U/L)	29.4	174.9	1075.2	25.4	130.0	688.9
SD	0.88	1.12	2.60	0.68	0.56	1.66
CV (%)	3.00	0.64	0.24	2.68	0.43	0.24

Table 2 Intermediate precision.

	AST (n = 15)			ALT (n = 15)		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High
Mean (U/L)	54.9	178.2	1074.4	60.2	134.6	711.4
SD	1.30	1.44	4.18	1.14	1.66	6.40
CV (%)	2.36	0.81	0.39	1.89	1.23	0.90

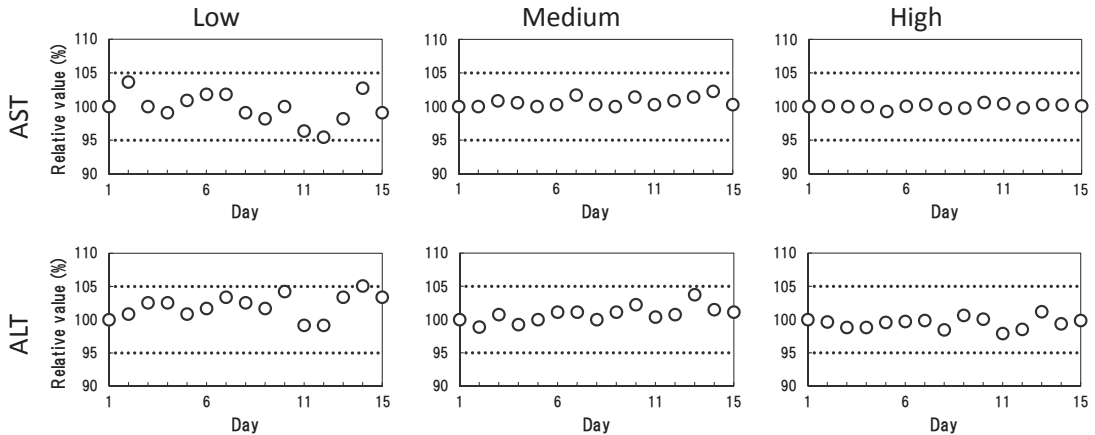


Fig. 1 Reagent stability.

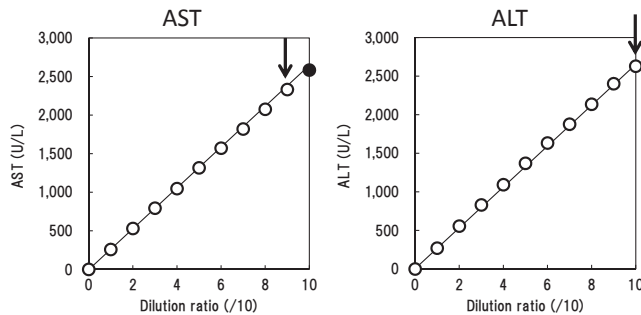


Fig. 2 Dilution linearity.

5) 相関

患者試料192例を用いて、IFCC法とJSCC法との相関性を解析した (Fig. 4)。その結果、相関係数(r)はASTで0.993, ALTで0.998と、良好であった。しかし、測定値に関しては、ASTで標準主軸回帰式 $y=1.198x - 0.207$, ALTで $y=1.148x - 6.756$ と、JSCC法に比べ、IFCC法で高値を示した。また、いずれかの実測値が、回帰式から±20%以上異なる場合を乖離とすると、ASTで16例, ALTで23例の乖離がみられた (Table 3)。いずれもJSCC法よりもIFCC法で高値となり、乖離となった。

6) 乖離症例の解析

各乖離症例について、患者背景を調べた (Table 3)。ASTに関しては、16例中11例 (症例1~11) でASTが存在する心臓、肝臓、骨格筋、腎臓または脾臓などの細胞傷害を認め、さらに治療薬投与による軽度の薬剤性肝障害が疑われる症例が4例 (症例12~15) あった。また、

ALTについても同様に、全23症例でALTが限局する肝臓、腎臓や心臓の細胞傷害を来す病態であった。

7) AST/ALT比の検討

相関に用いた患者試料192例において、JSCCおよびIFCC法のAST/ALT ratio (AAR) を算出した (Fig. 5)。両法の測定値から求めたAARは、相関係数(r)が0.962と良好であった。また、標準主軸回帰式は $y=0.889x+0.066$ と、IFCC法で約10%低値となった。回帰式から±20%以上異なる場合を乖離とすると、乖離した症例はなかった。

4. 考察

近年、ASTおよびALTの測定法は、グローバルハーモナイゼーションの必要性が増し、JSCC法からIFCC法への移行が議論されている^{2, 3, 9)}。そこで今回我々は、自動分析装置搭載用のIFCC標準化対応法試薬LタイプワコーAST IFCCおよびLタイプワコーALT IFCCの基

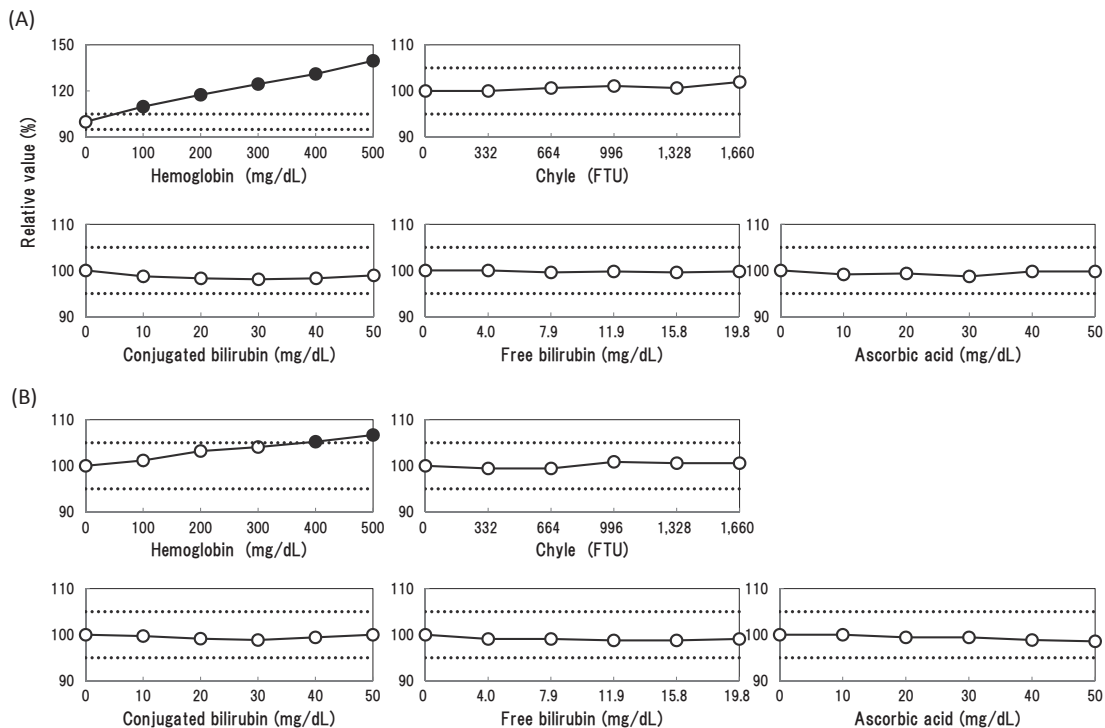


Fig. 3 Effects of interference substances. (A) AST, (B) ALT

本性能について、検討した。

その結果、併行精度は良好な成績であった。また、15日間の室内精度および試薬安定性も良かった。IFCC対応法試薬である本試薬は、PALPの添加によりアポ酵素をホロ化させることで、JSCC法では測定できないアポ酵素を測定できる。一方で、PALP添加により、IFCC法試薬は劣化が早くなることも知られている¹⁾。しかし、本検討では、試薬はPALP添加後15日間安定しており、小規模施設でも試薬1ボトルを十分に使い切れる性能を有していた。ただし、今回、室内精度および試薬安定性の検討に用いた試料は、肝機能障害を有する複数患者のプール血清であり、JSCC法と本法とで測定値が大きく乖離するようなアポ酵素優位の症例は含んでいない。

希釈直線性は、メーカー推奨の1,200U/Lを有意に超え、ASTで2,342、ALTで2,430U/Lであった。共存物質の影響では、溶血ヘモグロビンの添加で両者の測定値が上昇した。健常者の溶血液を添加したため、赤血球中に含まれるASTおよびALTの測り込みと考えられた。また、溶血液添加による両者の上昇濃度の比は、血漿中と比較した赤血球中のASTとALTの含有量比(40/7)¹⁾と同等であり、他の要因による測定値変化の可能性は低

いと考える。

両酵素におけるIFCC法とJSCC法との相関性は、良好であった。しかし、ASTおよびALTの両者で、JSCC法に比べIFCC法で高値となる傾向がみられた。この要因としては、先述のように、IFCC法ではPALP添加によりアポ酵素も測定しているためと考えられる。また、両者において、乖離例が多くみられた。血清中のアポ酵素は、細胞内でPALPと結合する前に逸脱したものと考えられており、臨床的意義は明らかになっていないが、アポ酵素とホロ酵素の量は疾患により異なる¹⁰⁾。そこで、カルテによる病態解析を行ったところ、いずれも両酵素の局在が多い臓器の傷害・障害を有し、治療中であった。また、症例間における乖離の程度に差がみられたが、各酵素とPALPとの血中での結合率の差から生じる血中推移の違いや各酵素の血中半減期の差によるものと推察された¹⁾。

ASTとALTは、その比による肝疾患の鑑別診断が多く報告されている¹¹⁻¹⁶⁾。今回の検討で、両酵素活性のJSCC法とIFCC法との相関は、先述の通り、相関関係は良好なものの、IFCC法で測定値が高値傾向を示し、乖離例も多くみられた。そこで、JSCC法からIFCC法

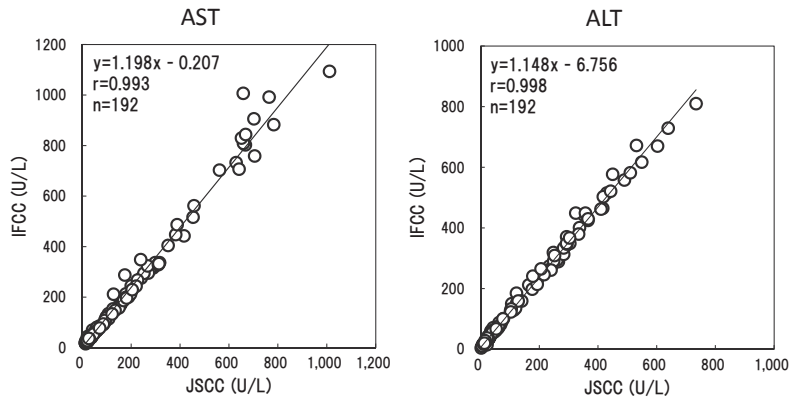


Fig. 4 Correlation between measured value of AST or ALT activity obtained by IFCC and JSCC methods.

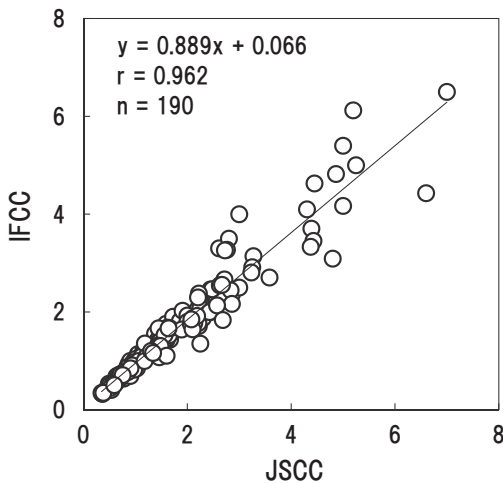


Fig. 5 Correlation between measured value of AST/ALT ratio obtained by IFCC and JSCC methods.

への移行が、AARに影響を及ぼすか否か検討した。その結果、JSCC法およびIFCC法両者のAARは、IFCC法でやや低値となるものの、相関は良好で、大きく乖離した症例もなかった。AARは、Karmen法で1.00、JSCC法では0.87が肝疾患の鑑別診断に用いられている¹⁷⁾。また、近年ではNAFLD/NASHの診断において、肝線維化進行の指標にAAR 0.8がカットオフ値として望ましいとも、報告されている¹³⁻¹⁵⁾。今後、IFCC法におけるAARに関しても、小谷らの報告¹⁷⁾に準じた検討を行い、基準値の設定が必要と考えられる。

5. 結語

ASTおよびALT活性測定用のIFCC対応法試薬「L

タイプワコーAST IFCC」および「LタイプワコーALT IFCC」の基本性能は、良好であった。PALP溶解後の試薬安定性も良く、日常検査に有用であることが明らかとなった。アポ酵素の測り込みにより、測定値はJSCC法と比べ高値となることから、共用基準範囲やAARの基準値の見直しが必要と考えられた。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) 米田孝司. 最新 酵素・アイソザイム検査 測定法とその臨床的意義 AST (GOT), ALT (GPT). 臨床病理レビュー 2001;116:72-80.
- 2) 関口光夫. 【JSCC勧告法は磐石か?-課題と展望】酵素項目(AST, ALT, CK, LD). 臨床検査2014;58:156-166.
- 3) 山舘周恒. 【特定健診項目の標準化と今後の展開】AST, ALT, γ -GT測定の標準化. 臨床検査2013;57:852-858.
- 4) 日本臨床化学会. ヒト血清中酵素活性測定の勧告法総論. 臨床化学1989;18:211-225.
- 5) 日本臨床化学会. ヒト血清中酵素活性測定の勧告法—アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ. 臨床化学1989;18:226-230.
- 6) 日本臨床化学会. ヒト血清中酵素活性測定の勧告法—アラニンアミノトランスフェラーゼ. 臨床化学1989;18:250-254.
- 7) Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Refer-

Table 3 Summary of discrepant cases.

No.	AST (U/L)		患者病態	No.	ALT (U/L)		患者病態
	IFCC	JSCC			IFCC	JSCC	
1	288	174	急性心筋梗塞	1	185	122	肝不全、心不全
2	212	128	急性心筋梗塞	2	64	39	直腸癌の多発肝転移
3	349	239	急性冠症候群	3	71	43	肝内胆管癌の肝浸潤、化学療法中
4	20	13	肝小細胞癌の化学療法中	4	60	35	心不全、うっ血肝の回復期
5	53	37	直腸がん多発肝転移	5	76	61	AML、軽度肝機能障害
6	44	21	前立腺癌の多発肝転移	6	72	58	肝細胞腫瘍
7	70	42	前立腺癌の多発肝転移	7	67	53	非アルコール性脂肪性肝炎
8	1,007	658	肺癌の多発肝転移	8	241	178	敗血症、薬剤性肝障害
9	35	21	前立腺癌の骨・リンパ節転移	9	101	78	頭部外傷、薬剤性肝障害
10	26	14	悪性リンパ腫の子宮・膀胱・膣転移	10	73	57	門脈圧亢進症、薬剤性肝障害
11	32	19	大腸癌のリンパ節・腹膜転移	11	57	46	急性冠症候群
12	27	20	形成不全性股関節症、高ALP血症	12	56	45	膝頭部腫瘍、肝転移
13	30	22	うつ病、高ALP血症	13	100	76	急性胆管炎
14	20	13	ネフローゼ症候群、高ALP血症	14	75	57	胆管閉塞、胆管炎、閉塞性黄疸
15	33	19	ALL治療終了後	15	84	63	肝門部領域胆管癌
16	27	18	加齢性白内障	16	71	55	胆嚢腫瘍
				17	63	48	肝細胞癌
				18	150	106	肝細胞癌
				19	60	45	AML、薬剤性肝障害
				20	449	324	慢性腎不全、糖尿病、高脂血症
				21	68	55	多発性骨髄腫、多臓器不全
				22	88	63	急性心筋梗塞
				23	49	37	急性心筋梗塞

ence procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. Clin Chem Lab Med 2002;40:725-733.

- 8) Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. Clin Chem Lab Med 2002;40:718-724.
- 9) 濱崎直孝. 【JSCC 勧告法は磐石か? 課題と展望】 国際的な標準化活動とJSCC. 臨床検査2014;58:150-155.
- 10) 大久保昭行. 血清GOT測定とピリドキサルリン酸の効果. ビタミン1980;54:511-519.

- 11) 小宮一郎. 関連検査値の相対比率を用いた臨床推論. 日本体質医学会雑誌2017;79:12-19.
- 12) 日本消化器病学会肝機能研究班. 肝機能の選択基準. 日本消化器病学会誌1988;85:1210-1214.
- 13) Wellerstedt S, Olsson R, Waldenstrom J. The diagnostic significance of a high ASAT/ALAT (GOT/GPT) ratio in patients with very high serum aminotransferase levels. Acta Med Scand 1974;195:227-229.
- 14) Palekar NA, Naus R, Larson SP, et al. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Liver Int 2006;26:151-156.
- 15) Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, et al. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without ad-

- vanced disease. Gut 2008;57:1441-1447.
- 16) 角田圭雄, 大野智之, 酒井恭子, ほか. NAFLDにおいて血小板数 (PLT) と AST/ALT 比 (AAR) の組み合わせ (PAAR index) により線維化進展例を除外できる. 肝臓2011;52:383-386.
- 17) 小谷一夫, 前川真人, 菅野剛史. 日本臨床化学会 (JSCC) 常用基準法に基づいた aspartate aminotransferase (AST)/alanine aminotransferase (ALT) 比の再設定 - Karmen 法から JSCC 常用基準法への変更に伴う肝疾患評価基準の変化 -. 日本消化器病学会誌1994;91:154-161.

「シグナスオートLIP」保存時における過冷却の影響について

Overcooling Effect on 'Cygnus Auto LIP' during Storage

渡辺淳之介 山野健太郎 玉城格 栗国徳幸 手登根稔

要旨 自動分析装置用リパーゼ測定試薬「シグナスオートLIP」の保存温度の違いによる基礎的検討及び安定性の評価を行った。その結果、適正温度（2～8℃）で保存した試薬と過冷却温度（-2～0℃）で保存した試薬とでは基礎性能において有意差は認められなかったが、アジ化Na添加試薬の安定性の評価では過冷却保存した試薬において、7日間で最大51.4%の活性値の低下が認められた。原因として過冷却により試薬中の基質のアジ化Naに対する感受性が増強したことが考えられた。本試薬は輸送時や保存時等で過冷却されないように注意が必要である。

Abstract We analyzed the basic performance of the autoanalyzer reagent kit 'Cygnus Auto LIP' on different storage temperature conditions to evaluate how the reagent affected by overcooling.

When the kit was stored in following conditions, recommended storage temperature (2 to 8 °C) and lower storage temperature (-2 to 0°C), no significant difference was found for accuracy, within-run reproducibility, and linearity. However, the overcooled reagents showed lower activity when sodium azide was added and activity of the reagents was decreased for maximum of 51.4% in the storage condition, when analysis was done seven consecutive days. This suggests that the substrate sensitivity to sodium azide was enhanced by overcooled reagent and it read to decrease in activity.

For our conclusion, the reagent kit should be carefully monitored to avoid overcooling during transporting/shipping and storing at facilities.

Key words Cygnus auto LIP, pancreatic lipase, DGGMR method, sodium azide, overcooling

1. はじめに

ヒト膵リパーゼは脂質を構成するエステル結合を加水分解する糖蛋白質であり、膵腺房細胞で合成され胃液や膵液等の消化液中に分泌される。

膵管の狭窄や閉塞による膵液の鬱滞または膵の組織破壊が存在する場合に血中の濃度が上昇する¹⁾。また、急性膵炎において血中リパーゼ測定は診断に有用であり、

血中アミラーゼ（又は膵アミラーゼ）よりも感度・特異度ともに優れていることが報告されている^{2)~6)}。近年、血中リパーゼ測定は、日常検査での需要が高まってきており、当院においても依頼件数の増加がみられ、そのニーズは高い。

血中リパーゼの測定試薬は、1,2-ジグリセリドを基質とした酵素共反応法（MGLPカラーレイト法）やリゾルフィン基質を用いる合成基質比色法など様々な測定原理を用いたものが利用されてきた⁷⁾。今回我々が検討に使用したシノテスト社の「シグナスオートLIP」（以下LIP）は、1,2-*o*-ジラウリル-*rac*-グリセロ-3-グルタル酸-(6-メチル-レゾルフィン)エステル（以下DGGMR）法を原理とする新たに開発された試薬であり、以前の試薬と比較して試薬中の基質の保存安定性が比較的良好なことや比較のアジ化ナトリウム（以下アジ化Na）の影響を受けにくい等の特徴がすでに報告されている⁸⁾。しかし、アジ化Naの影響をゼロにはできずに、同時に搭載する試薬やアジ化Naのコンタミ量によっては影響を受ける場合があるとの報告もある⁹⁾。

Received May 7, 2019; Accepted Jul. 24, 2019
Junnosuke WATANABE, Kentarou YAMANO, Itaru TAMAKI, Noriyuki AGUNI, Minoru TEDOKON
社会医療法人仁愛会 浦添総合病院 臨床検査部
Social Medical Corporation JINAIKAI Urasoe General Hospital,
〒903-2132 沖縄県浦添市伊祖4丁目16番1号
4-16-1 Iso, Urasoe-city, Okinawa, 903-2132, Japan
連絡責任者：渡辺淳之介
TEL：098-878-0231 FAX：098-877-2518
E-mail：kensa@jin-ai-kai.or.jp

当院臨床検査部では、2017年3月にシノテスト社の旧シグナスオートLIP（以下旧LIP）を導入した。旧LIPはアジ化Naの影響を受けやすく活性値の低下が見られたため、同年8月に発売されたアジ化Naによる影響を抑えたシノテスト社のLIPに試薬を切り替えた。切り替えに伴い、検討用の試薬を至急で取り寄せ検討を開始したが、改良品であるにもかかわらず日差変動の検討を行う際に24～48時間で約30～40%の急激な活性値の低下が認められた。その原因については、通常、試薬の適正保存温度は2～8℃であるのに対し、試薬の基質液が-2～0℃の過冷却環境に曝されたことにより活性値が低下したと推測された。

そこで、今回我々は、実際に試薬を過冷却環境に保存し、活性値の低下が認められるか、その検証を試みたので報告する。

2. 測定機器、及び試薬、対象

1) 測定機器

BIOMajesty6050（日本電子）を使用した。

2) 測定試薬

測定試薬としてはシグナスオートLIP（株シノテスト）を使用し、基質液を適正保存温度である2～8℃で保存したR2試薬をLIP A、過冷却温度である-2～0℃で保存したR2試薬をLIP Bとし、R1試薬は共に適正保存温度である2～8℃で保存した。また、過冷却保存の時間は24時間とした。

さらに、アジ化Naの影響を検証するためにLIP A及びLIP B各々について、BM6050を用いてアジ化Naを含む他試薬をプローブで添加した試薬（以下プローブコンタミ試薬）と試薬ボトルにアジ化Naを10 μ l添加した試薬（以下アジ化Na添加試薬）を作成した。プローブコンタミ試薬、アジ化Na添加試薬共に、初日のみアジ化Naの添加を行った。

プローブコンタミ試薬は、事前に、R2試薬にアジ化Naが処方されており、かつ、アジ化Na以外にコンタミの影響がないことを確認した他試薬とLIP試薬を連続して60回測定し、模擬的にLIPのR2試薬にプローブコンタミさせた試薬を作成した。本検討においては、混入させる試薬として、当院で使用しているLタイプワコーLDL-C・M（株富士フィルム和光）を使用した。また、当検査部におけるリパーゼの測定回数は約50テスト/日であるため、余剰に10テスト分加え連続測定回数を60回と設定した。

アジ化Na添加試薬の作成方法として、0.1%アジ化Na水溶液10 μ LをLIPのR2試薬1ボトル（10mL）にマ

Table 1 Accuracy of LIP A and LIP B.

LIP A		(n=3)			
	Standard	Control	QAP1	QAP2	
Ave. (U/L)	98.3	49.3	24.0	36.0	
Labeled-/actual-amount (%)	100.3	105.0	100.0	100.0	

LIP B		(n=3)			
	Standard	Control	QAP1	QAP2	
Ave. (U/L)	98.3	49.0	24.0	36.0	
Labeled-/actual-amount (%)	100.3	104.3	100.0	100.0	

* LIP A : LIP stored at 2～8℃ LIP B : LIP stored at 2～8℃

イクロピベットで添加し、最終アジ化Na濃度を0.0001%とした。自動分析装置のプローブコンタミには約0.004%のキャリアオーバーが発生するという報告があり¹⁰⁾、その報告を本試薬に当てはめると、約0.4 μ Lの持ち越しが発生するということになる。そこで、それ以上のキャリアオーバー値として10 μ Lを持ち越したと仮定して、最終アジ化Na濃度を0.0001%と設定した。

3) 測定原理

DGGMR法を測定原理としている。

検体中のリパーゼが基質である1, 2-o-ジラウリル-rac-グリセロ-3-グルタル酸-(6-メチル-レゾルフィン) エステル (DGGMR) に作用する。分解で生じたグルタル酸-(6-メチル-レゾルフィン) エステルはアルカリ条件下で加水分解される。その際に生じるメチルレゾルフィンの遊離による吸光度の増加 (580nm) からリパーゼの活性を算出する。

4) 対象

測定対象として、シグナスオートLIPコントロール、シグナスオートLIP高値管理試料、シグナスオートLIP標準血清（全て株シノテスト）、QAPトロール1, 2（Sysmex社）、当院臨床検査部に提出されたLIPの測定依頼があった既存血清のうちLIPの活性値が1000U/L以下の検体50例、及び同様の既存血清から作成した低、中、高活性値の患者プール血清3種類を用いた。

なお、本検討は、当院の臨床研究支援センターの承認を得て行った。

3. 検討内容及び結果

以下すべての検討をLIP A、LIP Bの両試薬それぞれで行った。

1) 正確性

正確性はLIPコントロール、LIP標準血清、QAP1, 2の4種の試料を3重測定し、その平均値におけるそれぞれの試料のメーカー指定の表示値に対する割合を算出し

Table 2 Within-run repeatability of LIP A and LIP B.

LIP A		(n=10)		
	Control	QAP1	QAP2	
Ave. (U/L)	48.7	23.3	35.9	
S.D. (U/L)	0.6	0.6	0.7	
C.V. (%)	1.3	2.5	1.9	

LIP B		(n=10)		
	Control	QAP1	QAP2	
Ave. (U/L)	48.4	23.3	35.8	
S.D. (U/L)	0.5	0.4	0.6	
C.V. (%)	1.0	1.9	1.5	

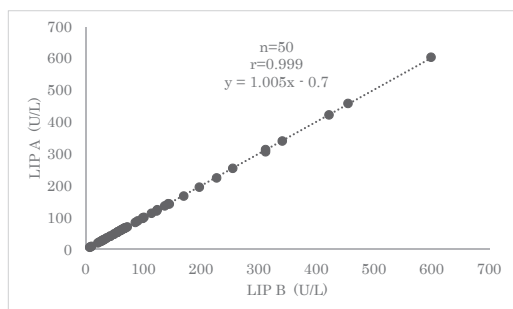


Fig. 1 Correlation between LIP A and LIP B.

評価した。LIPコントロールにおける対表示値の割合はLIP Aが105.0%、LIP Bが104.3%だった。

また、LIP標準血清では両試薬とも100.3%、QAP1、2においても、両試薬とも100.0%とすべての試料で良好な正確性が得られた (Table 1)。

2) 同時再現性

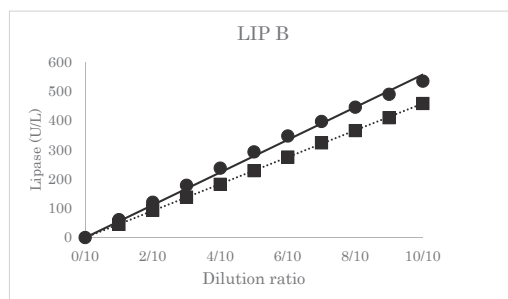
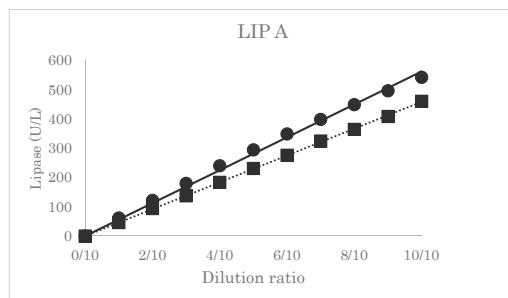
同時再現性はLIPコントロール、QAP 1、2の3種をそれぞれ10回連続測定して評価した。同時再現性の変動係数 (C.V.) はLIP Aの試薬では1.3~2.5%、LIP Bでは1.0~1.9%と良好な再現性が得られた (Table 2)。

3) 相関性

リパーゼが1000 U/L以下の患者血清50例を対象としてLIP A (x) とLIP B (y) との相関を検討した。結果、回帰式は $y=1.005x - 0.7$ 、相関係数は0.999と良好な相関関係が得られた (Fig. 1)。

4) 直線性

LIP高値管理試料 (表示値483 U/L) 及び、測定対象の患者血清の中で、約500 U/Lの活性値を示す検体の計2種類を使用し、どちらも生理食塩水で10段階の希釈系列を作成した。各々を2重測定した結果の平均値から、LIP A、LIP Bどちらの試薬においても測定レンジである400 U/Lまでの良好な直線性が認められた (Fig. 2)。



■ Control H ● Patients

Fig. 2 Dilution linearity of LIP A and LIP B.

5) 共存物質の影響

干渉チェック・Aプラス (シスメックス社)、アスコルビン酸を用いて、最大濃度が、乳び3000 FTU、溶血500mg/dL、ビリルビンF 50mg/dL、ビリルビンC 50mg/dL、アスコルビン酸50mg/dLとなるように希釈系列を作成し測定への影響を確認した。いずれの試薬においても共存物質の影響は認められなかった (Fig. 3)。

6) アジ化Naの影響比較

LIP A、LIP Bにおいて、プローブコンタミ試薬とアジ化Na添加試薬を用いて、シグナスオートLIPコントロール、標準血清、低、中、高活性の患者プール血清それぞれを7日間2重測定し、その結果の平均値の推移から安定性を評価した。また、初日にすべてに試薬でキャリブレーションを行い、その後はノンキャリブレーションで測定を行った。

プローブコンタミ試薬ではLIP Aにおいて1.0~1.4%の活性値の低下が認められ、LIP Bにおいては4.3~9.8%の活性値の低下が認められた (Fig. 4-A)。また、アジ化Na添加試薬でも、LIP Aにおいて1.4~6.5%、LIP Bにおいて35.9~51.4%の活性値の低下が認められた (Fig. 4-B)。

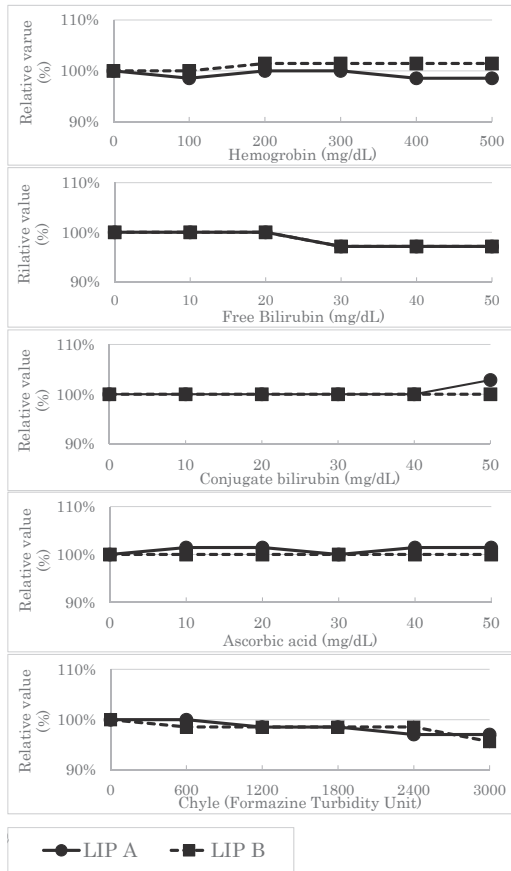


Fig. 3 Effects of coexisting substances.

4. 考察

今回我々は、アジ化Naの影響を受けにくい改良品にもかかわらず、日差変動の検討時に大きく活性の低下が認められたことをきっかけに、その原因を突き止めるべく検討を行った。その原因として試薬保存時もしくは運搬時の過冷却が推測されたため、試薬の保存条件を変えて、その影響について検討した。

その結果、適正温度保存試薬と過冷却温度保存試薬の両試薬においては、正確性、同時再現性、直線性、共存物質の影響等において有意な差は見られず、両者の相関性も良好であり、保存温度の違いによる試薬の基礎性能の差は認められなかった。しかし、アジ化Naを基質液に混入させたプローブコンタミ試薬、アジ化Na添加試薬ともに、過冷却保存した試薬の方が、測定値の低下が大きく認められた。測定値の減少率は7日間で最大51.4

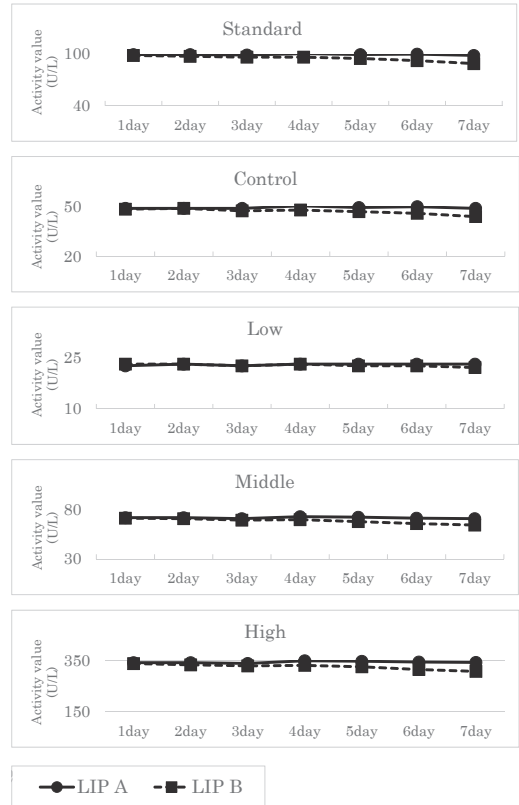


Fig. 4-A Stability of LIP A and LIP B added sodium azide mechanically.

%と、かなり大きな変化が見られた。以上の結果より、過冷却保存された試薬は、適正温度で保存された試薬と比較し、試薬の基礎性能は変わらないものの、安定性が著しく悪くなり、アジ化Naの影響をより強く受けるようになることが分かった。したがって、当院臨床検査部において、LIP試薬の検討の際に24~48時間で急激に活性値が低下した原因として、過冷却されたLIP試薬を用いていたため、プローブコンタミや空中コンタミなどにより、アジ化Naが混入し、その影響を強く受けることで活性値が低下したと考えられた。

アジ化Naに対する感受性が増強した要因としては、過冷却により試薬中の基質成分のエマルジョン構造が変化し、アジ化Naに触れる表面積の割合が増えた可能性が考えられた¹¹⁾。試薬が過冷却環境にさらされた原因としては、沖縄への試薬の搬送が空輸であることや試薬を至急で取り寄せたため通常とは別の空輸ルートとなった

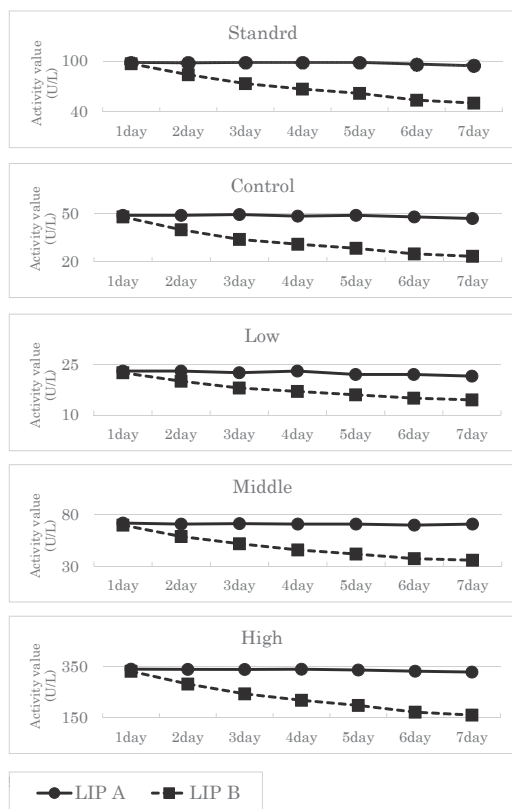


Fig. 4-B Stability of LIP A and LIP B added sodium azide using micropipette.

こと、空輸中の外部気圧や温度等、何らかの要因によって、偶発的に輸送中の保存温度が過冷却状態になってしまったことが疑われた。

試薬の過冷却状態は、外観や、温度等では気づきにくく、基礎性能においても、適正保存された試薬と差がほとんどないことから、実際に運用する前に異常を検出することは困難であり、シグナスオートLIPを運用するうえでは注意が必要だと考えられる。

以上の経験をもとに、現在は、常に通常の温度管理が徹底されている輸送ルートで試薬を購入しているため、測定値の急激な低下も見られず、問題なく使用できている。

今回の結果や経験をもとに試薬の保存温度や輸送条件等も日々の精度管理で急激な測定値の変動要因となりうることを再認識するとともに、改めて自施設の試薬の管理状態や輸送状態を見直すきっかけとなった。

5. 結語

「シグナスオートLIP」における保存温度の違いによる試薬の基礎性能の評価及び、アジ化ナトリウムの影響の検討、評価を行った。適正な温度で保存した試薬と過冷却温度で保存した試薬とでは基礎性能に差はないものの、アジ化ナトリウムが混入した場合の安定性は過冷却温度で保存した試薬の方が著しく悪かったことから、本試薬の保存においては過冷却にならないよう十分注意が必要である。

本論文の内容は日本臨床検査自動化学会第50回大会にて発表した。

本検討において開示すべき利益相反はありません

文献

- 1) 三宅一徳:「アミラーゼとリパーゼを読む」, 臨床検査, 2017;61:742-749
- 2) 高田忠敬編:急性膵炎診療ガイドライン2015第4版, 金原出版, 東京 (2015)
- 3) 貝瀬智子, 清水京子, 白鳥敬子:膵炎診断のための生化学検査, 肝と膵, 2014, 35, 1047-1050
- 4) Demanet C, Goedhuys W, Haentjens M, et al. Two automated fully enzymatic assays for lipase activity in serum compared. Clin Chem 1992;38:288-92
- 5) Apple F, Benson P, Preese L, et al. Lipase and pancreatic amylase activities in tissues and in patients with hyperamylasemia. Am J Clin pathol 1991, 96, 610-614
- 6) Lott JA, Patel ST, Sawhney AK, et al. Assays of serum lipase:analytical and clinical consideration. Clin Chem, 1986, 32, 1290-302
- 7) 植田成, 山下計太:膵リパーゼの標準化, 臨床病理, 2017, 65, 5, 584-591
- 8) 西岡麻衣, 三好雅士, 中尾隆之, 他:合成基質DGGMRを用いたリパーゼ測定試薬「シグナスオートLIP」の性能評価, 医学検査, 2018, 67, 3, 321-327
- 9) 引地篤, 飯塚直美:DGGMRを基質とするリパーゼ測定試薬「シグナスオートLIP」について, 生物試料, 2017, 40, 5, 255-260
- 10) 財団法人 機械システム振興協会, 特定非営利活動法人 日本臨床検査標準協議会:臨床検査用分析装置における自動校正システムの開発に関するフィージビリティスタディ報告書, 東京, 2008
- 11) 甫立喜明, 上野聡, 矢野淳子, 他:超音波音速測定によるパーム油O/Wエマルジョンの油脂結晶化の観察, 日本油化学会誌, 1996, 45, 12, 1333-1365

レニン・アルドステロン迅速測定の基本性能評価と 日常検査への適用

Evaluation of the Precision of Renin and Aldosterone Quick Measurement and Its Application to Routine Inspection

中村和之¹⁾ 白井秀明²⁾

要旨 原発性アルドステロン症の診断には、血漿レニン活性または活性型レニン濃度と血漿アルドステロン濃度の同時測定によるスクリーニング検査が提唱されている。しかし、これらの測定には、従来よりRIAキットが用いられ測定に数時間を要していた。今回新たに開発された自動化学発光酵素免疫測定装置は、測定時間が約10分であり、基本性能もRIA法と同等以上であることから、外来診療における迅速診断が可能である。

Key words Accuraseed, ARC and Aldosterone quick measurement, application to routine, NMIJ CRM 6402-a, primary aldosteronism

1. はじめに

レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系は血圧や体液量調整に係る調節系であり、高血圧診断の有用な指標となっている。特に二次性高血圧の代表疾患である原発性アルドステロン症 (PA) のスクリーニングにおいては、アルドステロン/レニン比 (ARR) を求めることが有用とされている^{1, 2)}。原発性アルドステロン症は、副腎腺腫からのアルドステロン過剰分泌により、高血圧、低カリウム血症、血中レニン濃度の低下をきたす病態である。病変が片側性であった場合、外科的に治癒可能な疾患である一方で臓器障害が少なくないため、早期診断と治療が重要とされる。近年、診断技術の向上により原発性アルドステロン症の発見率は増加し、本態性高血圧の5~10%を占める頻度の高い疾患であることが分かってきた^{1, 2)}。

これまで両項目の測定は放射性同位元素を用いた手法のIRMA法、RIA法のみであり、作業が煩雑で分析時間に3時間以上必要としていた。近年、放射性物質を

使用せず全自動で約10分の迅速測定が可能な自動化学発光酵素免疫測定装置 Accuraseed® の専用試薬、アキュラシード レニン (ARC) およびアキュラシード アルドステロンが開発された。

今回、これらの試薬の基本性能を評価し、全自動迅速測定の日常検査への有用性について評価を行った。

2. 対象および方法

1) 測定装置

自動化学発光酵素免疫分析装置 Accuraseed® (富士フィルム和光純薬)

2) 測定試薬

アキュラシード レニン (ARC) およびアキュラシード アルドステロン測定試薬 (富士フィルム和光純薬)

3) 測定原理

本装置の反応時間は約10分で、活性型レニン濃度測定が抗レニン抗体を結合した磁性粒子とPOD標識抗レニン抗体を用いた2ステップサンドイッチ法 (Fig. 1) である。アルドステロン濃度測定が、抗マウス抗体を結

Received Aug. 2, 2019; Accepted Sep. 18, 2019

Kazuyuki NAKAMURA¹⁾, Hideaki SHIRAI²⁾

¹⁾独立行政法人 労働者健康安全機構 横浜労災病院 中央検査部

Japan Organization of Occupational Health and Safety Yokohama Rosai Hospital

〒222-0036 神奈川県横浜市港北区小机町3211

3211 Kozukue-Cho, Kohoku-ku, Yokohama City, Kanagawa Prefecture, Japan 〒222-0036

²⁾前 独立行政法人 労働者健康安全機構 横浜労災病院 中央検査部

TEL : 045-474-8111 (代)

E-mail : chuken-bucho@yokohamah.johos.go.jp

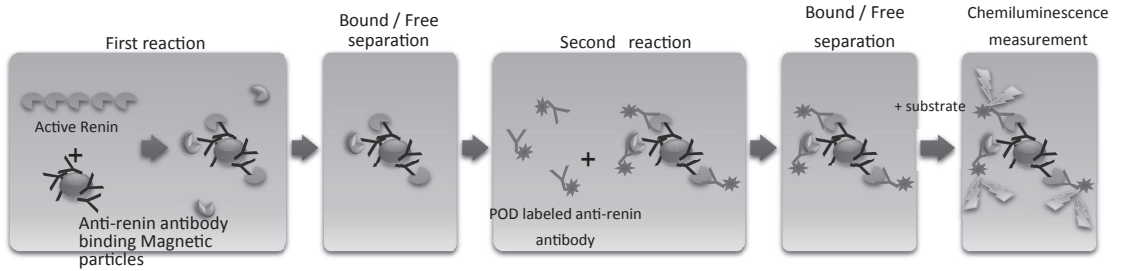


Fig. 1 Accuraseed ARC measurement principle (2 step method)

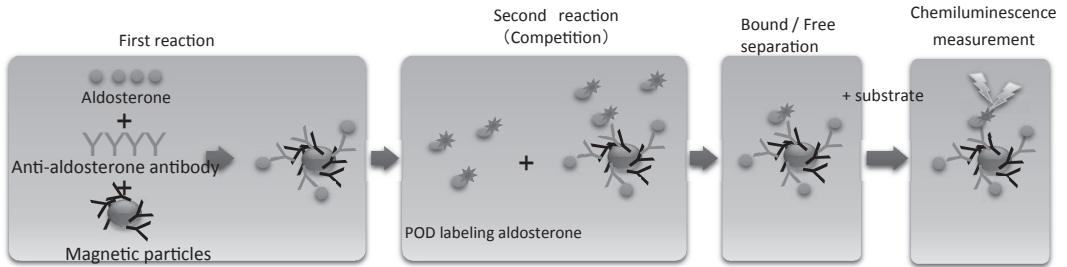


Fig. 2 Accuraseed Aldosterone measurement principle (1 step Delayed method)

Table 1-1 Repeatability

	ARC (pg/mL)			Aldosterone (pg/mL)		
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
n	15	15	15	15	15	15
Mean	3.2	49.3	369.2	141.3	656.8	1229.1
S. D.	0.09	0.63	7.70	7.96	9.42	17.02
C. V.	2.8%	1.3%	2.1%	5.6%	1.4%	1.4%

Table 1-2 Intermediate Precision

	ARC (pg/mL)		Aldosterone (pg/mL)	
	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10
n	16	16	16	16
Mean	3.2	48.4	156.2	683.1
S. D.	0.11	1.21	11.86	13.32
C. V.	3.4%	2.5%	7.6%	1.9%

合した磁性粒子を用いた抗アルドステロンマウスモノクローナル抗体、POD標識アルドステロンの競合反応を利用した1ステップディレイド法 (Fig. 2) である。

4) 対象

当院中央検査部に提出された検査終了後の血清および血漿162検体を連結不可能匿名化して用いた。なお、研究内容は、横浜労災病院倫理委員会の承認 (承認番号: 27-64) を得て行なった。

5) 比較対照法

血漿レニン活性 (PRA) 測定がEIA法、活性型レニン濃度 (ARC) 測定がIRMA (ビーズ固相法)、血漿ア

ルドステロン測定 (PAC) がSPAC-RIA法で、いずれも株式会社LSIメディエンスで測定した。

3. 検討結果

1) 併行精度

同時再現性は、3濃度の異なる検体を各15重測定した。また日間再現性は、2濃度の異なる検体を16日間各2重測定した。得られた結果の平均値、標準偏差および変動係数(CV値)を求めた。同時再現性のCV値はARCが1.3~2.8%で、アルドステロンが1.4~5.6%であった (Table 1-1)。日差再現性のCV値はARCが2.5~3.4%で、アル

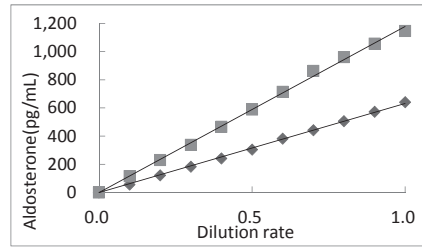
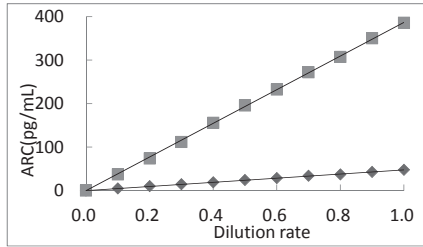


Fig. 3 Dilution linearity

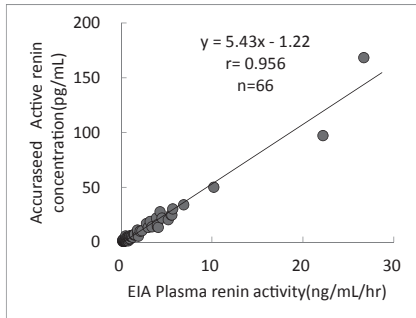


Fig. 4-1 Correlation with EIA Plasma renin activity

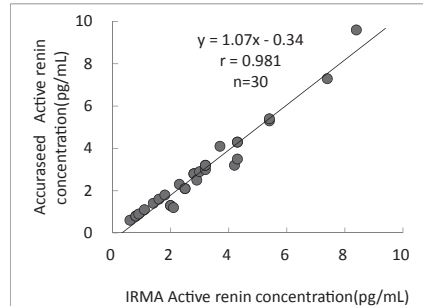


Fig. 4-2 Correlation with IRMA Active renin concentration

ドステロンが1.9～7.6%であった (Table 1-2)。

2) 希釈直線性

2濃度のプール血清を専用希釈液で10段階希釈して各2重測定した。ARCが約400 pg/mL、アルドステロンが約1200 pg/mLまで理論値と一致した直線性が得られた (Fig. 3)。

3) 検出限界 (LOD)

添付文書に記載されている測定範囲下限濃度付近に調製した試料を各15重測定し、0濃度の平均値 + 2SD値と平均値 - 2SD値が重ならない濃度を求めた。ARCが0.25 pg/mL、アルドステロンが50 pg/mLであった。

4) 比較対照法との相関

(1) ARCと比較対照法との相関について

66例の血漿検体を用いてPRAとアクキュラシードレニン試薬との相関関係を確認した (Fig. 4-1)。その結果、回帰式が $y=5.43x-1.22$ 、相関係数が $r=0.956$ であった。また、30例の血漿検体を用いて比較対照法と本法との相関関係を確認した (Fig. 4-2)。その結果、回帰式が $y=1.07x-0.34$ 、相関係数が $r=0.981$ であった。

(2) アルドステロン濃度と比較対照法との相関

162例の血清検体を用いて比較対照法とアクキュラ

シードアルドステロン試薬との相関関係を確認した (Fig. 5-1)。その結果、広範囲での回帰式が $y=1.10x-318$ 、相関係数が $r=0.993$ であり、1000 pg/mL以下の検体 (110例) での回帰式が $y=1.02x+135$ 、相関係数が $r=0.920$ であった (Fig. 5-2)。また、アクキュラシードアルドステロン試薬での血清と血漿検体 (63例) での回帰式は $y=1.03x-5.30$ 、相関係数が $r=0.989$ であった。さらに、比較対照法との2法間で50%以上測定値が乖離した4検体について、LC-MS/MS法で確認を行った結果をTable 2に示した。その結果RIA法で1/4件が、本システムで3/4件がLC-MS/MS法の測定値に近似した。

5) アルドステロン測定の精確さの確認

アルドステロン分析用ヒト用認証標準物質 (NMIJ CRM 6402-a)³⁾3濃度レベルを測定試料として本法での測定値を確認した (Table 3)。その結果、回帰式は $y=1.16x+60.4$ 、相関係数が $r=0.999$ であった。

4. 考察

測定試薬の基礎性能は、併行精度 (同時再現性および日差再現性)、希釈直線性、検出限界について実施した

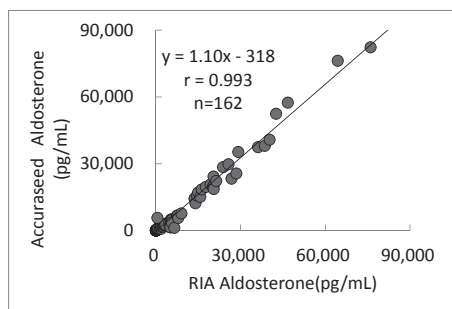


Fig. 5-1 Correlation with RIA Aldosterone

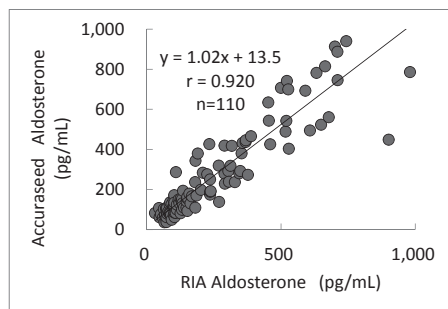


Fig. 5-2 Correlation with RIA Aldosterone

Table 2 Examination for samples that have discrepancy between SPAC-RIA and Accuraseed

Sample No.	Aldosterone (pg/mL)		
	RIA	Accuraseed	LC-MS/MS
a	604	5758	5660
b	4940	1586	4986
c	5190	1449	1952
d	6580	1263	1080

Table 3 Standardization of aldosterone measurements

CRM No.	Certified value ID-LCMS/MS	Accuraseed	bias (B)	ts/√n	Cm	unit
CRM1	201	301.2	100.2	14.5	114.7	pg/mL
CRM2	411	526.8	115.8	25.8	141.6	pg/mL
CRM3	792	984.8	192.8	21.4	214.3	pg/mL

結果、いずれも添付文書に記載の性能を有していた。

相関性については、既存の方法（PRAがEIA法、ARCがIRMA法およびPACがSPAC-RIA法）と比較した結果、PRAとの相関性は、 $n=66$ 、回帰式が $y=5.43x - 1.22$ 、相関係数が $r=0.956$ で良好な相関関係を示した。また、ARCについて30例を用い比較対照法と本法との相関性を求めた結果、 $y = 1.07x - 0.34$ 、相関係数 0.981 と良好な相関関係を示した。一方、アルドステロンについては、血清検体（ $n=162$ ）を用い比較対照法と本法の相関性は全範囲で回帰式は $y=1.10x - 318$ 、相関係数 $r=0.993$ であり、 1000 pg/mL 以下の範囲では $y=1.02x+13.5$ 、相関係数 $r=0.920$ で良好な相関関係を示した。また、2法間で50%以上測定値が乖離した4検体についてLC-MS/MS法での測定を行った結果、1検体はRIA法に、3検体は本法に近似した結果であったことより、両測定法で使用している抗体が異なることが測定値乖離の原因と考えられた。さらに、同一患者の血清と

血漿の相関を評価したところ、 $y=1.03x - 5.30$ 、相関係数 0.989 （63例）と良好な相関関係であったことより、血清、血漿いずれの試料も測定に用いることが可能であった。

現在、日本内分泌学会主導のもとアルドステロン測定の標準化を目的とした「アルドステロン測定の標準化検討委員会」が設置されている。本委員会の働きかけにより国立研究開発法人産業技術総合研究所計量標準総合センター（NMIJ）において、アルドステロン実試料認証標準物質を、基準測定操作法であるID-LC/MS/MSで認証値を値付けした「アルドステロン分析用ヒト血清（NMIJ CRM 6402-a）」が設定された^{3, 4)}。アキュラシード アルドステロンによりCRM6402-aを測定した結果、認証値に対して $y=1.16x+60.4$ 、相関係数 $r=0.999$ を示した。これにより、日常診療におけるアルドステロン測定標準化に関する運用指針（第一版）⁵⁾に記載されているように本アルドステロン測定の校正が可能となり、

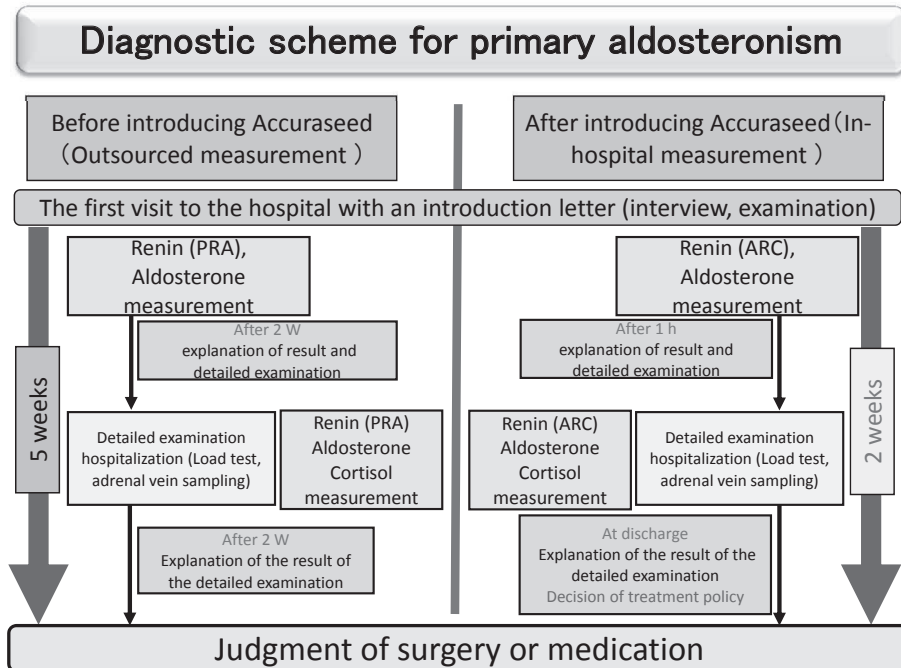


Fig. 6 Diagnostic scheme for primary aldosteronism

高血圧治療ガイドライン²⁾に示すスクリーニングの診断基準に適用できる。

以上の結果より、PAが疑われる症例に対し、スクリーニング検査としてARRを求め、次に機能性評価試験および選択的副腎静脈サンプリング(AVS)を行った後に確定診断となる。本法を導入するまでは、レニン活性、アルドステロン測定を外注で実施していたため、確定診断までの期間に5週間を要していた。しかし、本法で院内測定が可能となったことより、確定診断まで2週間に短縮することが可能となったことで、Fig. 6の原発性アルドステロン症の診断スキームが新たに組み立てられた。

5. 結語

本自動化学発光酵素免疫測定システムはRIA法と同等かそれ以上の性能を有しており、日常診療に十分適用できる。またアルドステロン測定はアルドステロン実試料認証標準物質との関係が明らかとなったことで標準化に対応可能である。さらに、測定に要する時間が約10分となったことで迅速測定が可能となり、日常診療の再診率の低減による確定診断までの短縮が示唆される。

本論文の内容の一部は日本臨床検査自動化学会第48回および第49回大会(横浜)にて報告した。

本論文の発表に関して、開示すべきCOI関係にある企業等はない。

文献

- 1) Omura M, Sasano H, Saito J et al: Clinical characteristics of aldosterone-producing microadenoma, macroadenoma, and idiopathic hyperaldosteronism in 93 patients with primary aldosteronism. *Hypertens Res* 2006; 29: 883-889
- 2) 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会: 高血圧治療ガイドライン2019
- 3) 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 計量標準総合センター 標準物質認証書 NMIJ CRM 6402-a アルドステロン分析用ヒト血清 (3濃度レベル)
- 4) T. Nishikawa, M. Omura, M. Kawaguchi, et al.: Calibration and evaluation of routine methods by serum certified reference material for aldosterone measurement in blood. *Endocr J* 2016; 63(12): 1065-1080
- 5) 日本内分泌学会 アルドステロン測定の標準化検討委員会: 日常臨床におけるアルドステロン測定標準化に関する運用指針(第一版)

当センターにおけるCKD患者を対象とした whole PTH測定試薬の評価

Evaluation of the New Immunoassay for Full-length Parathyroid Hormone focused on
CKD Patients in Our Center

正木裕美子 入汐弘美 穴吹大耀 小倉眞紀 春名能通

要旨 PTH 1-84を特異的に測定するエクルーシス®試薬 whole-PTHの測定性能評価を行った。また、当センターにおけるCKD患者のintact PTHとwhole PTHとの相関およびCKDステージG3, G4, G5およびG5D (dialysis: 透析)の4群におけるwhole PTH / intact PTH比の比較検討を行った。測定性能評価では再現性, 希釈直線性, 実効感度, 全てに良好な結果が得られた。相関ではwhole PTHはintact PTHの約7割を示し, 相関係数は良好であった。以上より, 本法は副甲状腺機能の判断に有用な測定法であると考えられた。CKDステージの上昇に伴いwhole PTH / intact PTH比は低下し, 透析群では他のステージと比較し幅広い分布を示した。現在, ガイドラインにおいて透析患者のwhole PTHの目標範囲にはintact PTHの目標範囲を1.7で割った値が使用されているが, 今後whole PTHの実測値から目標範囲を設定することが望まれる。

Key words PTH, whole PTH, intact PTH, CKDstage, whole PTH / intact PTH ratio

1. はじめに

副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone:PTH) は84個のアミノ酸からなる分子量約9500のペプチドホルモンであり, 骨吸収促進作用やリン利尿作用を有し, 血中のカルシウムやリンをはじめとしたミネラル代謝の調節を行っている。PTHは副甲状腺内で合成され, 大部分が生理活性を持つ完全な分子PTH 1-84として分泌される。PTH 1-84の半減期は2~4分と短く, 副甲状腺内や肝臓, 腎臓で代謝され, さまざまなPTHフラグメントに切断される。そのため, 血中にはPTH 1-84以外にPTH 7-84をはじめとする非活性PTHが混在している¹⁾。

慢性腎臓病 (chronic kidney disease:CKD) 患者では高頻度で二次性副甲状腺機能亢進症を合併し, 血管石灰化や骨折などを起こすことで生命予後にも影響を及ぼす。そのため, PTHを正確に捉えることは, CKD患者の骨・ミネラル代謝を管理していく上で重要である²⁾。PTHの測定法にはintact PTHが汎用されてきたが, 1998年にPTH 1-84以外に生理活性を持たないPTH 7-84も測定していることが明らかとなった。PTH 7-84は腎臓のみで代謝されるため, 腎機能障害患者では腎クリアランスの低下により血中に蓄積し, intact PTHでは副甲状腺機能を正確に把握できないことが報告されている²⁾。そこで生理活性を持つPTH 1-84を特異的に検出するwhole PTHが開発され, 臨床の場で使用されるようになった。現在, intact PTHでの測定は臨床経験が蓄積されており, 診療ガイドラインにおいてもintact PTHでの表記が一般的であるが, 今後whole PTHが主流となると考えられている。

今回, PTH 1-84を特異的に測定する「エクルーシス®試薬 whole-PTH」の測定性能評価を行った。また当センターのCKD患者を対象としてCKD分類によるCKDステージG3, G4, G5および透析群であるG5D (dialysis: 透析)の4群におけるwhole PTH / intact PTH比を比較検討し, 若干の知見を得たので報告する。

Received Apr. 24, 2019; Accepted Aug. 21, 2019
Yumiko MASAKI, Hiromi IRISHIO, Taiyou ANABUKI, Maki OGURA, Yoshimichi HARUNA
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪急性期・総合医療センター 臨床検査科
〒558-8558 大阪府大阪市住吉区万代東3-1-56
Department of Clinical Laboratory, Osaka General Medical Center
3-1-56 banndaihigashi, sumiyoshi-ku, Osaka 558-8558
連絡責任者: 正木裕美子
TEL: 06-6692-1201
E-mail: kagaku@gh.opho.jp

2. 対象および方法

1) 対象

2018年3月9日から4月19日までの期間に当センター腎臓高血圧内科より intact PTH測定依頼のあったCKD患者のEDTA-2K血漿を対象とした。今回対象としたCKD患者156例の内訳は男性118例、女性38例、平均年齢71.2 ± 11.8歳であった。

2) 測定機器および試薬

測定機器は電気化学発光免疫測定法 (Electro Chemiluminescence immunoassay: ECLIA) を原理とする装置cobas 8000<e602> (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用い、検討試薬である whole PTH測定試薬としてエクルーシス®試薬 whole-PTH (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を、対照試薬である intact PTH測定試薬としてエクルーシス®試薬 PTH (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いて検討を行った。

3) 検討内容

①再現性

メーカー専用コントロールであるエクルーシスプレチコントロール骨貧血マーカー2濃度を用いて、同時再現性 (n=20) および日差再現性 (n=20) を検討した。

②希釈直線性

whole PTH約1100pg/mLのプール血漿をエクルーシ

ス検体希釈液にて10段階希釈して測定した。

③実効感度

whole PTH低濃度プール血漿6検体を5日間測定し、シグナル値から換算した測定値の変動係数CVより precision profile を作成した。

④相関

対象となる156検体の intact PTHと whole PTHを測定し、2法の相関性について調べた。

⑤whole PTH / intact PTH比の比較

対象検体をCKD分類によってCKDステージG3, G4, G5およびG5Dの4群に分け、各群における whole PTH / intact PTH比を比較した。

3. 結果

1) 再現性

変動係数 (Coefficient of Variation: CV) % は同時再現性において0.94~0.97%、日差再現性において2.42~4.72%であった (Table 1, 2)。

2) 希釈直線性

測定上限は2300pg/mLであるが約1100pg/mLまでの原点を通る直線性を確認した (Fig. 1)。

3) 実効感度

CV10%となる濃度は4.36pg/mLとなり、測定下限である5.5pg/mLを下回った (Fig. 2)。

Table 1 Within-run Reproducibility.

	Low	High
N	20	20
Mean	39.9	121.1
Min	39.5	118.4
Max	41.0	123.3
SD	0.39	1.14
CV(%)	0.97%	0.94%

(pg/mL)

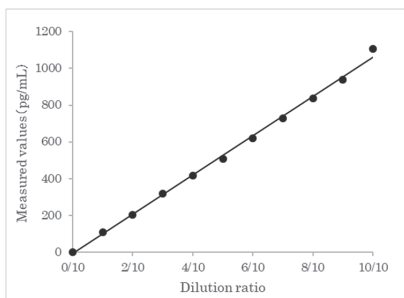


Fig. 1 Dilution linearity.

Table 2 Between-day Reproducibility.

	Low	High
Day	20	20
Mean	40.8	116.9
Min	38.7	111.7
Max	47.6	122.5
SD	1.93	2.82
CV(%)	4.72%	2.42%

(pg/mL)

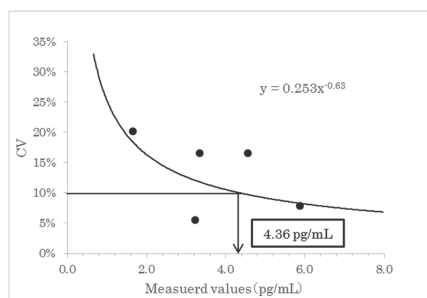


Fig. 2 Limit of Quantity.

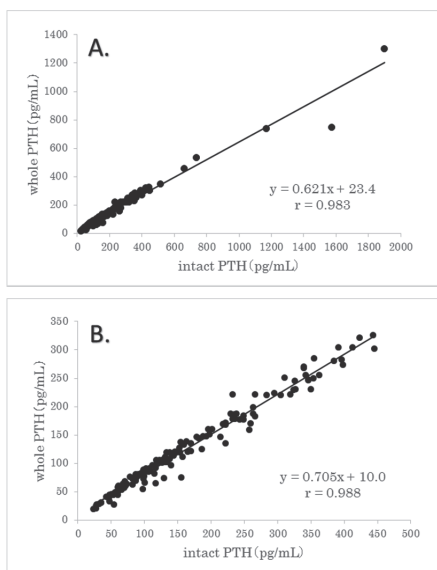


Fig. 3 Correlation between intact PTH and whole PTH.

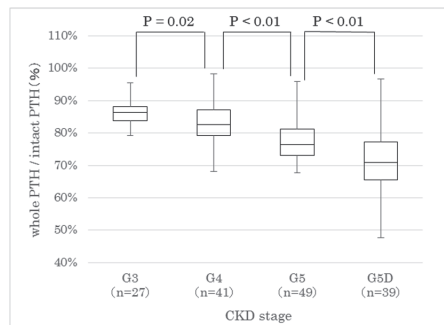


Fig. 4 whole PTH / intact PTH ratio in different CKD stages.

Table 3 Backgrounds of CKD stages.

CKD stage	G3	G4	G5	G5D
N	27	41	49	39
Gender(male / female)	23 / 4	31 / 10	34 / 15	30 / 9
Age(Mean ± 1SD)	69.9 ± 11.7	73.0 ± 12.0	74.0 ± 11.0	63.8 ± 12.0

4) 相関

intact PTH (x) と whole PTH (y) との相関は、全体では回帰式 $y=0.621x+23.4$ 、相関係数 $r=0.983$ (n=156)であった (Fig. 3-A)。intact PTHが500~2000pg/mLと高値であった6例を除いたintact PTHが500pg/mLまでの範囲では回帰式 $y=0.705x+10.0$ 、相関係数 $r=0.988$ (n=150)であった (Fig. 3-B)。相関係数は良好であったがwhole PTHではintact PTHに対し30~40%低値を示した。

5) whole PTH / intact PTH比の比較

今回対象としたCKD患者のうち、CKDステージG3は27例、CKDステージG4は41例、CKDステージG5は49例またCKDステージG5Dは39例であった (Table 3)。CKDステージごとにwhole PTH / intact PTH比を算出し比較した。平均値 ± 1SDはCKDステージG3では $86.8 \pm 4.1\%$ 、CKDステージG4では $83.4 \pm 6.3\%$ 、CKDステージG5では $77.0 \pm 5.9\%$ またCKDステージG5Dでは $70.4 \pm 11.0\%$ を示した。Spearmanの順位相関検定を行

ったところ、 $P<0.01$ 、相関係数 $\rho = -0.661$ となり、CKDステージの上昇に伴いwhole PTH / intact PTH比は有意に低下することがわかった。また、各CKDステージ間においてt検定を行ったところ、全てのCKDステージ間において有意水準5%で有意な差が認められた (Fig. 4)。

またCKDステージごとのwhole PTH / intact PTH比のCV%は、CKDステージG3では4.7%、CKDステージG4では7.4%、CKDステージG5では7.6%またCKDステージG5Dでは15.6%を示し、CKDステージG3~G5では10%以内であるのに対し、透析群であるCKDステージG5Dでは15%を超える結果となった。

4. 考察

測定性能評価では再現性、希釈直線性、実効感度、全てに良好な結果が得られた。希釈直線性に関して、測定上限は2300pg/mLとされているが今回は1100pg/mLまでの直線性しか検討できなかったため、今後さらに高濃

度付近の直線性の確認が必要である。相関ではwhole PTHはintact PTHの約7割を示し、相関係数は良好であった。

CKDステージの上昇に伴い、whole PTH / intact PTH比が低下していくことから、腎機能が低下するとintact PTHで検出される非活性PTHの貯留度合いが増加すると考えられた。腎機能が低下するにつれ非活性PTHが増加すると、whole PTH / intact PTH比のCV%が大きくなっていくことから非活性PTHの血中濃度は個人差が大きいことが示唆された。特に透析患者においてwhole PTH / intact PTH比のCV%が大きいことから、2006年に「透析患者における二次性副甲状腺機能亢進症治療ガイドライン」で示された透析患者における換算式「intact PTH = whole PTH × 1.7」が2012年に「慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常の診療ガイドライン」により撤廃されたことを裏付ける結果となった³⁾⁴⁾。「慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常の診療ガイドライン」において、whole PTH / intact PTH比は個人レベルでの大きなばらつきがあり、また治療により変動することが記載されている⁴⁾。しかし、2012年のガイドラインにおいてもintact PTHを1.7で割った値をwhole PTHの目標範囲としているため、この目標範囲を使用するにはintact PTH測定試薬の特徴をよく理解しておくことが必要であると考えられた。また、今後ガイドラインにおいては、intact PTHからの換算値ではなく、whole PTHの実測値でその目標範囲が設定されることが望ましいと考えられた。特に副甲状腺機能亢進症の中でも外科的治療が必要となる症例の多くは透析患者であり、2008年のシナカルセット塩酸塩の登場により手術件数は減っているものの内科的治療に抵抗を示す高度の二次性副甲状腺機能亢進症に対しては外科的治療が必要となるケースが多い。したがってこれらの症例における術中モニタリングに際しては副甲状腺機能をより鋭敏に反映するwhole PTHにより迅速に測定することでその有用性は高まるものと思われる。

5. 結論

エクルーシス®試薬 whole-PTHの基礎的性能は再現性、希釈直線性、実効感度、全てに良好な結果が得られた。またintact PTHとの相関は概ね良好であり、日常検査として十分使用可能と考えられた。本法は反応時間が18分と短時間で測定可能であることから、副甲状腺機能亢進症の外科的治療である副甲状腺摘出時に行われる術中迅速検査での利用にもその有用性が期待される。

本検討でCKDステージによってwhole PTH / intact PTH比に差が出ることが観察されたこと、また透析患者のwhole PTH / intact PTH比は幅広い分布を示すことから、ガイドラインの目標範囲を使用する際にはintact PTH測定試薬の特徴をよく理解しておくことが必要であり、今後whole PTHの目標範囲にはintact PTHを1.7で割った値を使用するのではなく、whole PTHの実測値から設定されることが望ましいと考えられた。

本論文の要旨は日本臨床検査自動化学会第50回大会にて発表した。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) 池田和人, 深川雅史PTH測定法の進歩 - Intact PTHアッセイとWhole PTHアッセイの比較について, THE BONE, 26;75-79:2002
- 2) 重松隆, 半羽慶行, 國本健, 柴田真希PTHアッセイの歴史と展望, 腎と骨代謝, 19;207-204:2006
- 3) 社会法人 日本透析医学会: 透析患者における二次性副甲状腺機能亢進症治療ガイドライン, 透析会誌 39(10);1435-1455:2006.
- 4) 社会法人 日本透析医学会: 慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常の診療ガイドライン, 透析会誌45(4);301-356:2012.

Dimension EXL200によるタクロリムス測定の基礎的検討と Turn Around Time の評価

Validation of Tacrolimus Assay by Dimension EXL200 and Evaluation of Turn Around Time

島野志都子¹⁾ 大川龍之介²⁾ 戸塚 実^{2,3)} 萩原三千男¹⁾ 東田修二¹⁾

要旨 ディメンジョンEXL200を使用し、affinity column mediated immunoassay (ACMIA) 法を測定原理とするフレックスカートリッジ タクロリムスTAC (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社) の基礎的性能と現行機種との Turn Around Time (TAT) の比較について検討を行った。試薬性能は概ね良好で、特に定量限界 (LoQ) は0.95ng/mLとなり、本試薬の性能である1.0ng/mLを十分に満たしていることが確認できた。また、TATは現行機種と比較して平均13分33秒短縮した。以上の結果より、本法は性能が良好でかつ測定時間もより短く、診療前検査として有用であると思われる。

Key words tacrolimus, quantitative limit, TAT, Dimension EXL200

1. はじめに

タクロリムスは、わが国で放線菌 *Streptomyces tsukubaensis* の代謝産物としては発見され、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (graft versus host disease : GVHD) の予防、臓器移植後の拒絶反応の抑制¹⁾、さらに関節リウマチ²⁾、ループス腎炎、潰瘍性大腸炎^{3,4)}、視神経脊髄炎関連疾患⁵⁾へと多岐にわたって使用されている薬剤である。本薬剤は有効治療域が狭く、体内動態も大きいため、血中濃度の経時的監視が不可欠である。また、微量で強力な薬理効果を発揮する反面、腎機能障害⁶⁾、血圧上昇⁷⁾、耐糖能異常⁸⁾などの副作用が起こることもあり、血中濃度の適切な調節が重要であるため、迅速にかつ精度良く測定できる測定法が求められてい

る。タクロリムスは生体内において90%以上が赤血球中に移行するため¹⁾、赤血球からの抽出と除蛋白を行うため検体の前処理操作が必要であるが、操作の煩雑さや測定者間による測定値のバラツキなどが問題視されていた。今回、前処理が自動化された「フレックスカートリッジタクロリムスTAC® (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社)」の試薬が発売されたため、試薬の基礎的性能と Turn Around Time (TAT) について検討を行った。

2. 対象及び測定機器、試薬

1) 対象

東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認後 (M2016-056)、当院にタクロリムスの検査依頼があった患者の測定終了後の残余検体 (EDTA・2K) 102例を対象とした。

Received Jun. 25, 2019; Accepted Jul. 24, 2019
Shitoko SHIMANO¹⁾, Ryunosuke, OHKAWA²⁾,
Minoru TOZUKA^{2,3)}, Michio HAGIHARA¹⁾, Syuji TOHDA¹⁾

¹⁾東京医科歯科大学医学部附属病院検査部

²⁾東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

³⁾長野県立こども病院生命科学研究センター
〒113-5819 東京都文京区湯島1-5-45

⁴⁾〒399-8288 長野県安曇野市豊科3100

¹⁾Clinical laboratory, Medical Hospital of Tokyo
Medical and Dental University

²⁾Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University

³⁾Life Science Research Center, Nagano Children's
Hospital

1-5-45 Yushima Bunkyo-ku, Tokyo, Japan 113-5819

³⁾3100 Toyoshina Azumino-shi Nagano 399-8288

Corresponding author : 島野志都子

TEL : 03-5803-5619

E-mail : shitsuko.mlab@tmd.ac.jp

2) 測定機器, 試薬

検討法の機器はディメンジョン EXL200 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社), 試薬は, affinity column mediated immunoassay (ACMIA) 法を測定原理とするフレックスカートリッジ タクロリムスTAC (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社) を使用した。対照には現行法の機器アーキテクト i2000SR (アボット ジャパン 株式会社), 試薬は chemiluminescent enzyme immunoassay (CLIA) 法を測定原理とするタクロリムス アボットを使用した。

3. 検討方法及び結果

1) 基礎的性能評価

性能評価は一般社団法人日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会による「定量測定法に関するバリデーション指針」⁹⁾に準じ, バリデーション算出用プログラム (Validation-Support/Excel Ver3.2) を使用して実施した。

Table 1 Repeatability

Sample	Control			Human whole blood	
	Low	Medium	High	A	B
Mean (ng/mL)	4.4	11.9	22.8	2.3	14.5
SD (ng/mL)	0.13	0.24	0.58	0.10	0.52
CV (%)	2.9	2.0	2.5	4.5	3.6

Table 2 Intermediate precision

Sample		Control		
		Low	Medium	High
Mean (ng/mL)		4.4	11.8	23.4
Precision (ng/mL)	Within Run	0.15	0.34	0.51
	Between Day	0.17	0.33	0.65
	Overall	0.23	0.47	0.83
CV (%)	Within Run	3.4	2.8	2.2
	Between Day	3.9	2.8	2.8
	Overall	5.2	4.0	3.5

(1) 併行精度

3濃度のRap/Tac/CsA Control (More Diagnostics社製) およびヒト全血 (EDTA・2K) を使用して20回連続測定を行い評価したところ, CVは2.0~4.5%であった (Table 1)。

(2) 室内再現精度

併行精度の検討と同一の3濃度のControlを用い, 初日のみキャリブレーションを実施し, 20日間2重測定 (n = 40) を行い評価したところ, CVは3.5~5.2%であった (Table 2)。

(3) 検出限界および定量限界

ブランク上限 (LoB : Limit of Blank) は, 0ng/mLのブランク溶液を1日12回5日間, 検出限界 (LoD : Limit

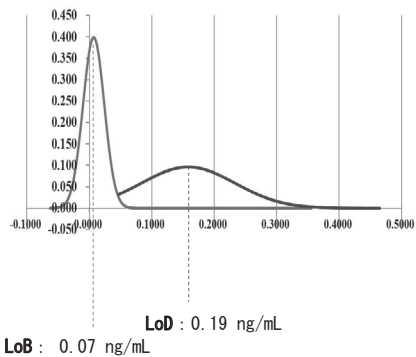


Fig. 1a Limit of Blank (LoB) and Limit of Detection (LoD)

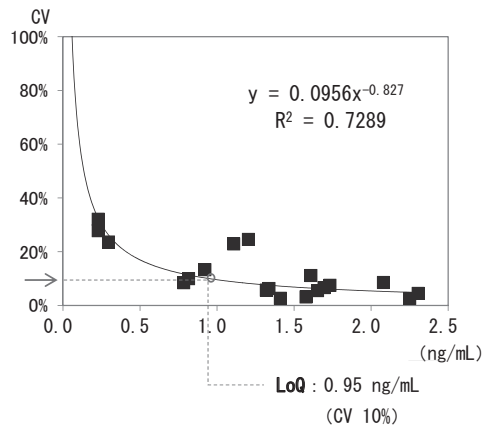


Fig. 1b Limit of Quantitation (LoQ)

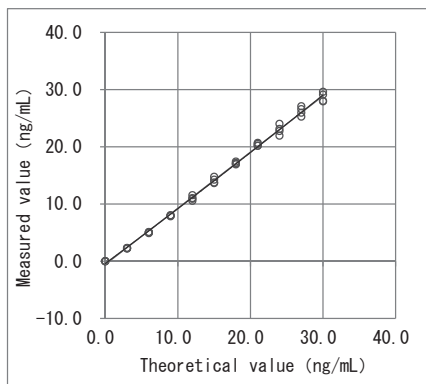


Fig. 2 Linearity

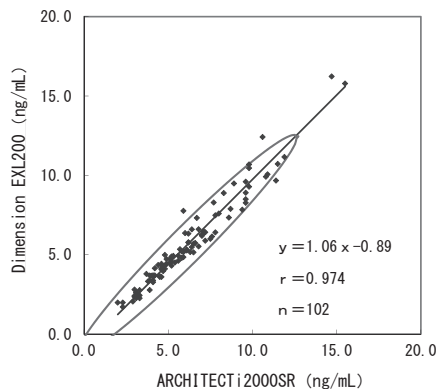


Fig. 4 Comparison test

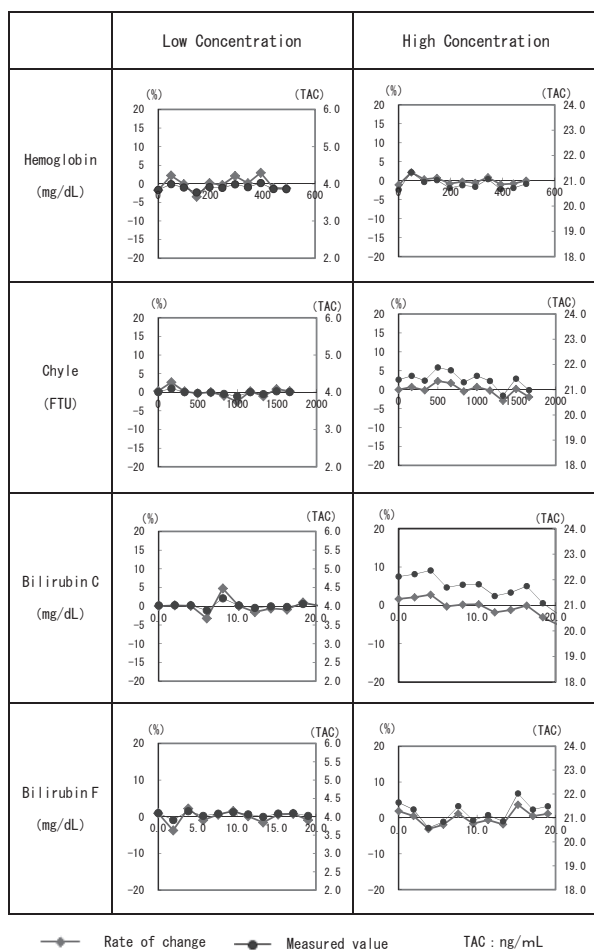


Fig. 3 Effect of interfering substances

of Detection) は1.0ng/mL付近の6試料をそれぞれ1日1回5日間測定した。ノンパラメトリック法で評価したところ、LoBは0.07ng/mL、LoDは0.19ng/mLであった (Fig. 1a)。

定量限界 (LoQ : Limit of Quantitation) は3.0ng/mL以下の20試料を各々1日2回5日間測定しprecision profileを求め、CV10%の点から推定したところ、0.95 ng/mLであった (Fig. 1b)。

(4) 直線性

約30ng/mLのタクロリムス標準液レベル5を0濃度のタクロリムス標準液レベル1を用いて10段階に希釈し4回測定し、分散分析法で評価 ($p < 0.001$ の場合に直線性が認められないと判定する) したところ、28.7ng/mL ($p = 0.1760$) まで直線性が確認できた (Fig. 2)。

(5) 特異性、選択性

Control低濃度と高濃度の2試料に干渉チェックAプラス (シスメックス株式会社) を用いて検討を行い、変化率10%以内を影響なしと判定したところ、2試料ともにヘモグロビンは490mg/dL、乳びは1660ホルマジン濁度、抱合型ビリルビンは20.4mg/dL、遊離型ビリルビンは19.0mg/dLまで影響は認められなかった (Fig. 3)。

(6) 比較試験

102検体を対象に現行法であるアーキテクト i2000SRによる測定結果との相関性を標準主軸回帰法で評価したところ、回帰式は $y = 1.06x - 0.89$ 、相関係数は $r = 0.974$ であった (Fig. 4)。

2) TAT比較検討

TAT計測と測定操作の手順を Fig. 5に示す。現行法であるアーキテクト i2000SR (以下アーキテクト) では検体到着後、マイクロチューブに検体を分注すると同時に時間計測を開始した (計測開始点と設定)。前処理剤の分注、ボルテックスミキサーで攪拌、13000rpmで4分間の遠心分離、上清を専用チューブにデカント、ボルテックスミキサーで攪拌、機器に架設と6つの工程を経て測定を開始した。測定後、本体のオーダーステータス画面に表示された終了時刻を計測終了点として設定し、計測開始点から計測終了点までに経過した時間を比較検討用のTATとした。一方、ディメンジョン EXL200 (以下ディメンジョン) では、検体到着後、アーキテクトと同条件にするため予めオーダ入力完了しておき、サンプルカップに検体を分注すると同時に時間計測を開始し (計測開始点と設定)、検体ラックを機器に架設し測定

を開始した。結果が印字された終了時刻を計測終了点として設定し、計測開始点から計測終了点までに経過した時間を比較検討用のTATとした。TATの比較は技師4名のTATの平均を算出して比較を行った。アーキテクトのTATは平均35分14秒 (34分45秒~35分9秒)、ディメンジョンのTATは平均21分41秒 (20分54秒~22分51秒) となり、二台の機器のTATの差は平均13分33秒 (12分4秒~13分52秒) となり有意にディメンジョンでのTATが短縮した結果となった (Fig. 6)。

4. 考察

タクロリムスは免疫抑制薬として臓器移植や自己免疫疾患のほか潰瘍性大腸炎にも治療薬として使用されている。いずれの場合にも過剰投与によって副作用が起きる危険性や投与不足による拒絶反応が発生するリスクもあり、薬物動態と効果・副作用のモニタリング、すなわちtherapeutic drug monitoring (TDM) が必須で、次回服用直前の血中濃度 (トラフ値) の測定は重要である。臓器移植における「免疫抑制薬TDM標準化ガイドライン2018」¹⁾において、タクロリムスのトラフ値の目標血中濃度は術後経過0~1ヶ月で8~15ng/mL、1~3ヶ月で5~12ng/mL、3ヶ月以降は5ng/mL前後となっている。また、高齢者の関節リウマチの治療では低用量から開始されること²⁾、腎移植におけるmTOR阻害薬 (エベロリムス) との併用でタクロリムス濃度の最小化について検討した試験のプロトコルではトラフ値を1.5~3.0ng/mLと設定した報告¹⁰⁾や視神経脊髄炎関連疾患におけるタクロリムスのモニタリングにおいては採血時間における濃度差を検討された報告⁵⁾もあり、低濃度域を正確に測定できることを臨床から求められている。

現在、タクロリムスの血中濃度測定法にはchemiluminescent enzyme immunoassay (CLIA法)、affinity column mediated immunoassay (ACMIA法)、enzyme multiplied immunotechnique (EMIT法)、enzyme-linked immunoassay (ELISA法)、latex agglutination turbidimetry (LTIA法) が日常検査法として汎用されている。しかしながら、報告されている測定試薬、機器の性能評価法、特に重要視されている感度試験の方法には差異があり十分な評価ができていないといえる。このため、今回試薬の基礎的性能評価は、日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会による「定量測定法に関するバリデーション指針」⁹⁾ に準じて実施した。

「フレックスカートリッジタクロリムスTAC」の基礎的性能は概ね良好であった。併行精度はControlでは

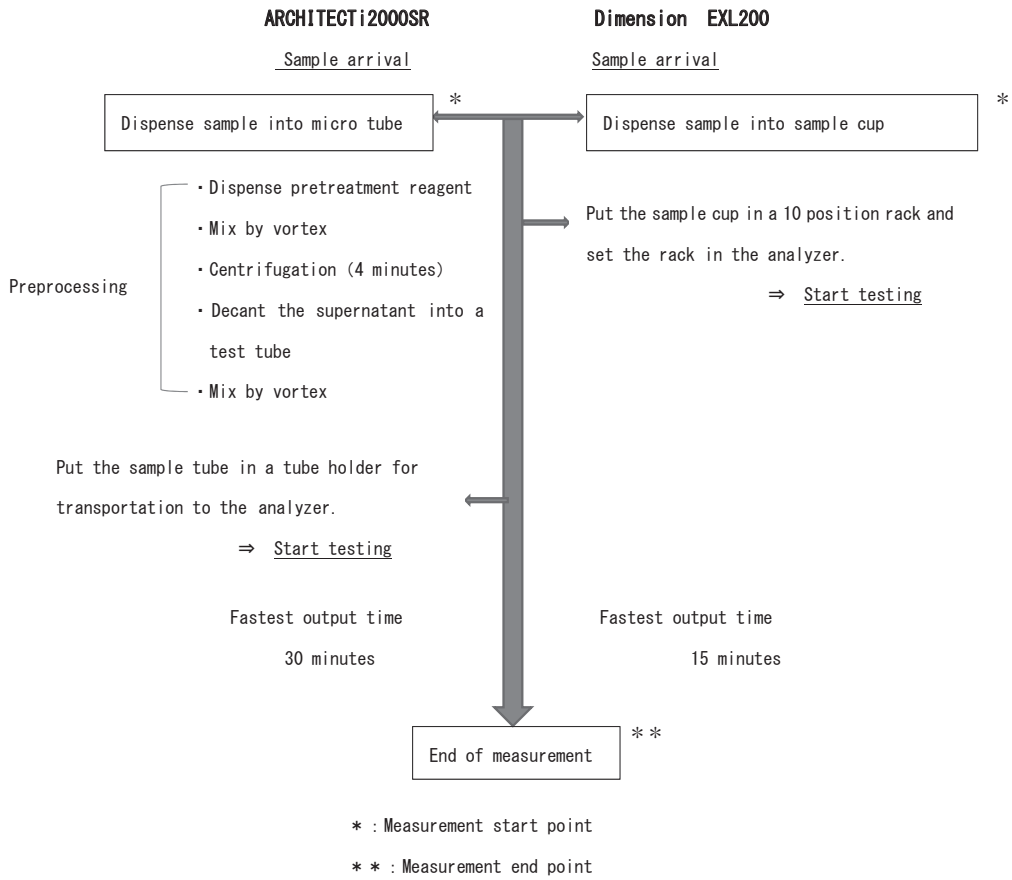


Fig. 5 Flow of measurement operation

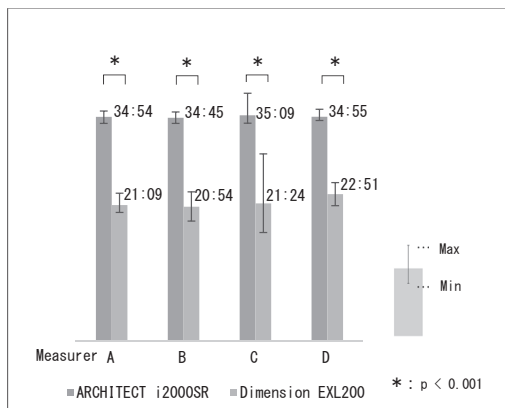


Fig. 6 TAT comparison

CVは2.0~2.9%であったの対し、ヒト全血ではCVが3.6~4.5%となり、Controlと比較してヒト全血のCV%が大きい値となった。これは、ヒト全血がControlと比較してタンパク成分などにより粘性が高いためであると推測された。したがって、Controlだけでなく、実際にヒト全血を用いても確認することが必要であると考えられた。

定量限界 (LoQ) は0.95ng/mLとなり、本試薬の性能である1.0ng/mLを十分に満たす結果が得られ、上述のような超低濃度域のトラフ値の測定にも十分に対応可能であった。アーキテクト i2000SRとの比較試験 (n = 102) では相関性を標準主軸回帰法で評価したところ、回帰式は $y = 1.06x - 0.89$ 、相関係数は $r = 0.974$ であった。本法は全血測定であるため、血漿成分中の妨害物質の影響による偽高値が指摘されていたが¹¹⁾⁻¹⁴⁾、抗体試

薬, 前処理試薬, 磁性粒子コーティング方法の変更により特異性が向上し, 除蛋白操作後に測定したアーキテクトとの相関性が良好な結果となったと推測された。本研究では大きな乖離検体や異常な測定値は確認できなかったが, 本法のように免疫反応を用いた測定法では, 異好性抗体や特にマウスモノクローナル抗体を用いた製剤による治療を受けた患者の検体中にはヒト抗マウス抗体 (Human anti-mouse antibody: HAMA) などによる非特異反応が起こりえる¹⁵⁾¹⁶⁾ことも念頭におき, 臨床と合致しない場合は確認が必要である。

TATの比較検討ではルチン検体を使用して実施したため, 検体到着後アーキテクトでは1本ずつ前処理操作開始と同時に計測を開始したが, デイメンジョンではカップに検体を分注したタイミングで計測を開始させ, 最大10検体分まとめて分注後に検体ラックを機器に架設して測定した。このため, 本体スタンバイモードから起動時間にかかる2分間に加えて, 先頭の検体と末尾の検体のサンプリング待ち時間の差が加算されてしまっており, アーキテクトとデイメンジョンの二台の機器のTATの差は平均13分33秒という結果となった。アーキテクトでの計測時間に測定用チューブへのラベルの貼付, 遠心用チューブのナンバリングなどの資材の前準備の時間を含み, デイメンジョンで1検体分注毎に測定を開始するとさらにTATの差が大きくなると予測された。タクロリムスの治療モニタリングは外来診療でも行われており, TATの短縮は診療前検査として臨床に対し大きな貢献をもたらすことが期待される。

5. 結語

「フレックスカートリッジタクロリムスTAC」の基礎的性能は良好であり, 特に低濃度域の測定性能において優れていた。さらに, 本法は測定前の用手による検体の前処理が不要でかつ測定時間も短いため, 迅速な診療前検査結果の報告に貢献できると思われた。

本論文の要旨は, 日本臨床検査自動化学会第49回大会にて発表した。

本論文の発表に関連して, 開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

6. 謝辞

本解析に加わった垂門碧氏 (非会員) に深謝します。

文献

- 1) 谷川原祐介, 増田智先, 佐藤 滋ほか, 免疫抑制薬 TDM 標準化ガイドライン2018 臓器移植編, TDM 研究, 2019;36;1:19-41
- 2) 堤野みち, 山中 寿, 経口抗リウマチ薬を総括する その他の経口抗リウマチ薬, 分子リウマチ治療, 2017;10;4:28-31
- 3) 仲瀬裕志, 炎症性腸疾患治療薬の使い方と特性 免疫調節薬: タクロリムス, シクロスポリン, Nippon Rinsho, 2018;76;3:326-329
- 4) 杉山昌秀, 青木 悠, 篠原 佳祐ほか, 連日血中濃度測定によりタクロリムスを調整した海洋性大腸炎の2症例, 日農医誌, 2018;67;4:512-515
- 5) 田中正美, 視神経脊髄炎関連疾患における tacrolimus 血中濃度モニタリング, 神経治療, 2017;34;5:547-551
- 6) 奥山 慎, リウマチと腎疾患, Bone Joint Nerve, 2016;6;2:285-291
- 7) 神出 計, 薬剤誘発高血圧 免疫抑制薬, 抗がん剤, 血圧, 2014;21;12:27-31
- 8) 川合眞一, タクロリムスの有害事象・有害反応, 医学のあゆみ, 2014;250;11:1005-1010
- 9) 山本慶和, 細萱茂実, 桑克彦ほか, 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会: 定量測定法に関するバリデーション指針, 臨床化学;2011;40;2:149-157
- 10) Langer RM, Hene R, Vitko S, et al. Everolimus plusearly tacrolimus minimization: a phase 3, randomized, open-label, multicenter in renal transplantation. *Transplant Int*, 2012;25:592-602
- 11) 植田貴史, 山森元博, 小野由香里ほか, ACMIA 法で異常高値を示す症例の判別法の検討, TDM 研究, 2010;27;4:168-172
- 12) D'Alessandro M, Mariani P, Mennini G, et al. Falsely elevated tacrolimus concentrations measured using the ACMIA method due to circulating endogenous antibodies in a kidney transplant recipient. *Clin Chim Acta*, 2011;412:245-248
- 13) Altimier S, Varagnolo M, Zaninotto M, et al. Heterophilic antibody interference in a non-andogenous molecule assay: An apparent elevation in the tacrolimus concentration. *Clin Chim Acta*, 2009;402:193-195
- 14) Parikh BA, Siedlrci AM, Scott MG. Specificity of a circulating antibody that interferes with a widely used tacrolimus immunoassay. *Ther Drug Monit*, 2010;32:228-231
- 15) 阿部正樹, 八木道隆, 渡邊孝子ほか, ACMIA 法によるタクロリムス測定に影響する非特異反応物質の解析, 臨床病理, 2013;61;11:983-988
- 16) Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem*, 1999;45:942-956

尿中アルブミン測定試薬「LZテスト‘栄研’U-ALB」の性能評価と検体前処理の検討

Validation of “LZ Test EIKEN U-ALB” and Sample Processing for Urine Albumin Measurement

阿部広輝¹⁾ 島野志都子¹⁾ 大川龍之介²⁾
戸塚 実²⁾³⁾ 萩原三千男¹⁾ 東田修二¹⁾

要旨 尿中アルブミン測定試薬「LZテスト‘栄研’U-ALB」の性能評価および尿中アルブミン測定用検体の安定性の検討として、濃度別プール尿による保存温度の影響、各種蓄尿保存剤の影響、および尿酸塩析出検体での前処理について検討を実施した。

試薬性能は良好であった。検体は新鮮尿での測定が望ましいが、やむを得ず測定できない場合は、3日以内なら4℃で、長期保存する場合は-80℃が適していた。また、蓄尿保存剤を使用した検体での尿中アルブミン測定は避けるべきであると考えられた。

Key words urine albumin, microalbumin, collection of urine, uriMeasure

1. はじめに

尿中アルブミン測定は糖尿病性腎症の早期発見や慢性腎臓病における重症度分類のため、日常検査として広く行われており¹⁾、汎用自動分析装置を使用し定量化の報告が主流となっている。測定対象となる尿検体は新鮮尿での測定が望ましいが、被験者の採尿の都合により、やむを得ず直ちに測定できない場合は、測定するまで適切に保管する事が重要である。

また24時間尿（蓄尿）検体においても時間経過や蓄尿保存剤の使用により測定値が変動する事が予想される。測定精度の維持のためには、これら検体保存や前処理の条件設定が重要であるが、十分な検討結果が得られ

ているとは言い難い。

我々はラテックス凝集比濁法を原理とした、LZテスト‘栄研’U-ALBの基礎的検討を行う機会を得たため、試薬の基本的性能を確認後、尿検体の保存、蓄尿検体の条件、測定前処理による測定値への影響を検討したので報告する。

2. 対象及び測定機器、試薬

1) 対象

本検討に使用した検体は、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認（M2016-219）のもとに、当院検査部に提出された尿検体の残余を使用した。これらの検体は日本臨床検査医学会の「臨床検査を終了した残余検体

Received Jun. 27, 2019; Accepted Jul. 18, 2019
Hiroki ABE¹⁾, Shitoko SHIMANO¹⁾, Ryunosuke OHKAWA²⁾, Minoru TOZUKA²⁾³⁾, Michio HAGIHARA¹⁾, Syuji TOHDA¹⁾

¹⁾東京医科歯科大学医学部附属病院検査部

²⁾東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

³⁾長野県立こども病院生命科学研究センター

¹⁾²⁾ 〒113-5819 東京都文京区湯島1-5-45

³⁾ 〒399-8288 長野県安曇野市豊科3100

¹⁾Clinical laboratory, Medical Hospital of Tokyo Medical and Dental University

²⁾Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

³⁾Life Science Research Center, Nagano Children's Hospital

¹⁾²⁾ 1-5-45 Yushima Bunkyo-ku, Tokyo 113-5819

³⁾ 3100 Toyoshina Azumino-shi Nagano 399-8288

Corresponding author: 島野志都子

TEL: 03-5803-5704

E-mail: shitsuko.mlab@tmd.ac.jp

の(既存試料)の業務, 教育, 研究のための使用について」に基づき連結不可能匿名化を行って使用した。

2) 測定機器, 試薬

試薬は「LZテスト・栄研U-ALB」(栄研化学株式会社)を用い, 測定機器には「LABOSPECT008」(株式会社日立ハイテクノロジーズ)を使用した。測定原理はラテックス凝集反応を応用した光学的測定法を原理としている。ラテックス粒子表面に抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体を結合させたラテックス試液とアルブミンが反応しラテックスは凝集する。この凝集を濁度変化として測定する事により検体中のアルブミン濃度を求める。

3. 検討方法及び結果

1) 尿中アルブミン試薬の基本性能の評価

(1)同時再現性: メーカー指定の2濃度の管理試料, ならびに患者プール尿を用いて20回連続測定を行い評価

Table 1a Within-run precision

	U-ALB L	U-ALB H	Pool Urine
Mean (mg/L)	25.09	200.40	260.79
SD (mg/L)	0.30	1.57	2.18
CV(%)	1.21	0.78	0.84

Table 1b Between-day precision

	U-ALB L	U-ALB H
Mean (mg/L)	25.47	197.49
SD (mg/L)	0.63	1.64
CV(%)	2.48	0.83

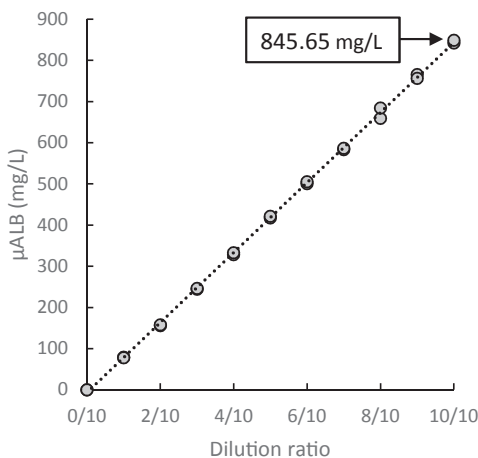


Fig. 1 Linearity

- したところCVは, 0.78~1.21%であった (Table 1a)。
- (2)日差再現性: 同時再現性の検討と同一のコントロールを用い, 初日のみキャリブレーション後に, 35日後まで間隔をあげ2重測定した結果から評価したところCVは, 0.83~2.48%であった (Table 1b)。
- (3)希釈直線性: 高濃度試料を10段階希釈後, 2重測定しその平均値から直線性を求めたところ, 測定上限値800mg/Lまで良好な直線性を示した (Fig. 1)。
- (4)検出限界: 25mg/Lの試料を10段階希釈し, 各濃度10重測定し2.6SD法にて検出限界を求めたところ, 検出限界は2.5mg/Lであった (Fig. 2)。
- (5)プロゾーン現象の確認: 40,000mg/Lの高濃度試料を10段階希釈後, 2重測定しプロゾーンについて評価したところ, プロゾーンがあった測定値には“プロゾー

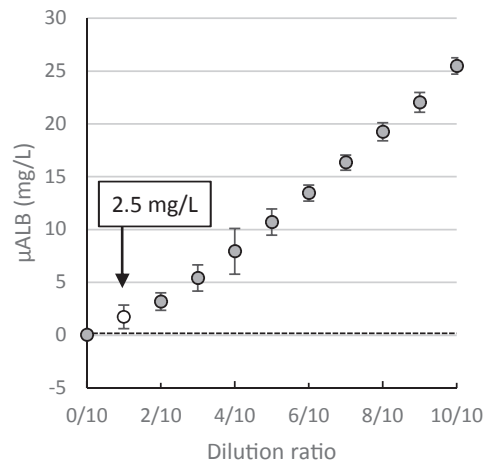


Fig. 2 Detection limit.

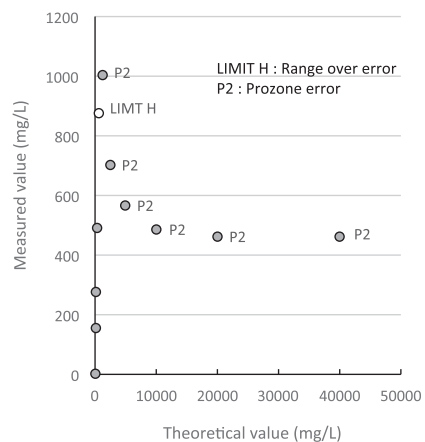


Fig. 3 Prozone test

ンエラー”と識別され検出可能であった (Fig. 3)。

(6)共存物質の影響：干渉チェックAプラス（シスメックス株式会社）を用いて検討を行い、変化率10%以内を影響なしと判定したところ、抱合型ビリルビンは20mg/dL、ヘモグロビンは500mg/dL、乳びは3,000 FTUまで影響は認められなかった。この他に、アスコルビン酸は50mg/dL、グルコースは10g/dLまで同様に影響がなかったことを確認した。

2) 尿中アルブミン測定に影響を与える因子の検討

(1)検体保存温度の影響：50, 100, 300, 500, 1,000mg/L付近となる5濃度のプール尿を患者尿から作製、保存管に分注し、-80℃、-30℃、4℃、室温に保存して最大35日後まで保存温度の影響を評価した。プール尿作成時は目標濃度に近い尿検体を使用し、日常検査での検体保存を想定し、遠心処理は実施したが、フィルターによる細菌除去等を行わなかった。測定時は

室温で解凍、混和後にシングル測定した。事前検討から測定結果が測定上限値800mg/Lを超える可能性のある500mg/Lの系列と、1,000mg/Lの系列は、測定装置の希釈機能を使用して同一条件で測定した。

室温保存では300mg/Lのプール尿を除いて2週間の間、試薬添付文書に記載されている正確性の±15%以内を満たしており安定していた。300mg/Lのプール尿では翌日には低下し、その後上昇が見られた。4℃保存では3日後までは15%以内の安定性が確保され、35日間での変化率は90.4~123.9%であった。-30℃保存では、50~500mg/Lのプール尿では4℃保存より安定していたが、1,000mg/Lのプール尿のみ凍結翌日には30%以上の上昇が見られた。-80℃での保存は全ての濃度で最も安定し、35日間での変化率は91.6~105.9%であった (Fig. 4)。

(2)蓄尿保存剤の影響：保存温度の影響を調べた100,

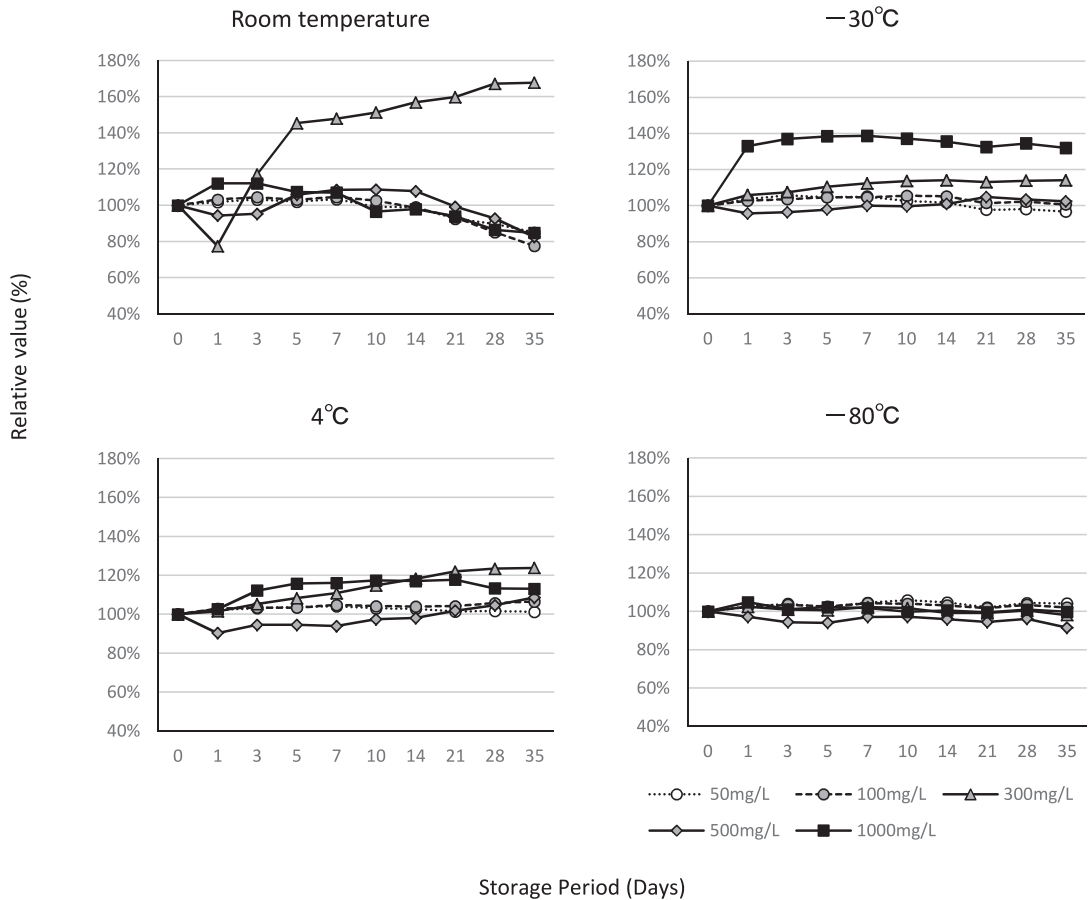


Fig. 4 Stability test

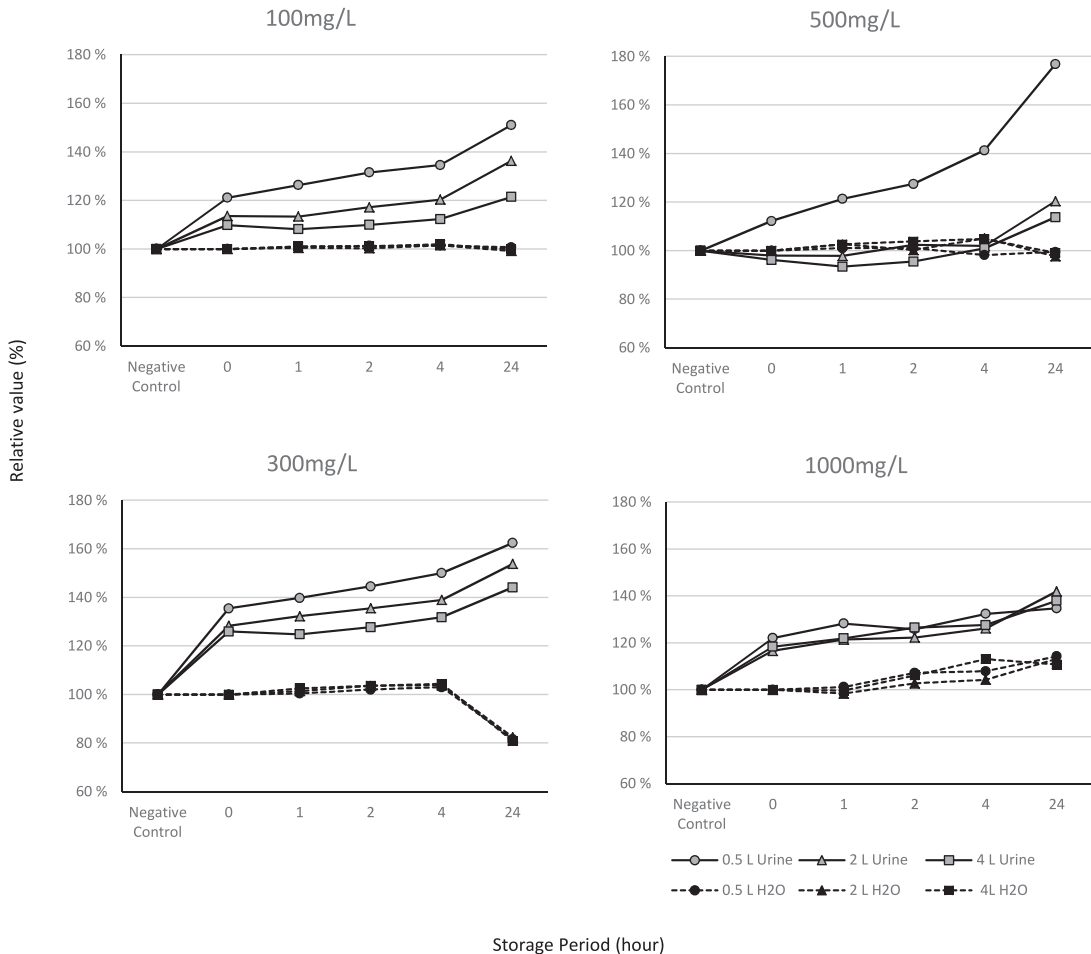


Fig. 5 Effect of UriMeasure

300, 500, 1,000mg/L付近となる4濃度のプール尿に対し、蓄尿保存剤(ユリメジャー・タブレット, 酸性ユリメジャー・T (関東化学株式会社), 尿C-ペプチド安定化剤 (栄研化学株式会社))の各1回分をそれぞれ100mlの蒸留水で溶解した溶液を, 想定される蓄尿量(0.5L, 2L, 4L)での使用時と同等の濃度になるよう尿に添加し, 添加直後, 1h後, 2h後, 4h後, 24h後の5回測定を行った。また, 対照として蒸留水のみ添加した検体も測定し, この添加直後の値を100%とし, 影響を評価した。

ユリメジャーの添加群では尿中アルブミンの上昇傾向が見られた。ユリメジャーの相対的濃度の低い, 蓄尿量2L, 4L相当の検体では, 最大1.5倍程度まで尿中

アルブミン値が上昇した (Fig. 5)。

Cペプチド安定化剤の添加群では, 相対濃度により傾向が異なった。尿量0.5Lのグループは緩やかな低下傾向を示したが, 尿量2L, 4Lのグループでは緩やかな上昇傾向を認めた。24時間後のpHは8.5以上であった (Fig. 6)。

酸性ユリメジャーの添加群では, 相対濃度の高い, 尿量0.5Lのグループでは全てが, 尿量2Lのグループは, 尿中アルブミン濃度100~500mg/Lの検体は24時間後までに低下しているが, 1,000mg/Lのプール尿は低下しなかった。また, 一方で尿量4Lのグループでは尿中アルブミン値の低下はみられなかった。24時間後のpHは, いずれもpH 5以下であった (Fig. 7)。

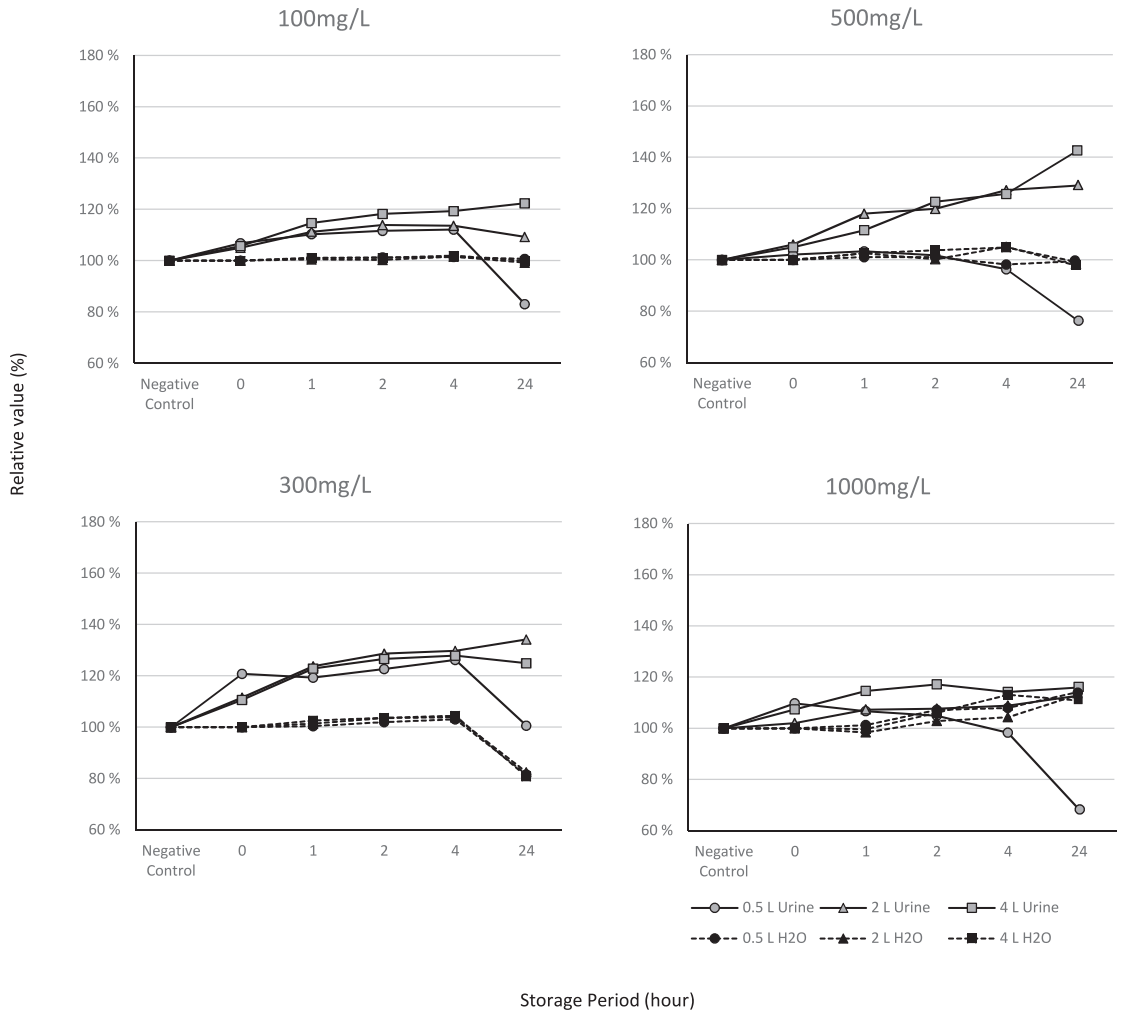


Fig. 6 Effect of Stabilizer on urinary C-peptide

対照として作製した蒸留水のみ添加した群では、尿中アルブミン濃度300 mg/Lの検体で24時間後に低下を認め、また、濃度1,000 mg/Lの検体で緩やかな上昇傾向を認めた。これは検体保存温度の検討と同じプール尿を使用したため、室温保存時と同じ傾向を示したものと考えられる。

- (3)尿酸塩析出検体での加温と遠心処理の影響：1~7日間の冷蔵保存によって尿酸塩の析出した尿中アルブミン濃度30mg/L以上の18人の患者尿について、37℃加温による尿酸塩の再溶解の有無と比較したところ、30~2,300mg/Lまでの濃度関において、溶解遠心後の結果は、未溶解遠心後の94.9~104.9%であり、濃度に

問わず尿酸塩の析出および溶解による尿中アルブミン測定値への影響は少ないものと考えられた (Fig. 8)。

4. 考察

本試薬の基礎的性能は良好であった。無希釈で800 mg/Lまで測定でき、さらに血中アルブミン濃度に相当する40,000mg/Lの高濃度試料においてもプロゾーンを検出できるため精度の高い結果を臨床に報告することができると思われた。本検討では結果より測定範囲を2.5~800mg/Lとし、測定上限値800mg/Lを超えるプール尿および尿検体は測定装置の機械希釈により蒸留水で希釈させ、同一条件で測定を行い、検体の安定性と前処理

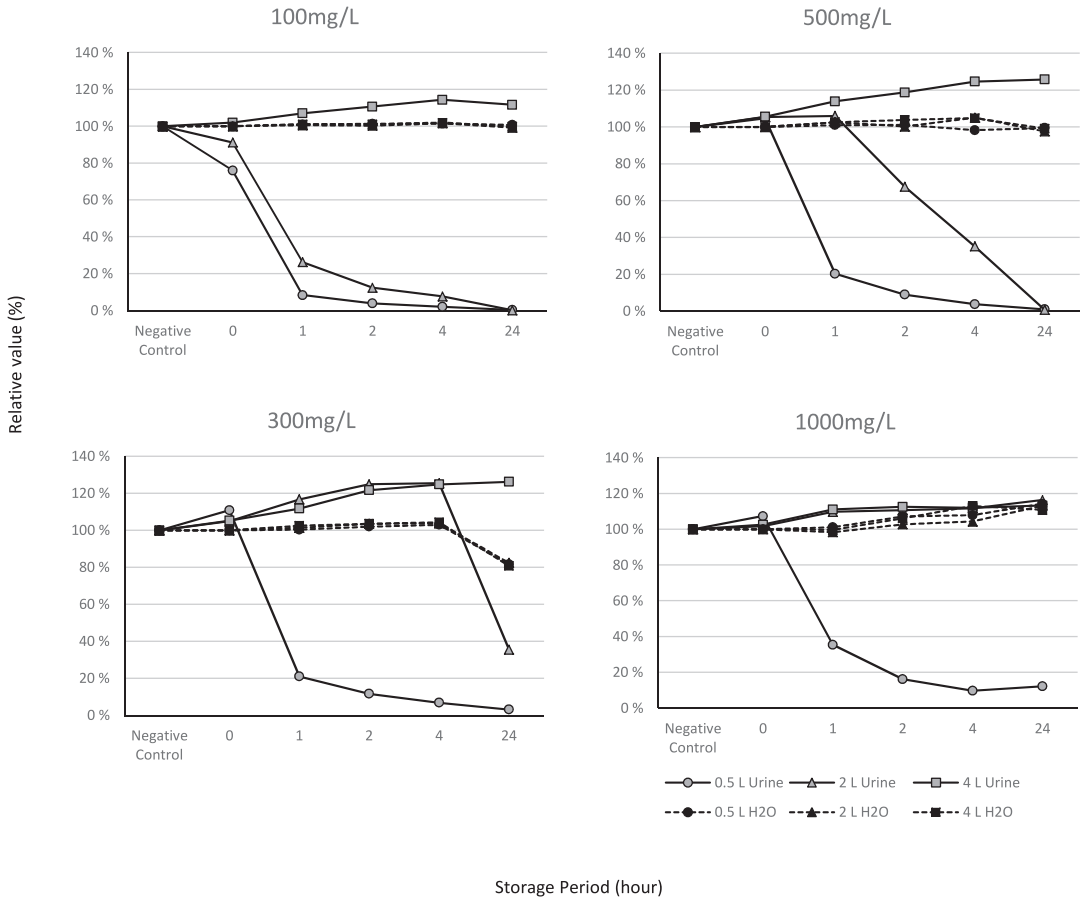


Fig. 7 Effect of Acid UriMeasure

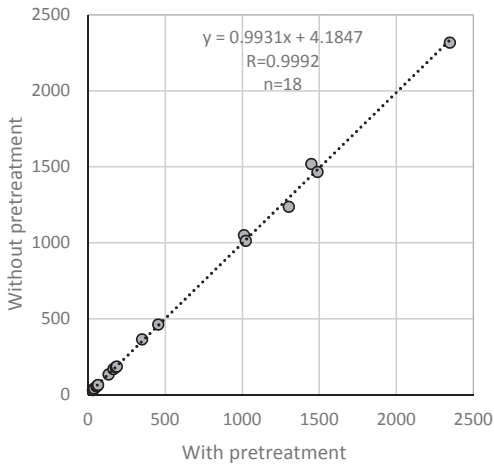


Fig. 8 Comparison of urinary albumin level between with and without pretreatment (mg/L)

について検討を行った。

室温、4℃、-30℃、-80℃の4つの温度域で最大35日間までの検体保存温度による影響について検討したところ、既報²⁾³⁾と同様に-80℃での保存が最も安定していた。室温保存では300mg/Lを除いた4つのプール尿で2週間は安定していたが、その後ほぼ一様に低下した。このような変化は4℃以下では認められなかったことから、室温下で起こりえる尿成分の変性や細菌の増殖による影響⁴⁾を受けていると考えられた。300mg/Lのプール尿では翌日に低下し、その後上昇するという他のプール尿と異なる挙動を示した。原因については尿成分の変性や細菌の増殖による影響のほかに、アルブミンの重合などが考えられたが特定することができなかった。

-30℃で保存すると1,000mg/Lのプール尿は保存後翌日後から30%以上高値となった状態のまま35日間持

続した。-20℃の保存では、尿中の溶質濃度が高い場合、中心部分でモル氷点効果の作用により凍結が起こらない場合があることが知られており⁵⁾、-20℃で凍結保存された尿検体においてアルブミン測定値に影響を及ぼすとの報告もある²⁾³⁾⁶⁾。一方で健常人尿をSDS-PAGE（電気泳動法）後にウエスタンブロット法を行うと、主バンドの分子質量66kDaがアルブミンであるが、糖尿病患者や慢性腎不全患者の尿では低分子のバンドが出現し、尿中アルブミンのフラグメント化が起きていることが報告されている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。Sviridovらはフラグメント化したアルブミンは保存状態の違いやpHによっても起こると報告している⁶⁾。本検討においては-30℃保存ではあるが1,000mg/Lのプール尿だけが他のプール尿と挙動が異なったことから、尿の凍結状態、プールされた尿の患者の病態などによりフラグメント化した低分子アルブミンが重合化しエピトープが多くなり、本試薬中の抗ヒトアルブミンマウスモノクローナル抗体との反応性が亢進したと推測された。4℃で保存した結果では、3日以内であれば本試薬性能の15%以内の変化率に収まっており、やむをえず当日測定できなかつた場合は4℃冷蔵保存で対応が可能であると考えられる。その際、尿検体は4℃で保存すると尿酸塩が析出することがあるが、遠心後と37℃で加温溶解後に遠心し測定した値とを比較しても変化率は94.9~104.9%となり、加温や遠心による測定への影響は既報の結果⁴⁾と同様にほとんど無いと考えられた。

24時間蓄尿では防腐剤や尿中Cペプチド検査のための安定化剤が添加される場合があり、その影響度合いを調べるため蓄尿量を考慮し評価した。

ユリメジャー・タブレット添加試験の結果では、全ての濃度において24時間後の測定値は高値となり、蓄尿量は0.5 L相当であると測定値は2倍近くまで高値となった。ユリメジャー・タブレットは尿と混和後、pHは6.0~7.0であり、全ての対照とした、蒸留水の添加時のpH6.5~7.0と大きな差はなかった。

保存温度の検討で、24時間後に低下を示している300 mg/Lのプール尿は、対照が同様に低下を示したが、ユリメジャー・タブレットを使用したものは100mg/Lのプール尿と同様の上昇を示した。このことから、ユリメジャー・タブレットに含まれる防腐剤等の作用により細菌の繁殖を抑えたものと推測された。

同様に防腐剤を含む、酸性ユリメジャー・Tの添加試験の結果では、24時間後の0.5L相当においては0%付近まで低下した。一方、尿C-ペプチド安定化剤の添加試験では、4時間後までは30%程度高値となったが、24時間後には0.5L相当は20%程度低下した結果となった。

これらは尿に添加した際に、酸性ユリメジャー・Tは、pH4.5未満の強酸性を示すこと、また、尿C-ペプチド安定化剤は炭酸ナトリウムを主成分とするため、pH8.5~pH10.0以上の強アルカリ性を示すことによると考えられる。検討より、蓄尿量0.5L相当がいずれの蓄尿保存剤でも影響度合いが大きく、添加時の濃度によって結果が変化したことから、イオン強度の負荷や薬剤による尿の変性などにより尿中アルブミンの反応性が変化する¹⁰⁾と考えられた。

これらのことから、蓄尿保存剤を使用した検体、ならびに室温下で24時間蓄尿された検体でのアルブミンの測定は避けるべきであると考えられた。

5. 結語

「LZテスト'栄研'U-ALB」の基本性能は良好であった。800mg/Lまで無希釈で測定でき、血中濃度に相当する40,000mg/Lではプロゾーンとして検出できることから日常検査として有用であると考えられる。尿中アルブミンの測定は新鮮尿が望ましいが、やむを得ず保存するならば3日以内なら4℃で、長期保存する場合は-80℃が適していた。また蓄尿保存剤を使用した検体での尿中アルブミン測定は正確に測定できないため避けるべきであると考えられた。今回行った検体安定性の試験では、保存温度によっては上昇傾向を示すものがあり、導入時には検体保存や前処理の条件設定を十分に検討することが重要である。

本論文の要旨は日本臨床検査自動化学会第50回大会（2018年神戸）において発表した。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) 渡辺毅. 臓器障害・合併症評価の検査 特殊検査 アルブミン尿・タンパク尿. 日本臨床 2014;72 (Suppl 6):187-199
- 2) Jacoline W Brinkman, Dick de Zeeuw, Hiddo J Lambers Heerspink, et al. Apparent Loss of Urinary Albumin during Long-term Frozen Storage: HPLC vs Immunonephelometry. Clin. Chem. 2007;53(8):1520-1526
- 3) Mary Louise W MacNell, Patricia W Mueller, Samuel P Caudill, et al. Considerations when measuring urinary albumin: precision, substances that may interfere, and conditions for sample storage. Clin. Chem. 1991;12:2120-2123
- 4) 森下芳考, 松本祐之, 平井信弘ほか. 尿中化学成分

- 測定における尿検体取扱法の標準化に関する研究 第1報 前処理法および保存温度について. 医学検査 2009;58(5):381-389
- 5) 伊藤喜久, 細萱茂美, 岸浩司ほか. 尿中アルブミン免疫学的測定法の標準化. 臨床化学 2008;37(1):6-14
- 6) Denis Sviridov, Steven K Drake, Glen L Hortin. Reactivity of Urinary Albumin (Microalbumin) Assays with Fragmented or Modified Albumin. Clin. Chem. 2008;54(1):61-68
- 7) 栗原由利子. 尿中微量アルブミンの測定とその意義について. CHEMICAL TIMES 2009;213(3):8-11
- 8) 栗原由利子, 西牧淳一, 中島淑恵ほか. 糖尿病患者中アルブミンのフラグメント化と免疫反応性. 臨床病理 2009;57(2):124-130
- 9) 中山亜紀. 尿中アルブミン分子多様性の解析. 生物試料分析 2011;34(2):120-125
- 10) 村上麻里子, 浅田高至, 小澤かざみほか. 尿中Cペプチド検査における安定化剤含有濃度の影響. 医学検査 2015;64(5):576-582

日立自動分析装置LABOSPECT 008 α の基礎的検討

Evaluation of the LABOSPECT 008 α Hitachi Automatic Analyzer

林 智弘 山口萌子 西原温子 前田和樹 多田絵美 村上由美

要旨 日立自動分析装置LABOSPECT 008 α における搭載試薬の基礎的検討を行った。同時・日差再現性、希釈直線性、最低検出限界はいずれも良好な結果であった。共存物質の影響は、ビリルビンFにおいてD-BILで奇異な挙動を示す正の影響を認めた。従来使用していた装置・試薬との相関性試験は、ALBにおいてBCG法とBCP改良法で系統誤差を認めた。試薬間コンタミネーションでは、試薬添加法で影響を認めた項目間は、総当たり法によるクロスコンタミ試験では影響を認めなかった。

LABOSPECT 008 α に搭載した各試薬の基本性能は良好であり、日常検査に有用であると考えられた。

Key words automatic analyzer LABOSPECT 008 α , evaluation of reagent, reagent of clinical chemistry, calibration result

1. はじめに

臨床検査で用いる測定システム(測定試薬・装置)は、意図した用途に合致し、測定に関する要求事項を満たす信頼性の高い結果が得られることを保証されている必要がある¹⁾。その保証のためにも、各測定システムを製造するメーカーにはバリデーションが、使用するユーザーには、バリデーションが行われている測定法に対するベリフィケーションおよび性能の検証が要求される。特に、ユーザーによるベリフィケーションおよび性能の検証は、各試薬の構成、測定原理および特性の理解を深めることができ、より質の高い検査値の提供につながる。我々はすでに、大型生化学自動分析装置である日立自動分析装置LABOSPECT 008 α (日立ハイテクノロジーズ社)

を更新導入するにあたり、装置の基礎性能確認試験を評価し報告したが²⁾、今回、本装置において導入に至った生化学項目の測定試薬における基礎的検討も行ったので報告する。

2. 対象および方法

1) 測定対象

松下記念病院臨床検査科に検査依頼があった入院および外来患者の日常検査後の残余血清を用いた。なお本研究は、松下記念病院倫理委員会の承認を得ている(番号:19008)。

2) 検討試薬および装置

検討対象項目は、酵素8項目、脂質・含窒素他17項目である。検討対象試薬と比較対照試薬を表に示した(Table 1)。検討対象試薬の測定装置としてLABOSPECT 008 α (日立ハイテクノロジーズ社)を、比較対照試薬の測定装置として日立自動分析装置7700形(日立ハイテクノロジーズ社)を用いた。比較対照試薬・装置は、従来当院で使用していたものである。なお、各測定項目の分析パラメータはメーカー指定の条件とした。

3. 検討内容

1) 同時再現性

ブルー血清1濃度、QAPコントロール1Xおよび2X(シスメックス社)の2濃度の管理血清を各10回連続測定し、同時再現性を検討した。

Received Jun. 27, 2019; Accepted Jul. 17, 2019
Tomohiro HAYASHI, Moeko YAMAGUCHI, Atsuko NISHIHARA, Kazuki MAEDA, Emi TADA, Yumi MURAKAMI
パナソニック健康保険組合 松下記念病院 臨床検査科
〒570-8540 大阪府守口市外島町5-55
Department of Clinical Laboratory, Matsushita Memorial Hospital, Panasonic Health Insurance Organization
(5-55, Sotojimacho, Moriguchi-shi, Osaka, 570-8540, Japan)
Corresponding author: 林 智弘
TEL: 06-6992-1231 (内線 3224)
E-mail: hayashi.tomohiro@jp.panasonic.com

Table 1 Reagent and Measurement principle of test item in LABOSPECT 008 a and 7700.

LABOSPECT 008a			
Test item	Assay module and Reagent disk	Reagent	Measurement principle
Ca	Module2 and disk A	アクアオート カイノス Ca	アルセナゾⅢ法
CHO	Module1 and disk B	クオリジェント CHO	COD-POD法
LDL	Module1 and disk B	クオリジェント LDL	直接酵素法
HDL	Module1 and disk A	クオリジェント HDL	直接酵素法
TG	Module2 and disk B	クオリジェント TG	酵素比色法 (FG消去法)
GLU	Module2 and disk A	クオリジェント GLU	HK法
UN	Module1 and disk B	N-アッセイ BUN-L ニットーボー D-type	ICDH消去法
CRE	Module2 and disk B	イアトロLQ CRE(A)II	酵素法
Mg	Module2 and disk B	自動分析用試薬「生研」Mg-S	酵素法
UA	Module1 and disk B	デタミナーL UA	ウリカーゼPOD法
IP	Module1 and disk B	デタミナーL IP II	酵素法
T-BIL	Module1 and disk A	総ビリルビンE-HA テストワコー	バナジン酸酸化法
D-BIL	Module1 and disk A	直接ビリルビンE-HA テストワコー	バナジン酸酸化法
AST	Module2 and disk A	Lタイプワコー AST・J2	JSCC標準化対応法
ALT	Module2 and disk A	Lタイプワコー ALT・J2	JSCC標準化対応法
ALP	Module1 and disk A	Lタイプワコー ALP・J2	JSCC標準化対応法
AMY	Module2 and disk A	Lタイプワコー アミラーゼ	JSCC標準化対応法 (ベンジル-G5-pNP)
CK	Module1 and disk B	ラボフィット CK	JSCC標準化対応法
γ-GT	Module2 and disk B	ラボフィット γ-GT	JSCC標準化対応法
LD	Module2 and disk B	エクディアXL'栄研LDHⅡ・J	JSCC標準化対応法
CHE	Module2 and disk B	エクディアXL'栄研CHE	JSCC標準化対応法
TP	Module1 and disk A	アクアオート カイノス TP-II	ビウレット法
ALB	Module1 and disk A	アクアオート カイノス ALB	BCP改良法
Fe	Module2 and disk A	クイックオート ネオ Fe	Nitroso-PSAP法
UIBC	Module2 and disk A	クイックオート ネオ UIBC	Nitroso-PSAP法

7700		
Test item	Reagent	Measurement principle
Ca	アクアオート カイノス Ca	アルセナゾⅢ法
CHO	コレステスト CHO	COD-POD法
LDL	コレステスト LDL	直接酵素法
HDL	コレステスト N HDL	直接酵素法
TG	コレステスト TG	酵素比色法 (FG消去法)
GLU	シカリキッド GLU J	HK法
UN	N-アッセイ BUN-L ニットーボー D-type	ICDH消去法
CRE	Lタイプワコー CRE・M	酵素法
Mg	自動分析用試薬「生研」Mg-S	酵素法
UA	デタミナーL UA	ウリカーゼPOD法
IP	デタミナーL IP II	酵素法
T-BIL	総ビリルビンE-HR テストワコー	バナジン酸酸化法
D-BIL	直接ビリルビンE-HR テストワコー	バナジン酸酸化法
AST	Lタイプワコー AST・J2	JSCC標準化対応法
ALT	Lタイプワコー ALT・J2	JSCC標準化対応法
ALP	Lタイプワコー ALP・J2	JSCC標準化対応法
AMY	Lタイプワコー アミラーゼ	JSCC標準化対応法 (ベンジル-G5-pNP)
CK	シカリキッド CK	JSCC標準化対応法
γ-GT	シカリキッド γ-GT J	JSCC標準化対応法
LD	エクディアXL'栄研LDHⅡ・J	JSCC標準化対応法
CHE	エクディアXL'栄研CHE	JSCC標準化対応法
TP	クリニメイト TP	ビウレット法
ALB	クリニメイト ALB	BCG法
Fe	クイックオート ネオ Fe	Nitroso-PSAP法
UIBC	クイックオート ネオ UIBC	Nitroso-PSAP法

2) 日差再現性

同時再現性に用いた同様の試料を10日間、1日2回測定し日差再現性を検討した。キャリブレーションは、いずれの試薬も搭載初日のみを行い、2日目以降は生理食塩水でのブランクキャリブレーションのみとした。また、各ブランクキャリブレーション時のブランク吸光度の変化量と初期吸光度の変動も観察した³⁾⁴⁾。

3) 希釈直線性

各項目の高濃度試料を生理食塩水で10段階希釈後、各希釈試料を2重測定し、その平均値から希釈直線性を検討した。評価は、回帰式から求めた理論値±5%以内を指標とした。さらに、当院での2018年9月～2019年3月の半年間における各項目の測定値分布を調査した。

Table 2 Within-run precision.

1) The unit of the mean value of TP and ALB is g/dL, and Fe and UIBC is µg/dL.

		Ca	CHO	LDL	HDL	TG	GLU
Pooled serum	Mean (mg/dL)	9.83	209.5	93.7	64.2	87.9	106.8
	SD	0.040	0.75	0.31	0.18	0.32	0.42
	CV (%)	0.40	0.36	0.33	0.29	0.36	0.39
QAP trol 1X	Mean (mg/dL)	8.41	112.0	57.6	31.2	100.0	93.1
	SD	0.033	0.45	0.25	0.16	0.24	0.32
	CV (%)	0.39	0.40	0.44	0.51	0.24	0.34
QAP trol 2X	Mean (mg/dL)	11.20	257.4	127.6	75.0	246.0	239.2
	SD	0.034	0.84	0.40	0.25	0.97	1.14
	CV (%)	0.30	0.32	0.31	0.33	0.39	0.47

		UN	CRE	Mg	UA	IP	T-BIL	D-BIL
Pooled serum	Mean (mg/dL)	16.1	0.85	2.26	5.85	4.20	0.62	0.25
	SD	0.23	0.005	0.012	0.02	0.015	0.005	0.011
	CV (%)	1.41	0.60	0.51	0.35	0.36	0.86	4.38
QAP trol 1X	Mean (mg/dL)	16.5	0.988	2.25	5.21	3.56	0.86	0.45
	SD	0.19	0.004	0.006	0.02	0.011	0.007	0.005
	CV (%)	1.18	0.43	0.25	0.48	0.32	0.78	1.07
QAP trol 2X	Mean (mg/dL)	43.9	4.462	5.07	8.52	8.14	3.90	1.98
	SD	0.15	0.013	0.015	0.02	0.022	0.009	0.007
	CV (%)	0.35	0.30	0.30	0.25	0.27	0.24	0.36

		AST	ALT	ALP	AMY	CK	γ-GT	LD	CHE
Pooled serum	Mean (U/L)	16.8	9.5	208.4	84.4	97.2	33.8	126.3	346.8
	SD	0.25	0.50	0.54	0.22	0.40	0.35	0.56	0.75
	CV (%)	1.51	5.28	0.26	0.26	0.41	1.05	0.44	0.22
QAP trol 1X	Mean (U/L)	40.6	28.5	208.2	99.1	144.0	24.0	148.8	215.1
	SD	0.21	0.24	0.8	0.36	0.67	0.25	0.64	0.76
	CV (%)	0.53	0.83	0.41	0.36	0.46	1.03	0.43	0.36
QAP trol 2X	Mean (U/L)	108.6	95.9	424.0	251.8	329.2	86.7	367.4	335.1
	SD	0.41	0.46	1.33	0.69	0.91	0.35	1.08	1.03
	CV (%)	0.38	0.47	0.31	0.27	0.28	0.40	0.29	0.31

		TP	ALB	Fe	UIBC
Pooled serum	Mean ¹⁾	7.58	4.74	115.1	232.5
	SD	0.02	0.02	0.40	1.3
	CV (%)	0.24	0.37	0.35	0.55
QAP trol 1X	Mean ¹⁾	5.01	3.15	97.5	135.4
	SD	0.01	0.02	0.43	1.00
	CV (%)	0.27	0.50	0.44	0.74
QAP trol 2X	Mean ¹⁾	7.18	4.49	201.0	162.4
	SD	0.02	0.03	0.56	0.69
	CV (%)	0.28	0.60	0.28	0.42

4) 共存物質の影響

干渉チェックAプラス（シスメックス社）を用い、ビリルビンF、ビリルビンC、溶血ヘモグロビンおよび乳びの影響を調べた。なお、溶血ヘモグロビンに関しては、干渉チェックAプラスと自家調製溶血ヘモグロビンを用いた。それぞれブルー血清9容に対して、各共存物質試料を1容の割合で添加し、各5段階の希釈系列を

3重測定し影響を調べた。自家調製溶血ヘモグロビンは、他文献での報告を参照変更して作製した⁵⁾⁶⁾。調製法は、採血に同意を得た当検査科の健常者から採取した全血を、生理食塩水にて3回洗浄後、精製水に置換し溶血させ、さらに-80℃で15分凍結、流水溶解を1回実施後遠心にて上清の溶血液を分離した。上清溶血液のヘモグロビン濃度は、多項目自動血球分析装置 ユニセル

Table 3 Between-day precision.

1) The unit of the mean value of TP and ALB is g/dL, and Fe and UIBC is µg/dL.

		Ca	CHO	LDL	HDL	TG	GLU
Pooled serum	Mean (mg/dL)	9.77	210.4	103.6	65.1	89.1	106.2
	SD	0.063	0.93	1.45	0.87	0.52	0.49
	CV (%)	0.64	0.44	1.40	1.34	0.58	0.46
QAP trol 1X	Mean (mg/dL)	8.72	109.0	55.1	34.6	105.5	91.7
	SD	0.053	0.60	0.38	0.62	0.55	0.35
	CV (%)	0.61	0.55	0.68	1.80	0.52	0.38
QAP trol 2X	Mean (mg/dL)	11.42	255.4	109.8	103.0	241.2	235.3
	SD	0.050	0.67	1.23	1.53	1.59	1.04
	CV (%)	0.44	0.26	1.12	1.48	0.66	0.44

		UN	CRE	Mg	UA	IP	T-BIL	D-BIL
Pooled serum	Mean (mg/dL)	16.1	0.90	2.26	5.84	4.19	0.63	0.21
	SD	0.36	0.020	0.016	0.02	0.022	0.021	0.013
	CV (%)	2.25	2.22	0.70	0.41	0.53	3.27	6.41
QAP trol 1X	Mean (mg/dL)	15.7	0.99	2.07	5.20	3.58	1.04	0.54
	SD	0.40	0.016	0.016	0.02	0.014	0.015	0.011
	CV (%)	2.56	1.62	0.76	0.46	0.38	1.39	2.00
QAP trol 2X	Mean (mg/dL)	42.9	4.46	4.97	8.52	7.79	4.02	2.00
	SD	0.49	0.040	0.029	0.04	0.036	0.039	0.017
	CV (%)	1.14	0.90	0.59	0.48	0.47	0.96	0.85

		AST	ALT	ALP	AMY	CK	γ-GT	LD	CHE
Pooled serum	Mean (U/L)	17.6	11.0	210.5	83.4	106.7	33.9	129.8	344.9
	SD	0.70	0.55	1.89	0.68	1.77	0.43	1.14	1.69
	CV (%)	3.98	4.98	0.90	0.82	1.66	1.26	0.88	0.49
QAP trol 1X	Mean (U/L)	40.7	29.7	194.6	102.0	148.3	26.6	159.0	215.9
	SD	0.82	0.58	1.61	0.55	0.95	0.49	1.44	1.24
	CV (%)	2.01	1.95	0.83	0.53	0.64	1.84	0.91	0.57
QAP trol 2X	Mean (U/L)	108.4	97.7	439.2	254.5	318.2	89.4	374.5	332.5
	SD	0.80	0.91	2.32	1.17	1.54	0.64	2.54	1.47
	CV (%)	0.74	0.93	0.53	0.46	0.48	0.72	0.68	0.44

		TP	ALB	Fe	UIBC
Pooled serum	Mean ¹⁾	7.62	4.70	113.3	232.0
	SD	0.03	0.03	0.67	1.16
	CV (%)	0.38	0.68	0.59	0.50
QAP trol 1X	Mean ¹⁾	5.02	3.12	99.1	182.9
	SD	0.02	0.03	0.62	1.26
	CV (%)	0.39	0.81	0.63	0.69
QAP trol 2X	Mean ¹⁾	7.15	4.43	213.4	144.3
	SD	0.03	0.03	0.87	1.02
	CV (%)	0.35	0.66	0.41	0.71

DxH800 (ベックマン・コールター社)にて測定した。各測定値が共存物質未添加時の平均値±5%を超えた場合を影響ありとした⁷⁾。

5) 最低検出限界

各項目の低濃度血清試料を生理食塩水で10段階希釈後、各10回連続測定を行い、2.6SD法で最低検出限界を検討した。

6) 従来装置・試薬との相関性試験

患者血清100例を用いて、従来装置である日立自動分析装置7700形と従来試薬を比較対照として相関性を解析した。回帰式は標準主軸回帰で求めた。

7) 試薬間コンタミネーション確認試験

導入したLABOSPECT 008 aは2モジュール構成であり、1モジュールにつき試薬ディスクA、Bの2ユニット構成となっている。各依頼項目数の観点から、

Table 4 Calibration results of between-day precision.

1) The unit of the minimum value of TP and ALB is g/dL, and Fe and UIBC is $\mu\text{g/dL}$.

		Ca	CHO	LDL	HDL	TG	GLU		
Blank \angle OD	Mean (Abs $\times 10^4$)	1069.7	10.6	19.0	37.6	17.4	1.3		
	R (Abs $\times 10^4$)	15.0	11.0	6.0	46.0	6.0	1.0		
Blank initial Abs	Mean (Abs $\times 10^4$)	1564.5	24.5	81.4	78.4	43.8	1575.6		
	Difference in absorbance between the first day and the last day (Abs $\times 10^4$)	8.5	5.5	0.0	-93.0	-0.5	3.0		
Absorbance per minimum unit	Minimum unit (mg/dL)	0.01	0.1	0.1	0.1	0.1	1		
	Absorbance(Abs $\times 10^4$)	4.15	2.89	2.65	1.50	0.86	5.36		
		UN	CRE	Mg	UA	IP	T-BIL	D-BIL	
Blank \angle OD	Mean (Abs $\times 10^4$)	-10.1	28.5	9.60	4.9	225.1	91.8	-7.6	
	R (Abs $\times 10^4$)	8.0	4.0	3.0	3.0	12.0	4.0	5.0	
Blank initial Abs	Mean (Abs $\times 10^4$)	15561.2	57.0	699.5	2.4	1317.1	115.2	5.3	
	Difference in absorbance between the first day and the last day (Abs $\times 10^4$)	-47.0	3.0	-2.5	5.0	9.5	0.0	3.5	
Absorbance per minimum unit	Minimum unit (mg/dL)	0.1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
	Absorbance(Abs $\times 10^4$)	0.92	1.30	0.98	1.10	4.24	2.37	2.43	
		AST	ALT	ALP	AMY	CK	γ -GT	LD	CHE
Blank \angle OD	Mean (Abs $\times 10^4$)	1.7	-1.3	4.6	0.5	0.9	3.4	3.7	-2.4
	R (Abs $\times 10^4$)	3.0	3.0	2.0	1.0	2.0	2.0	1.0	5.0
Blank initial Abs	Mean (Abs $\times 10^4$)	12385.8	13801.8	4763.4	233.6	3644.6	4073.4	2274.1	12512.0
	Difference in absorbance between the first day and the last day (Abs $\times 10^4$)	-140.5	-50.5	15.0	9.0	40.0	140.5	-29.5	-229.5
Absorbance per minimum unit	Minimum unit (U/L)	1	1	1	1	1	1	1	1
	Absorbance(Abs $\times 10^4$)	1.85	1.93	1.89	1.90	1.46	1.81	1.12	1.63
		TP	ALB	Fe	UIBC				
Blank \angle OD	Mean (Abs $\times 10^4$)	-552.9	2360.8	-328.6	3282.3				
	R (Abs $\times 10^4$)	13.0	35.0	7.0	15.0				
Blank initial Abs	Mean (Abs $\times 10^4$)	1547.3	2370.9	8.5	4580.1				
	Difference in absorbance between the first day and the last day (Abs $\times 10^4$)	19.0	-24.5	0.5	13.0				
Absorbance per minimum unit	Minimum unit ¹⁾	0.01	0.01	1	1				
	Absorbance(Abs $\times 10^4$)	3.43	4.22	4.43	4.03				

Table 1に示すモジュール、試薬ディスクおよび各試薬の組み合わせの運用とした。この運用で、各試薬ディスク内において試薬間コンタミネーションが発生しないか検討した。まず、試薬添加法を参照改変して行った⁸⁾。プール血清270 μL に検討項目の第1試薬 (R1) 15 μL 、第2試薬 (R2) 15 μL 、R1のみであるCaは、プール血清270 μL にR1を30 μL 混合したものを各試料とし、各試薬ディスク内の試薬間で検討した。対照は、生理食塩水をプール血清に同比率で添加したものとした。項目移行時には、サンプルプローブおよび試薬プローブからのコンタミネーションの影響を避けるために、試料と試薬に生理食塩水を用いた測定を追加した。コンタミネーションの影響率は、対照に対して $\pm 30\%$ 以上の変動を認めた場合を影響ありとした。次に試薬添加法で影響を認

めた項目間を、総当たり法による試薬プローブのクロスコンタミ試験と反応セルのクロスコンタミ試験を行った。⁸⁾⁹⁾。プール血清を試料とし、影響を与えた項目の測定直後に影響を受けた項目を測定し、影響を受けた項目の測定値を対照と比較した。各3重測定し、対照は影響を受けた項目の単独測定値とした。評価は、対照に対して $\pm 2\%$ 以上の変動を認めた場合を影響ありとした。

4. 結果

1) 同時再現性

各項目における各試料の変動係数は、プール血清でCV:0.22~5.28%、QAPトロール1XでCV:0.24~1.18%、QAPトロール2XにおいてCV:0.24~0.60%であった (Table 2)。

Table 5 Dilution linearity and detection limit.

1) ratio of exceeded the upper limit of linearity : ratio of exceeded the upper limit of linearity for half a year

Test item	Unit of linearity and detection limit	Linearity	Ratio of exceeded the upper limit of linearity ¹⁾ (%)	Detection limit
Ca	mg/dL	15.0	0.003	0.14
CHO	mg/dL	757.8	0	1.98
LDL	mg/dL	632.7	0	0.94
HDL	mg/dL	314.7	0	0.61
TG	mg/dL	2230.7	0	1.14
GLU	mg/dL	1558.0	0	0.81
UN	mg/dL	208.2	0.003	0.86
CRE	mg/dL	170.4	0	0.04
Mg	mg/dL	16.3	0	0.10
UA	mg/dL	98.7	0	0.07
IP	mg/dL	87.9	0	0.06
T-BIL	mg/dL	48.0	0	0.03
D-BIL	mg/dL	25.4	0	0.02
AST	U/L	2524.8	0.017	2.96
ALT	U/L	2447.6	0.015	1.83
ALP	U/L	4762.0	0.010	1.62
AMY	U/L	5448.5	0.013	1.20
CK	U/L	6685.4	0.048	2.81
γ -GT	U/L	2278.2	0.003	1.43
LD	U/L	2309.1	0.106	2.62
CHE	U/L	1553.6	0	4.19
TP	g/dL	15.6	0	0.09
ALB	g/dL	13.1	0	0.10
Fe	μ g/dL	1088.5	0	1.90
UIBC	μ g/dL	916.1	0	1.74

2) 日差再現性

各項目における各試料の変動係数は、プール血清で CV:0.38~6.41%, QAP トロール 1X で CV:0.38~2.56%, QAP トロール 2X において CV:0.26~1.48% であった (Table 3)。各ブランクキャリブレーション時の吸光度変動の結果を Table 4 に示した。HDL ブランク吸光度と初期吸光度に大きな経時的変動が認められた (Fig. 1)。

3) 希釈直線性

各項目において、Table 5 に示した濃度までの原点を通る良好な直線性を確認した。

半年間の各項目の測定値の分布より、各項目の直線性上限を超えた率の結果は Table 5 に示した通りであった。

4) 共存物質の影響

ビリルビン C (0~21.3mg/dL) では、T-BIL、D-BIL

以外は影響を認めなかった。ビリルビン F (0~18.9mg/dL) では、T-BIL、D-BIL 以外は影響を認めなかった。D-BIL でのビリルビン F の影響は、ビリルビン F 濃度 3.78mg/dL では 0.69mg/dL の正の影響を認め、3.78mg/dL 以上の濃度で正の影響が 0.25mg/dL まで低下した後やや比例的に増加し、添加したビリルビン F の濃度に依存した影響ではなかった (Fig. 2)。溶血ヘモグロビンに関しては、干渉チェックを用いた溶血ヘモグロビン (0~500mg/dL) では、IP、T-BIL、AST、CK、 γ -GT、LD、CK で正の影響を認め、D-BIL で負の影響を認めた。一方、自家調製溶血ヘモグロビンでは、干渉チェックで影響を認めた項目に加えて、Mg、ALT、CHE、TP、UIBC で正の影響を認めた。乳び (0~1410 FTU) では、TG 以外は影響を認めなかった (Fig. 2)。

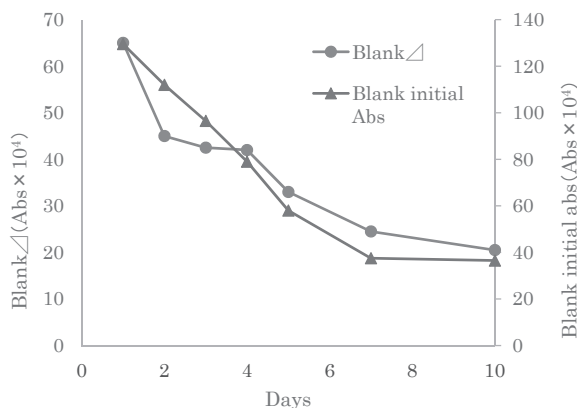


Fig. 1 Stability of blank absorbance in HDL.

5) 最低検出限界

各項目の最低検出限界はTable 5に示した通りで、各添付文書に示された測定下限と同等の結果を得た¹⁰⁾。

6) 従来装置・試薬との相関性試験

従来装置である日立自動分析装置7700形での従来試薬に対する回帰式、相関係数 (r) の結果をTable 6に示した。相関係数は、 $r = 0.918 \sim 0.999$ と良好であったが、回帰式では、ALBにおいて $y = 1.147x - 0.583$ と比例系統誤差および一定系統誤差を認め、低濃度領域ではBCG法である「クリニメイト ALB」(積水メディカル)がBCP改良法である「アクアオート カイノス ALB」(カイノス)と比べて高値に測定された。

7) 試薬間コンタミネーション確認試験

試薬添加法による結果では、Table 7に示した項目間で $\pm 30\%$ 以上変動し、影響を認めた。影響を認めた項目の総当たり法による試薬プローブおよび反応セルのクロスコンタミ試験結果では、いずれも $\pm 2\%$ 以内の変動であり影響を認めなかった。

5. 考察

同時再現性の結果は、検討した全項目において良好な結果を示したが、プール血清においてALTのみCVが5%を超えるCV: 5.28%であった。しかしこれは、日本臨床化学会クオリティマネジメント委員会が定めた許容誤差限界CVA: 11.1%以内であり¹¹⁾、低濃度域の精密性の性能として問題ないと考えられた。

日差再現性の結果は、同時再現性の結果と同様に、検討した全項目において良好な結果を示したが、プール血清においてD-BILのみCVが5%を超えるCV: 6.41%で

あった。これも同時再現性のプール血清におけるALT結果と同様に、許容誤差限界CVA: 14.8%以内であり¹²⁾、低濃度域の精密性の性能として問題ないと考えられた。

HDLにおける10日間のブランク吸光度の変化量のRangeは、 $46 \text{ Abs} \times 10^4$ の変動でHDL濃度に換算すると約 3.1 mg/dL に相当し、その程度は大きいと考えられた。さらに経時的変動を細かく観察すると、ブランク吸光度の変化量は、搭載7日目まで大きなトレンドの低下現象を認めた。日差再現性の最終日である10日目に、2ポイントキャリブレーションを実施し検量係数を調べた結果、検量係数は1日目に比して1%以内の変動であった。これらより、ブランクキャリブレーションのみで補正される試薬の性能変化であると考えられた。追加実験として、搭載1日目および10日目の試薬を用いて、R1とR2の単独の吸収スペクトルを測定した。さらに両試薬で試料を生理食塩水とし、分析パラメータに準じた反応後の吸収スペクトルを測定した。その結果、搭載1日目と比して10日目試薬では、R1単独以外で340~800nmのすべての波長域にかけて吸光度の減少が認められた。これらより、ブランク吸光度の経時的変動はR2の濁りが起因している可能性が高いと示唆された。

初期吸光度では、日差再現性の1日目と10日目との変動において、UN, AST, ALT, CHEで $47.0 \sim 229.5 \text{ Abs} \times 10^4$ の吸光度の低下を認めた。 γ -GTにおいては、 $140.5 \text{ Abs} \times 10^4$ の上昇を認めた。UN, AST, ALT, CHEの変動はNADHの自然失活が原因であり、 γ -GTの変動は基質分解によるANBの遊離が起因している¹²⁾¹³⁾。

当検査科の日常検査において、本検討で使用した生化

Test item	Bilirbin F (0~18.9 mg/dL)	Bilirbin C (0~21.3 mg/dL)	Hemoglobin (0~500 mg/dL)	Chyle (0~1410 FTU)	Hemoglobin (0~460 mg/dL)
Ca	○	○	○	○	○
CHO	○	○	○	○	○
LDL	○	○	○	○	○
HDL	○	○	○	○	○
TG	○	○	○	↑	○
GLU	○	○	○	○	○
UN	○	○	○	○	○
CRE	○	○	○	○	○
Mg	○	○	○	○	↑
UA	○	○	○	○	○
IP	○	○	↑	○	↑
T-BIL	↑	↑	↑	○	↑
D-BIL	↑	↑	↓	○	↓
AST	○	○	↑	○	↑
ALT	○	○	○	○	↑
ALP	○	○	○	○	○
AMY	○	○	○	○	○
CK	○	○	↑	○	↑
γ-GT	○	○	↑	○	↑
LD	○	○	↑	○	↑
CHE	○	○	○	○	↑
TP	○	○	○	○	↑
ALB	○	○	○	○	○
Fe	○	○	↑	○	↑
UIBC	○	○	○	○	↑

Fig. 2a Influence of interfering substances in total test items.

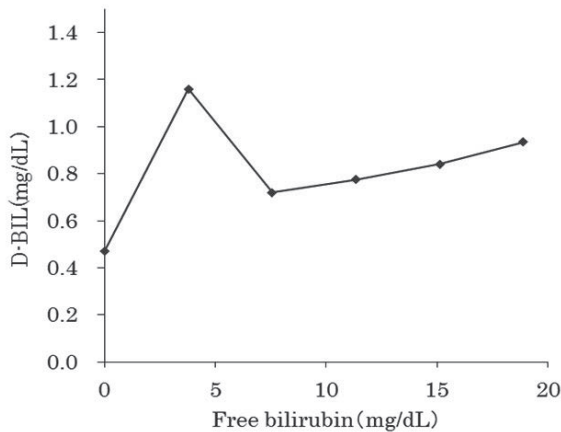


Fig. 2b Influence of free bilirubin in D-BIL.

Fig. 2 Influence of interfering substances.

学項目はいずれもLABOSPECT 008 a に試薬搭載後、最長5日以内には1ボトルを使い切れる。したがって、いずれの試薬も初回のみキャリブレーションを行えば、毎回のキャリブレーションは省略でき、ブランクキャリブレーションのみで十分安定した測定値が得られると考えられた。

希釈直線性の結果は、全検討項目で良好な結果を示した。当検査科での半年間における各項目の希釈直線性上

限を超えた割合からも、各項目の測定レンジは臨床に十分耐えられるものであった。

共存物質の影響では、ビリルビンFにおいてD-BILで奇異な挙動を示す正の影響を認めた。猪田ら¹⁴⁾は、血清と非抱合ビリルビンを混合すると、既知のD-BILとは性質の異なる何らかの物質 (Other D-BIL) が形成され、非抱合ビリルビンを血清で希釈したときに今回と同様の奇異な現象を認めたと報告している。また、生理

Table 6 Correlation between reagents of LABOSPECT 008 a and 7700.

Test item	Number of samples	Linear regression	Correlation coefficient
Ca	100	$y=0.982x-0.096$	0.918
CHO	100	$y=1.002x+0.640$	0.999
LDL	100	$y=0.995x-0.564$	0.999
HDL	100	$y=1.008x-0.879$	0.999
TG	100	$y=0.995x+0.361$	0.999
GLU	100	$y=0.996x-0.128$	0.999
UN	100	$y=1.012x-0.306$	0.999
CRE	100	$y=0.983x+0.035$	0.999
Mg	100	$y=0.995x+0.006$	0.992
UA	100	$y=1.012x+0.021$	0.991
IP	100	$y=1.023x+0.055$	0.998
T-BIL	100	$y=1.001x-0.012$	0.999
D-BIL	100	$y=0.987x-0.025$	0.999
AST	100	$y=1.015x+0.827$	0.999
ALT	100	$y=0.986x+0.666$	0.999
ALP	100	$y=1.015x-0.647$	0.999
AMY	100	$y=0.997x+0.447$	0.999
CK	100	$y=0.998x-0.178$	0.999
γ -GT	100	$y=1.020x-1.183$	0.999
LD	100	$y=1.006x+4.587$	0.999
CHE	100	$y=0.981x-1.517$	0.999
TP	100	$y=1.029x-0.050$	0.997
ALB	100	$y=1.147x-0.583$	0.994
Fe	100	$y=1.003x+0.156$	0.999
UIBC	100	$y=1.038x-3.317$	0.999

Table 7 Reagent contamination results.

Affect test	Influenced test	Influenced rate
TP	T-BIL	-32.1%
TP	ALP	-82.5%
TP	D-BIL	-61.9%
HDL	T-BIL	-47.2%
HDL	D-BIL	-66.7%
UN	CK	-33.3%
CHO	UA	+39.1%
AST	ALT	+61.2%
Fe	ALT	-47.9%
TG	Mg	+34.5%

食塩水で希釈するとその現象は軽微となり、さらに非抱合ビリルビンを血清または生理食塩水で希釈した検体の吸収ピークは異なるとも示されている。本検討も追加検討として、ビリルビンFを血清および生理食塩水に添加した検体で吸収スペクトルを測定したところ、報告と同様に、血清では460nmとわずかに430nm付近に吸収ピークを認めた。生理食塩水では440nmとわずかに480nm付近に吸収ピークを認め、血清と生理食塩水では異なる吸収ピークを認めた。また、生理食塩水9容に対してビリルビンFを1容の割合で添加し、5段階の希釈系列を測定した影響は、血清に添加した影響に比して軽微となった。これらより、猪田らの報告と同様、ビリルビンFにおいてD-BILで奇異な挙動を示したことは、血清とビリルビンFを混合することでOther D-BILが形成された影響であると考えられた。溶血の影響において正誤差の影響を認めた項目の大部分は、赤血球内成分の溶出によるものであり、赤血球/血漿の濃度比が大きい項目では顕著に溶血の影響を受けたと判断できる¹⁵⁾¹⁶⁾。特に遭遇する頻度が高いのは、*in vitro*でみられる溶血である。ビリルビンおよび乳びは、試薬や分析法の工夫により検査値への影響は小さくなっているが、溶血に関しては、血清中に赤血球成分が漏洩するため影響の回避は困難である。項目によっては大きな正誤差となるため、影響の程度によりコメントの付加や再採血を依頼する必要がある⁶⁾¹⁷⁾。

各項目の最低検出限界は臨床的に問題のない結果であり、日常検査に十分な性能であると思われた。

相関性試験の結果より、ALBにおいて比例系統誤差および一定系統誤差を認めた。特に低濃度領域においてBCG法が高値となったのは、BCG法はALBに対する特異性が低く、他の蛋白とも反応することによるものと考えられた¹⁸⁾¹⁹⁾。その他の項目の相関性試験結果は良好であることが確認できた。

試薬間コンタミネーション確認試験において、試薬添加法による結果では影響を認めた項目が存在したが、影響を認めた項目の総当たり法による試薬プローブおよび反応セルのクロスコンタミ試験結果では影響を認めなかった。また、装置の性能確認試験において、試料、試薬プローブのキャリーオーバー、反応セルのコンタミネーション試験の良好性は確認がとれていることから²⁾、測定系に関するコンタミネーションの影響に問題はないと思われた。装置構成からも、LABOSPECT 008 aでは、1モジュール当たり個別の2本の試料プローブと2本2組の試薬プローブからなるツイン構成ビベティングシステム、非接触方式の超音波攪拌機構が備えられ、各項目

の総反応液量も減っていることから、コンタミネーションの影響をより低減できていると考えられた。

6. 結語

日立自動分析装置LABOSPECT 008 aに搭載した各項目の試薬の性能は良好であり、日常検査に有用である。さらに、従来の大型自動分析装置と比較して試薬使用量の減少によるコストの削減にもつながっている。また、各項目の性能確認試験を行うことで、試薬の測定原理・特性の理解を深めることができ、精度管理および試薬等に起因する異常値に遭遇した際の対応にも役立っている。したがって、自施設の各測定項目の性能の検証を行うことは、検査値の精度保証を担保する上でも必要不可欠である。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会、定量測定法に関するバリデーション指針（プロジェクト報告）、臨床化学 2011;40:149-157.
- 2) 林智弘、西原温子、片山実穂ほか、日立自動分析装置LABOSPECT 008 aの性能確認試験と評価。医学検査 2018;67(5):687-693.
- 3) 風間武、武藤透、伊藤順子ほか、日立7070形自動分析装置による液状試薬の評価。日本臨床検査自動化学会誌 1995;20(1):81-87.
- 4) 一般社団法人日本臨床検査技師会、臨床検査精度保証教本、東広社;東京、2010;123-137.
- 5) 日本臨床検査自動化学会科学技術委員会、日常検査法の性能確認試験マニュアル。日本臨床検査自動化学会誌 2002;27(Suppl.1):7-56.
- 6) 藤本一満、QM研究会、血清情報統一の取り組み～溶血度判定基準の確立～、日本臨床検査自動化学会誌 2012;37(1):53-58
- 7) 長縄玲那、高橋祐輔、山田暁ほか、アルカリホスファターゼ測定用試薬「イアトロALP」の基本性能に関する検討。日本臨床検査自動化学会誌 2015;40(2):157-160.
- 8) 村本良三、神山清志、試薬の保管と運用の実際 3) 試薬間コンタミネーション。日本臨床検査自動化学会誌 2017;42(Suppl.1):118-128.
- 9) 佐野一、田中富枝、藤木俊一ほか、シングルマルチ測定機器の試薬間コンタミネーションとこれに対する対策の試み。日本臨床検査自動化学会誌 1997;22(3):231-235.
- 10) 高橋順也、新関紀康、黒瀬瞳ほか、免疫生化学ハイブリッド型自動分析装置cobas8000 <c702 | e602>の基礎的検討 2018;43(3):260-267.
- 11) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員

- 会. 生理的変動に基づいた臨床化学検査36項目における測定の許容誤差限界. 臨床化学 2006;35:144-153.
- 12) 日立自動分析研究会キャリブレーションWG. よく分かるキャリブレーションの読み方, 使い方. 日立自動分析研究会 2004.
- 13) 山本慶和. 4. 検査試薬の管理法. 日本臨床検査自動化学会誌 2013;38(Suppl.2):30-38.
- 14) 猪田猛久, 嶋田昌司, 松尾収二. 血清中における非抱合ビリルビンが直接型ビリルビン測定に及ぼす影響. 臨床化学 2018;47:256-262.
- 15) 一般社団法人日本臨床検査技師会. 臨床検査精度保証教本. 東広社;東京, 2010;187-194.
- 16) Martin H.Kroll, Ronald J.Elin. Interference with Clinical Laboratory Analyses. Clin Chem 1994;40:1996-2005.
- 17) 古川聡子, 河口勝憲, 加瀬野節子ほか. 溶血と混濁の生化学検査への影響-岡山県の近隣施設における血清情報の実態調査-. 医学検査 2014;63(5):648-654
- 18) 大野さやか, 清宮正徳, 吉田俊彦ほか. アルブミン測定におけるBCG法および改良型BCP法測定試薬の性能評価. 日本臨床検査自動化学会誌 2013;38(1):91-95.
- 19) Speicher CE, Widish JR, Gaudot FJ, Hepler BR. An evaluation of the overestimation of serum albumin by bromocresol green. Am J Clin Pathol 1978;69:347-350.

血液凝固自動分析装置CP3000を用いた ナノピアPAI-1試薬の基礎的検討

Fundamental Evaluation of “Nanopia PAI-1” Assay on CP3000

木場奈美恵¹⁾ 石井利明¹⁾ 西山裕伸¹⁾ 氏家真二¹⁾ 盛田俊介¹⁾²⁾

要旨 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) は特に感染症型DICの病型分類や病態評価を行う上で有用なマーカーとされるが、これまでのPAI-1測定試薬は専用装置を必要とするため汎用性は低かった。今回我々はトータルPAI-1測定試薬「ナノピアPAI-1」の汎用性を確認するため、血液凝固自動分析装置CP3000搭載時における基礎的検討を行った。その結果、CP3000において「ナノピアPAI-1」は日常検査に使用し得る良好な基本性能を有することが確認できた。他の血液凝固線溶項目と同時に迅速測定が可能となるため、DICの病態評価に広く使用されるものと考えられる。

Key words plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), Nanopia PAI-1, CP3000, DIC

1. はじめに

PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) は379アミノ酸からなる分子量約50,000の一本鎖のSERPIN (serine protease inhibitor superfamily) に属する糖蛋白であり、血管内において組織型プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator: tPA) を特異的に中和することによりプラスミノゲン活性化反応を調節し、プラスミンによるフィブリン分解反応をその開始段階で制御する線溶阻害因子として作用する¹⁾。

PAI-1は感染症、血栓性疾患、悪性腫瘍、代謝性疾患等の病態で増加を認めるが¹⁾、PAI-1の増加が最も顕著な病態は重症感染症に伴う播種性血管内凝固症候群 (DIC)、すなわち感染症型DICであることが報告され

ている²⁾。日本血栓止血学会DIC診断基準 2017年版ではDICは「造血障害型」、「感染症型」、「基本型」の3つに分類され、造血障害が存在せず、感染症がある場合に「感染症型」の診断基準を使用することが推奨されている³⁾。現在PAI-1はDIC診断のためのスコアリング項目には採用されていないが、DIC診断の後にDICの病型分類や病態評価を行う上で有用なマーカーとされ、特に感染症型DICでは予後不良因子として評価される^{2, 3)}。

PAI-1は血中で活性型PAI-1、潜在型PAI-1、およびtPA・PAI-1複合体で存在し、これらを総合したトータルPAI-1がPAI-1として測定されることが多い。従来のトータルPAI-1測定試薬では専用装置を必要とするため、当院検査部でも外部委託で運用しており、結果報告までに数日を要している。そのためPAI-1は迅速な病態把握を必要とする感染症型DICのマーカーとしての実用性を発揮できていないのが現状である。

そこで今回我々は専用の血液凝固分析装置を必要としないトータルPAI-1測定試薬である「ナノピアPAI-1」(積水メディカル(株))の汎用性を確認するため、血液凝固自動分析装置CP3000(積水メディカル(株))搭載時における基礎的検討を行ったので報告する。

2. 対象及び方法

1) 対象

凝固・線溶検査を目的に当院臨床検査部に提出された3.13%クエン酸ナトリウム加既存患者血漿 (n=70) を

Received Jun. 19, 2019; Accepted Jul. 1, 2019
Namie KIBA¹⁾, Toshiaki ISHII¹⁾, Hironobu Nishiyama¹⁾, Shinji UJIIE¹⁾, Toshisuke MORITA¹⁾²⁾

¹⁾東邦大学医療センター大森病院臨床検査部
Department of Clinical Laboratory, Toho University Omori Medical Center

²⁾東邦大学大学院医学研究科臨床検査医学
Department of Laboratory Medicine, Toho University Graduate School of Medicine

〒143-8541 東京都大田区大森西6-11-1
6-11-1, Omori-nishi, Otaku, Tokyo, 143-8541,
TEL : 03-5763-6556
E-mail : namie.kiba@med.toho-u.ac.jp

Table 1 Within-run precision.

	(n=20)		
	Control L	Control H	Pooled Serum
Mean (ng/mL)	48.0	95.7	59.7
SD (ng/mL)	1.91	3.39	3.25
CV (%)	3.98	3.54	5.44

Table 2 Between-day precision.

	(n=20)	
	Control L	Control H
Mean (ng/mL)	48.3	98.0
SD (ng/mL)	1.88	1.76
CV (%)	3.90	1.79

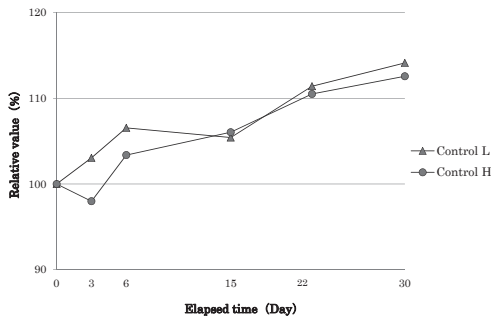


Fig. 1 On board reagent stability test.

-80℃で凍結保存し、測定前に凍結融解を行って測定を実施した。ただし、血小板数が $10 \times 10^3 / \mu\text{L}$ 以下となるように「凝固検査検体取り扱いに関するコンセンサス」⁴⁾に従って検体処理を行い、凍結融解は1回までとした。尚、本検討は東邦大学医療センター大森病院倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号M16271)。

2) 方法

(1) 試薬及び測定装置

測定試薬には「ナノピアPAI-1」を使用し、血液凝固自動分析装置CP3000(いずれも積水メディカル(株))で測定した。相関性試験の対照試薬は「LPIA・tPAIテスト」、測定装置は「STACIA」(いずれも(株)LSIメディエンス))とした。

(2) 検討内容

再現性、試薬安定性、希釈直線性、最小検出感度、地帯現象、共存物質の影響、対照法との相関について基礎的検討を行った。

3. 結果

(1) 再現性

同時再現性は2濃度(高濃度と低濃度)のPAI-1コン

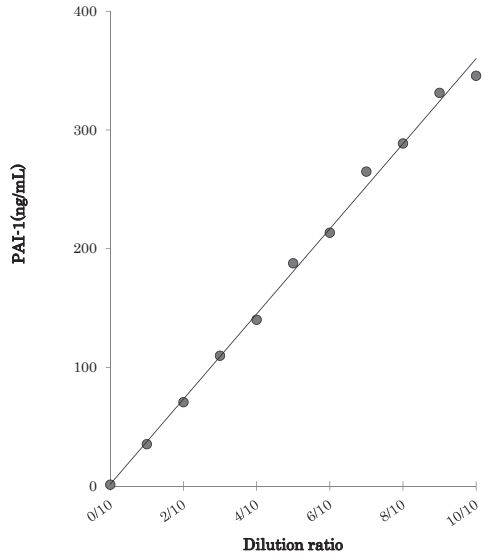


Fig. 2 Dilution Linearity.

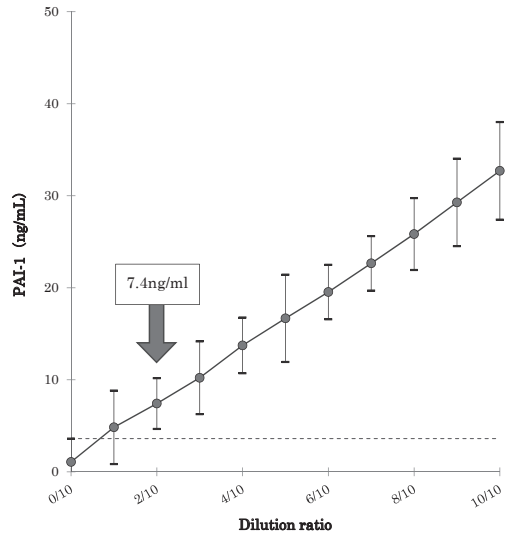


Fig. 3 Ditection limit.

トロール(積水メディカル(株))とプール血漿を各々連続20回測定し、変動係数(CV)を算出した。日差再現性は2濃度のPAI-1コントロールを1日2回10日間連続で測定し、変動係数(CV)を算出した。同時再現性の変動係数(CV)はそれぞれ3.98%, 3.54%, 5.44%(Table 1)、日差再現性の変動係数(CV)はそれぞれ3.90%, 1.79%(Table 2)であり、ともに良好な再現性

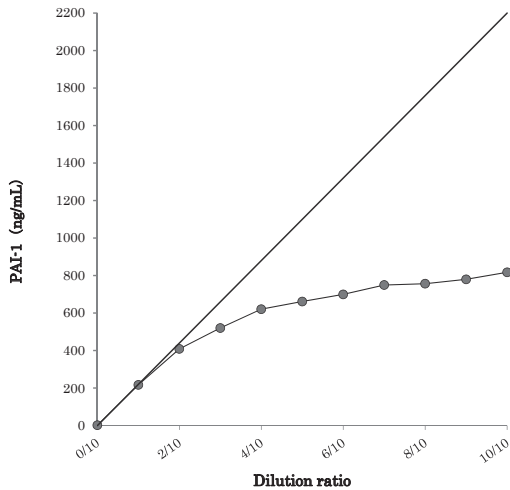


Fig. 4 zone phenomenon.

が得られた。

(2) 試薬安定性 (Fig. 1)

装置に試薬の蓋を開けた状態で架設し、測定ごとに試薬の転倒混和を行い、2濃度のPAI-1コントロールを1ヶ月間(6ポイント:初日, 3日目, 6日目, 15日目, 22日目, 30日目)測定して試薬安定性を確認した。測定に用いたコントロールは -80°C で凍結保存をし、測定日毎に凍結融解したものを用いた。試薬開封後15日までは10%以内の変動であったが、経過日数に伴いコントロールL, コントロールHともに測定値の漸増を認め、最大で114.1%となった。

(3) 希釈直線性 (Fig. 2)

高濃度試料(約360ng/mL)を生理食塩水で10段階希釈後、各々3回連続測定し、希釈直線性を検討したところ、約360ng/mLまで良好な直線性が確認された。

(4) 最小検出感度 (Fig. 3)

低濃度試料(約30ng/mL)を生理食塩水で10段階の希釈系列を作成し、各々10回連続測定した。ブランク値の $\pm 2.6\text{SD}$ 値と重ならない最小検出感度は7.4ng/mLであった。

(5) 地帯現象 (Fig. 4)

高濃度試料(約2200ng/mL)を生理食塩水で10段階希釈後、各々3回連続測定し、地帯現象の有無を確認した。測定値上限値の300ng/mLを超える2段階目(408.8ng/mL)から測定値の落ち込みはみられたが、フック現象は認めなかった。

(6) 共存物質の影響 (Fig. 5)

干渉チェック・Aプラスと干渉チェック・RFプラス(いずれもシスメックス(株))をプール血漿に添加し、ビリルビンF(20mg/dL)、ビリルビンC(20mg/dL)、溶血ヘモグロビン(500mg/dL)、乳び(2000FTU)、リウマトイド因子(500IU/mL)について測定値への影響を確認した。いずれにおいても測定値の変動は $\pm 5\%$ 以内の変動であり、今回検討した濃度までは共存物質の影響は認められなかった。

(7) 対照法との相関性 (Fig. 6)

患者検体70例について対照試薬「LPIA・tPAIテスト」との相関性について検討したところ、相関係数 $r=0.954$ 、回帰式 $y=0.92x+3.51$ であった。

4. 考察

血液凝固自動分析装置CP3000搭載時における、トータルPAI-1測定試薬「ナノピアPAI-1」の基礎的検討を行った。その結果、同時再現性のCVは最大5.44%、日差再現性はCV最大3.90%と良好な結果が得られた。試薬安定性の確認では試薬開封後15日目までは10%以内の変動であったが、経過日数に伴い測定値に緩やかな上昇がみられた。一方で、小林らは試薬安定性の検討において試薬架設後6日目に測定値が低下した⁵⁾と報告している。しかし、その後の検討で測定毎に転倒混和することで測定値の低下を認めなくなったと報告しており、測定値の低下の理由として日数経過に伴った試薬中のラテックスの沈降を挙げている⁵⁾。今回の検討では測定毎に転倒混和をしていたため測定値の低下を認めなかった可能性がある。測定値が上昇した一因として試薬開封後、時間経過に伴って試薬が濃縮することで反応が亢進した可能性も考えられ、試薬開封後長期間同じ試薬を使用する際には測定前に転倒混和を行い、精度管理にて特にトレンド現象に注意を要することが示唆された。希釈直線性では約360ng/mLまで良好な直線性が確認され、測定上限値の300ng/mLを満たす結果となり、最小検出感度、共存物質の影響の確認についても、良好な結果が得られた。地帯現象での検討では測定上限値を越える2段階目から測定値の落ち込みがみられたが、フック現象は認めなかったため、測定上限値以上の検体では希釈再検を行うことで偽低値を報告する可能性は少ないことが考えられる。対照法との相関性では相関係数は良好であったが、傾きが0.92と対照法よりやや低値を示した。PAI-1は血小板に多く存在し、血小板からの逸脱により測定値に影響を与えるとされているため⁶⁾、今回の検討では血小板数が $10 \times 10^3 / \mu\text{L}$ 以下となるように、「凝固検査検体取り扱いに関するコンセンサス」⁴⁾に従って検体処理を行

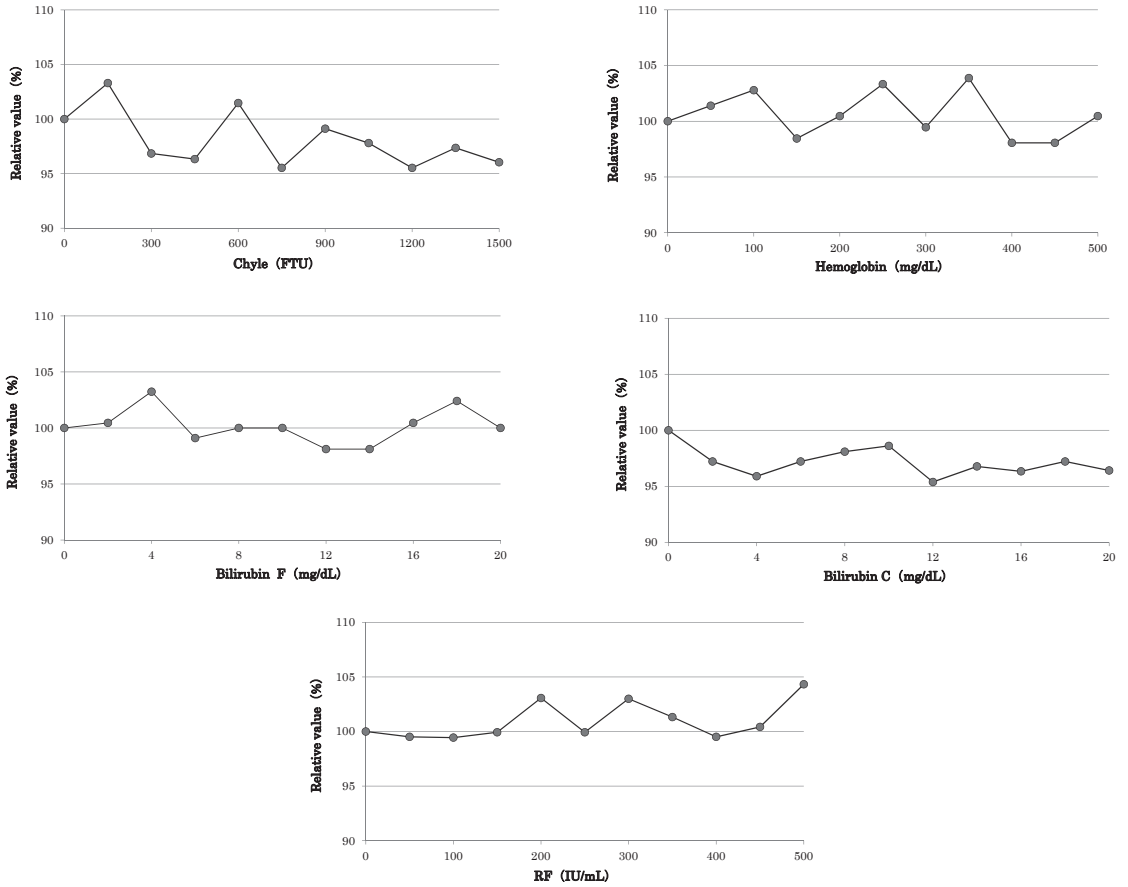


Fig. 5 Effects of interfering substances.

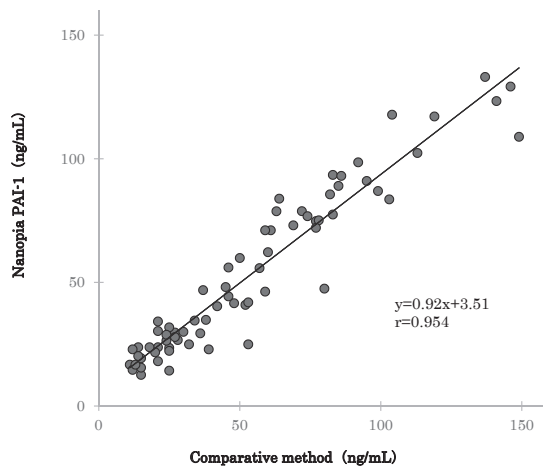


Fig. 6 Correlation between Nanopia PAI-1 and comparative method.

った。相関に使用した対照法の測定値は外部委託での結果を採用したが、一定時間経過後にまとめて凍結しているため、遠心分離後、検体によっては凍結までに時間を要した可能性が考えられる。残存血小板数に依存せず凍結融解後のPAI-1値が上昇したという報告もあり⁵⁾、検体が凍結されるまでの間に残存血小板が活性化したため、対照法での測定値がやや高値となった可能性が推察された。

2017年6月に日本血栓止血学会DIC診断基準作成委員会は、日本血栓止血学会DIC診断基準2017年版を発表した³⁾。PAI-1はDIC診断のためのスコアリングには採用されていないが、DIC診断後にDICの病型や病態評価を行う上での有用なマーカーとして列記されている。そこでは感染症型DICでの高値例は予後不良と明記されており、臨床側への迅速な結果報告が極めて重要である^{3, 7)}。本検討試薬であるトータルPAI-1測定試薬「ナノピアPAI-1」はラテックス免疫比濁法を測定原理としているため、汎用の血液凝固分析装置での測定が可能となり、簡便にトータルPAI-1の測定が行える。また、測定時間約5分(血液凝固自動分析装置CP3000搭載時)と、従来試薬の測定時間約15分から短縮しており、DダイマーやFDP等、他の凝固・線溶項目との同時測定も可能であるため、迅速な診断や病態把握のための一助になることが期待される。

5. 結語

CP3000においてトータルPAI-1測定試薬「ナノピアPAI-1」は日常検査に使用し得る良好な基本性能を有す

ることが確認できた。専用の血液凝固分析装置を必要とせず、他の血液凝固・線溶項目と同時に迅速測定が可能となるため、病態把握DICの病型分類や病態評価に貢献できるものと考えられる。

本論文の要旨は日本臨床検査自動化学会第49回大会(2017年横浜)において発表した。

本検討において開示すべき利益相反はありません。

文 献

- 1) 三室 淳. プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1). 日本臨牀 2004;62:703-707
- 2) Asakura H. Classifying types of disseminated intravascular coagulation. clinical and animal models. J Intensive Care 2014;2:20
- 3) DIC診断基準作成委員会. 日本血栓止血学会DIC診断基準2017年版. 日本血栓止血学会誌 2017;28:369-391
- 4) 日本検査血液学会標準化委員会凝固検査標準化ワーキンググループ. 凝固検査検体取扱いに関するコンセンサス. 日本検査血液学会誌 2016;17:149-168
- 5) 小林亮, 盛合亮介, 遠藤明美ほか. PAI-1測定試薬「ナノピアPAI-1」の基礎検討. 医学検査 2018;67:334-339
- 6) 八戸雅孝, 末石真千子, 三上容子ほか. 分析装置STACIAを用いた凝固分子マーカー検査における検体保存温度・方法の影響. 臨床病理 2012;60:1139-1144
- 7) 日本血栓止血学会学術標準化委員会DIC部会. 科学的根拠に基づいた感染症に伴うDIC治療のエキスパートコンセンサス. 血栓止血誌 2009;20:77-113

多発性骨髄腫治療薬「ダラツムマブ」の 蛋白分画検査への影響について

Impact of Daratumumab on Serum Protein Electrophoresis

東真理子, 武藤完, 八馬慶子, 西村美咲, 黒沢貴之, 矢島智志, 山崎悦子

要旨 ダラツムマブ (Dara) は多発性骨髄腫に用いるヒト IgG- κ 型モノクローナル抗体薬である。検証により Dara の泳動位置は slow- γ 位であることがわかった。Dara を投与されている多発性骨髄腫患者 (3 症例) の蛋白分画検査において、疾患由来ではない不明なピークを精査したところ、その泳動位置と M 蛋白成分より Dara であると推測した。

Key words Daratumumab, therapeutic monoclonal antibodies, serum protein electrophoresis

1. はじめに

ダラツムマブ (Dara) は多発性骨髄腫治療のために開発された CD38 に対するヒト IgG- κ 型モノクローナル抗体薬であり、再発又は難治性の多発性骨髄腫にも有効性が高く¹⁾²⁾、2017 年本邦でも保険承認された。多発性骨髄腫患者の治療効果判定として血清蛋白電気泳動法 (Serum protein electrophoresis, SPE) や免疫固定法 (immunofixation, IF) が用いられる³⁾。Dara は赤血球上の CD38 と結合して抗体スクリーニングや交差試験に干渉する他に、SPE 及び IF の結果に干渉する可能性がある⁴⁾。今回、Dara が SPE に与える影響を検討したので報告する。

2. 対象および方法

1) 対象症例

[症例 1] 70 歳, 女性。200X 年 MGUS と診断された。

Received Jul. 18, 2019; Accepted Sep. 30, 2019
Mariko HIGASHI, Kan MUTOU, Keiko YABA,
Misaki NISHIMURA, Takayuki KUROSAWA,
Satoshi YAJIMA, Etsuko YAMAZAKI
公立大学法人 横浜市立大学附属病院 臨床検査部
〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦 3-9
Clinical Laboratory Department, Yokohama City
University Hospital
3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004 Japan
Corresponding author: 東真理子
TEL: 045-787-2911 (直通)
E-mail: mari0817@yokohama-cu.ac.jp

200X+10 年多発性骨髄腫 (IgA- λ 型, ベンスジョーンズ蛋白 (BJP)- λ 型) へ進展した。自家末梢血幹細胞移植を施行するも再燃したため、200X+14 年 6 月当院紹介受診となった。当院で 2 つ目のレジメンとして、200X+15 年 2 月から Dara の投与を開始した。

[症例 2] 46 歳, 男性。200X 年に多発性骨髄腫 (BJP- κ 型) と診断された。自家末梢血幹細胞移植・同種移植後の再発で、200X+8 年 1 月から Dara の投与を開始した。

[症例 3] 67 歳, 女性。200X 年多発性骨髄腫 (IgG- λ 型) と診断された。自家末梢血幹細胞移植を 2 回施行したが再燃し、200X+8 年 1 月から Dara の投与を開始した。

2) 方法

キャピラリー電気泳動法 (Capillary electrophoresis, CE) を原理とする Minicap (Sebia) を使用し、Dara の泳動位置を検証した。健常者血清に Dara 静注薬 (100mg/5mL) を 1:1 で添加し、添加前と添加後の蛋白分画波形を比較した。また、希釈系列を作成し、Dara のピークが検出できなくなる濃度を確認した。さらに、Dara を投与されている多発性骨髄腫患者 (3 症例) の蛋白分画波形とも比較した。この 3 症例では疾患由来ではない不明なピークを認めたので、イムノタイピング法で解析した。イムノタイピング法とは、次のような検査法である。まず、対象血清と特異抗血清を混合して電気泳動を行う。特異抗血清と対応する蛋白成分は免疫複合体を形成し、アルブミン分画側に泳動される。このパ

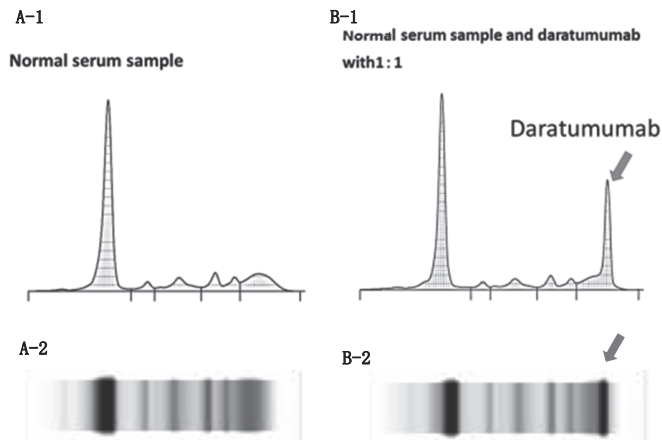


Fig. 1 Protein fractionation curves (A-1, B-1) and electrophoresis images (A-2, B-2) obtained by capillary electrophoresis are shown. Daratumumab added to normal human serum can be clearly identified in the protein fraction (B-1, B-2).

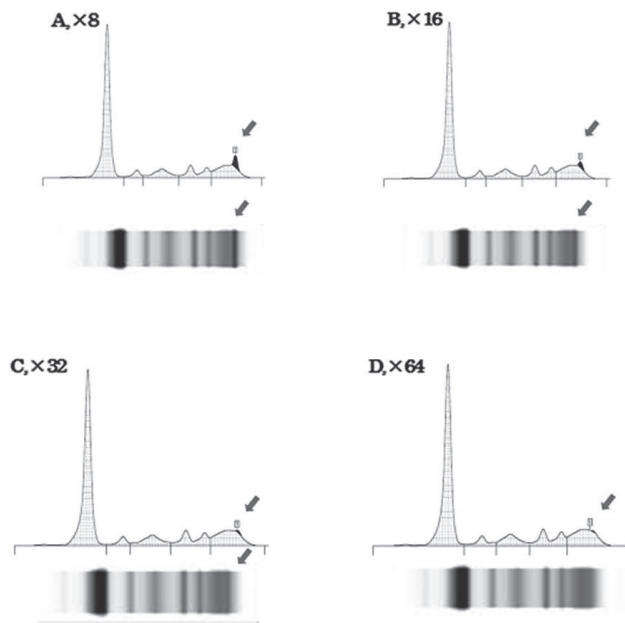


Fig. 2 Protein fractionation curves and electrophoresis images obtained by capillary electrophoresis when daratumumab and normal human serum are mixed at the ratios indicated. In the protein fraction, daratumumab was detected up to 32 fold dilution.

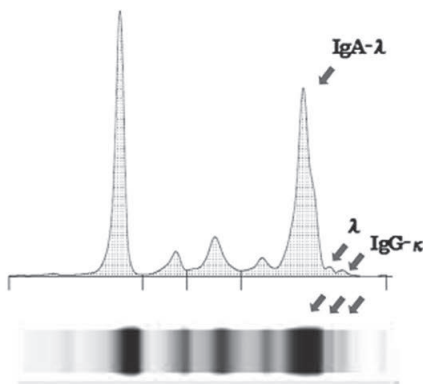


Fig. 3 Patient 1;detected M protein of IgA λ , λ , and IgG κ 9 days after the last medication of daratumumab.

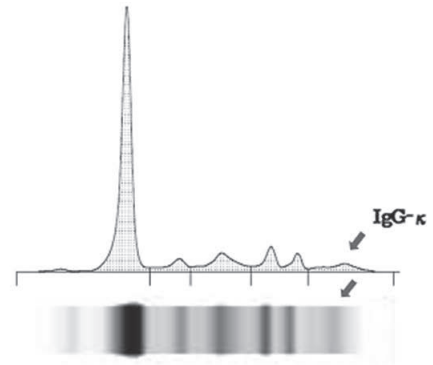


Fig. 4 Patient 2;detected M protein of IgG κ 28 days after the last medication of daratumumab.

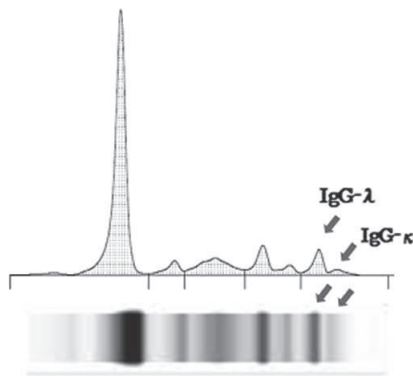


Fig. 5 Patient 3;detected M protein of IgG λ and IgG κ 15 days after the last medication of daratumumab.

ターンと対象血清のみ泳動したパターンを比較し、M蛋白と思われるピークがどの特異抗血清により消失するかを確認する。なお、当院の機器を使用したイムノタイピング法にはIgDとIgEの特異抗血清がないので、BJPとIgD・IgEの区別ができない。

3. 結果

健常者血清にDara静注薬を1:1で添加し、蛋白分画波形を添加前後で比較するとFig. 1のような波形が見られた。CEによる蛋白分画波形と電気泳動イメージ図をともに示す。CEの β 分画が二峰性を示しているが、これは通常のパターンである。添加後の波形でslow- γ 位にモノクローナルの明らかなピーク（Mピーク）が認

められ、Daraがこの位置に泳動されることが分かった。さらに、希釈系列を作成すると、対象となるMピークは1/64でほとんど認められなくなった。この時のDara濃度理論値は31.25mg/dlだった。波形から算出すると15.2mg/dlだった（Fig. 2）。

症例1は、200X+15年2月から4月までに計6回、Daraを投与した。4月のDara投与から6日後の患者検体でSPEを行ったところ、ごく少量ではあるが、不明なピークを確認した。その3日後（Dar投与9日後）の患者検体を用い、イムノタイピング法で詳細に解析した。 γ 位の大きいピークはIgA- λ だったが、小さいピークは λ （あるいはIgD- λ かIgE- λ ）とIgG- κ であることが分かった（Fig. 3）。

症例2では、200X+8年8月の患者検体でSPEを行った。この時は、Dara最終投与から28日後だった。 γ 位にごく少量のピークがあったため、症例1同様精査を行うと、IgGと κ で波形が消失した。どちらもきれいに消失しており、モノクローナルと推定した（Fig. 4）。

症例3では200X+8年4月にSPEを行った。Dara最終投与から15日後だった。 γ 位の二峰性のピークに対し、症例1同様精査を行うとIgG- λ とIgG- κ であった（Fig. 5）。

4. 考察

Daraは通常、成人には1回16mg/kgの投与量、1~4週の投与間隔で点滴静注され、蛋白分画波形に影響が出る程の血中濃度にはなりにくいと考えられている⁴⁾。

今回、Daraと健常者血清との希釈系列を作成すると、Daraのピークは1/64でほとんど認められなくなるこ

がわかった。この時のDaraの理論値は31.25mg/dl、波形から算出した値は15.2mg/dlであった。該当するピークが0.2%と微量で検出の限界であったと考えられる。実際には、CEでは1/16 (125mg/dl) 程度でMタンパクがあると判断され、1/32 (62.5mg/dl) 程度も存在を否定できない⁵⁾。この時の電気泳動イメージ図でもMタンパクを疑うラインが確認できる (Fig. 2)。

症例1では、IgA- λ ・ λ (あるいはIgD- λ かIgE- λ)・IgG- κ のM蛋白が検出された。本例はIgA- λ 型の多発性骨髄腫であり、200X+15年4月には、BJP- λ 型も検出されたので、IgA- λ と λ のピークは疾患由来と考えられる。IgG- κ のピークは泳動位置とM蛋白成分からDaraを検出したと推測した。

症例2ではIgG- κ のM蛋白が検出された。本例はBJP- κ 型であり、IgG波形は疾患由来ではない。また、泳動位置も考慮すると、症例1同様、Daraが検出されたと推測した。

症例3では、IgG- λ とIgG- κ のM蛋白が検出された。本例はIgG- λ 型の多発性骨髄腫であり、IgG- κ のピークはDaraを検出したと推測した。

今回の検討によりDaraはSPEで波形として確認される場合があるということが明らかになった。しかし、その泳動位置はslow- γ 位と予測することができるため、治療効果確認に大きな影響はないと思われる。

ただ、Daraと同じ位置にMピークがある症例は、消失の判断が難しく注意が必要である。また、新しいMタンパクが同じ位置に出現した場合も区別がつかないと考えられる⁵⁾。

今回検討した対象患者においては、Dara投与後にSPEと遊離軽鎖 (free light chain, FLC) 比、尿中BJP同定の検査依頼はあったが、IFの依頼はなかった。対象患者にDaraの蛋白成分と同じIgG- κ 型の多発性骨髄腫患者がいなかったこともあるが、通常診療ではSPEやFLC比で病態モニタリングをしていることが多く、SPEでMタンパクの消失が確認されたときはIFで最終確認をしている³⁾。2019年3月には、Daraの干渉を軽減するための免疫固定法 (グラツムマブ特異的免疫固定反射測定Daratumumab-Specific immunofixation Reflex Assay, DIRA)⁶⁾が保険適用となり、コマーシャルベースでの測定が可能となっている。対象はDara投与中のIgG- κ 型多発性骨髄腫患者に限られており、Daraと同

じ泳動位置でもMタンパク成分がIgG- κ でなければ、通常のIFで判断可能のためと思われる。しかし、本件のように通常診療ではIFはSPEより依頼頻度が少ない。Daraの投与終了後、長期にわたりDaraが検出されるとの報告もあるので、Dara投与中あるいは投与中断/中止患者のSPEで判断に迷うときはIFや必要に応じてDIRAを行うべきである⁵⁾。

5. 結語

モノクローナル抗体薬を用いる治療法は新しく、検査データの蓄積がほとんどない。多発性骨髄腫治療のモノクローナル抗体薬には、Daraの他にエロツズマブもある。エロツズマブもDaraと同様にSPEで波形として確認される可能性があり、検討が必要である。今後もこのようなモノクローナル抗体薬が開発されると考えられる。臨床側と連携を密にし、患者の薬剤情報も判断材料の一つとして確認する必要がある。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2016;375(14):1319-1331
- 2) Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2016;375(8):754-66
- 3) 日本骨髄腫学会編. 多発性骨髄腫の診断指針, 第4版, 文光堂; 東京, 2016; 37-41
- 4) グラザレックス点滴静注100mg/グラザレックス点滴静注400mg 添付文書 (第2版) 2017
- 5) Felicia Tang, Ehsan Malek, MD, Susan Math, et al. Interference of Therapeutic Monoclonal Antibodies With Routine Serum Protein Electrophoresis and Immunofixation in Patients With Myeloma. *Am J Clin Pathol* 2018;150:121-129
- 6) McCudden C, Axel AE, Slaets D, et al. Monitoring multiple myeloma patients treated with daratumumab: teasing out monoclonal antibody interference. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(6):1095-1104

尿検体における Verigene® システムを使用した菌種同定及び薬剤耐性遺伝子の検出感度の検討

Examination of the Detection Sensitivity of the Identification of Bacterial Species and Resistance Genes using the Verigene® System in Urine Samples.

須田いつみ¹⁾²⁾ 平本 卓¹⁾²⁾ 町田弘樹¹⁾ 岡崎瑠海¹⁾ 高橋美紀¹⁾
中嶋清美¹⁾ 町田哲男¹⁾ 四方田幸恵²⁾ 村上正巳¹⁾

1. はじめに

敗血症が疑われた場合、検体採取から血液培養陽性までに1~5日を要し、その後塗抹鏡検、分離培養、同定・薬剤感受性検査を経て、菌種及び薬剤感受性結果が報告される。質量分析は菌種同定に要する時間を短縮化したが、一般の病院に広く普及するに至っていない。また、薬剤感受性検査は従来法に従う必要があり、同定・薬剤感受性検査の迅速化が依然として課題となっている。

自動多項目同時遺伝子関連検査「Verigene® システム」の敗血症パネル(株式会社日立ハイテクノロジー)は、血液培養陽性となった検体をグラム染色結果に対応したパネルを用い、3時間以内に主要な細菌と薬剤耐性遺伝子を同時検出できるマルチプレックス遺伝子関連検査試薬である。従来法と比較すると結果報告までの時間を24~48時間短縮することができる¹⁾²⁾。敗血症では、速やかな初期対応が患者の予後に大きな影響を与えるために Verigene® システムが有用な手段と位置づけられている³⁾。

また、腎盂腎炎等の重症尿路感染症は敗血症を起こしやすく、迅速な診断と適切な抗菌薬の早期投与がきわめて重要である。尿路感染症の多くは腸管常在菌による上

行性尿路感染であるが、ESBL産生菌等の耐性菌の分離頻度も高くなっており、適切な抗菌薬の選択が課題となっている³⁾⁴⁾。

今回私たちは、グラム陰性桿菌をターゲットとして、Verigene® システムを用いて尿検体から菌種と薬剤耐性遺伝子を検出するための基礎的検討を行った。

2. 対象と方法

標準菌株 *E. coli* ATCC25922 (以下 *E. coli* 株) 及び自施設分離 *E. coli* ESBL 産生株 (以下 ESBL 産生株) を対象とした。ESBL 産生株は PCR 法にて *bla*_{CTX-M} を確認した。

無菌の正常尿を対象を加えたものを検討菌液とした。BD フェニックス™ スペック (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いて吸光度により菌液を調整し、Fig. 1 の通り想定菌濃度 $1 \times 10^9 \sim 10^2$ CFU/mL の 10 倍希釈系列を作成した。検討パネルとして Verigene® 血液培養グラム陰性菌・薬剤耐性核酸テスト (株式会社日立ハイテクノロジー) (以下 BC-GN) を使用した。

試薬添付文書⁶⁾に記載されている検出感度は、*E. coli* (IHMA 449261) : 3.7×10^6 CFU/mL, *bla*_{CTX-M} は *K. pneumoniae* (JMI 18518) : 1.2×10^7 CFU/mL, *K. oxytoca* (IHMA 683079) : 2.0×10^7 CFU/mL である。検

Received Apr. 22, 2019; Accepted Jun. 17, 2019
Itsumi SUDA¹⁾²⁾, Suguru HIRAMOTO¹⁾²⁾, Hiroki MACHIDA¹⁾, Rumi OKAZAKI¹⁾, Miki TAKAHASHI¹⁾, Kiyomi NAKAJIMA¹⁾, Tetsuo MACHIDA¹⁾, Sachie YOMODA²⁾, Masami MURKAMI¹⁾

¹⁾群馬大学医学部附属病院検査部
Clinical Laboratory Center, Gunma University,
Hospital

²⁾群馬大学大学院医学系研究科臨床検査医学
Department of Clinical Laboratory Medicine, Gunma
University Graduate School of Medicine
〒371-8511 群馬県前橋市昭和町3-39-15
3-39-15, Showa-machi, Maebashi, Gunma, 371-8511
Corresponding author: 村上正巳
TEL: 027-220-8561 FAX: 027-220-8574
E-mail: mmurakam@gunma-u.ac.jp

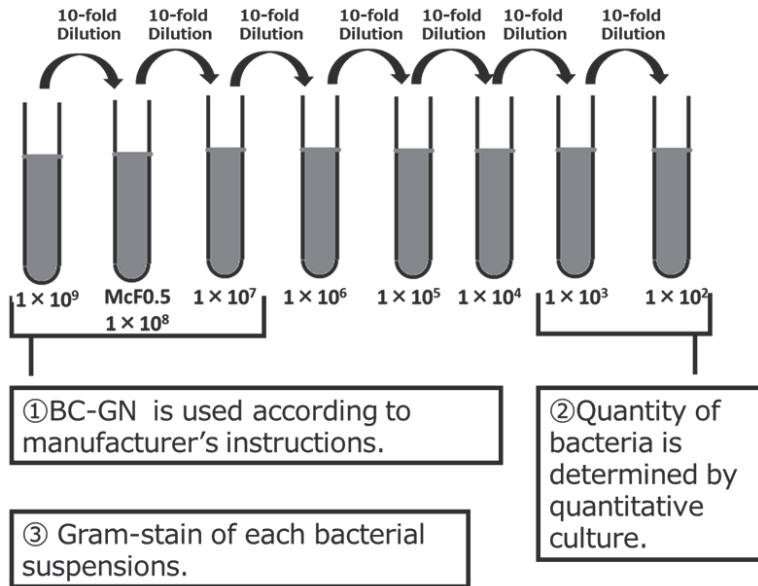


Fig. 1 Determination of detection sensitivity of VerigeCne

出感度の100倍濃度からBC-GNでの検出を試み、定量培養を行って検出感度を算定した。菌液の作成は*E. coli*では3回、ESBL産生株では2回行った。定量培養にはニッスイプレートドリガルスキー改良寒天培地（日本製薬株式会社）（以下BTB寒天培地）を使用し、35℃好気培養にて24時間培養後のコロニー数を目視算定して2回の平均より検出感度を求めた。また同時に、マイクロルーブ1号白金耳（10 μL）（Medical Wire & equipment Company）を用いて、スライドガラス白縁磨No.1 8枚入（松浪硝子工業）に菌液を塗布し、フェイパーG「ニッスイ」（日本製薬株式会社）にてグラム染色を行った。1000倍油浸レンズにて10視野程度を鏡検し、Table 1の判定表に従って検出感度に相当するグラム染色の結果判定を行った。

3. 結果

検討菌液での*E. coli*と薬剤耐性遺伝子 bla_{CTX-M} の検出結果をTable 2に示す。*E. coli*株について3回繰り返した結果の平均検出感度は 3.1×10^7 CFU/mLであった。グラム染色結果は4+であった。ESBL産生株については2回実施し、*E. coli*及び bla_{CTX-M} の検出感度は 8.4×10^7 CFU/mL、グラム染色結果は5+であった。1回目に作成した菌液は 5.8×10^7 CFU/mLで、 bla_{CTX-M} の検出感度より僅かに低かったため、*E. coli*のみが検出された。

Table 1 Interpretation of Gram-stain results

Notation	Number of bacteria
Negative	No bacteria seen
1+	<1/HPF*
2+	1~5/HPF
3+	6~30/HPF
4+	>30/HPF
5+	>100 /HPF

* high-power field (HPF) under oil immersion (magnification, ×1,000)

4. 考察

今回*E. coli*及び bla_{CTX-M} の検出について検討したが、菌種の検出感度は 3.1×10^7 CFU/mLで、約 10^7 CFU/mL（グラム染色4+：30以上/視野）、薬剤耐性遺伝子の検出感度は 8.4×10^7 CFU/mLで、約 10^8 CFU/mL（グラム染色5+：100以上/視野）の菌量が必要であった。薬剤耐性遺伝子について鈴木らは、血液を用いた検討で bla_{CTX-M} が 6.0×10^7 CFU/mLでは偽陰性を示す株があると述べており⁸⁾、今回の結果と類似している。

Table 2 Detection of *E. coli* ATCC25922 and clinically isolated bla_{CTX-M}-positive *E. coli*

		Adjusted bacterial suspensions (CFU/mL)	Verigene results		Gram Stain	Detection sensitivity (Quantitative culture CFU/mL)		
			Bacteria	Resistance genes		No.1	No.2	Mean
			<i>E. coli</i> ATCC25922	No.1	1×10 ⁸	<i>E. coli</i>	Not detected	4+
		1×10 ⁷	Not detected	Not detected	3+	/	/	/
	No.2	1×10 ⁸	<i>E. coli</i>	Not detected	4+	5.5×10 ⁶	5.5×10 ⁶	5.5×10 ⁶
		1×10 ⁷	<i>E. coli</i>	Not detected	3+			
		1×10 ⁶	Not detected	Not detected	2+	/	/	/
	No.3	1×10 ⁸	<i>E. coli</i>	Not detected	4+	5.8×10 ⁷	5.0×10 ⁷	5.4×10 ⁷
	Mean	/	<i>E. coli</i>	Not detected	4+	/	/	3.1×10 ⁷
Clinically isolated bla _{CTX-M} -positive <i>E. coli</i>	No.1	1×10 ⁸	<i>E. coli</i>	Not detected	4+	5.1×10 ⁷	6.5×10 ⁷	5.8×10 ⁷
	No.2	1×10 ⁹	<i>E. coli</i>	bla _{CTX-M}	5+	12.7×10 ⁷	4.0×10 ⁷	8.4×10 ⁷
		1×10 ⁸	<i>E. coli</i>	Not detected	4+	/	/	/

試薬添付文書⁶⁾と比較すると、尿検体では約10倍の菌量が必要であることが推察された。一般的に、尿路感染症の診断基準は10⁶CFU/mLであり⁷⁾、患者の尿検体から直接検出するのは不可能な場合もある。しかし、検出感度以下でも、遠心により尿を濃縮することで検出可能となると思われる。本検討ではVerigene®にて尿検体から菌種と薬剤耐性遺伝子が検出可能かを簡易的に判断するために、グラム染色標本での判定も同時に行った。結果からは塗抹検査で5+ (100以上/視野) あれば、検出可能であると考えられた。

血液培養では培養陽性検体に対しVerigene®を使用するため増菌時間が必要である。仲田らの検討では血液培養陽性までに5~50時間の培養が必要であったと報告している⁹⁾。現時点では保険適用外の利用であるが、

Verigene®を用いて尿検体から直接菌名及び薬剤耐性遺伝子を検出可能であれば、血液培養と併せてより迅速な重症感染症の診断と適切な治療に貢献できると思われた。

5. 結語

本検討により、Verigene®システムの尿検体への応用は、重症尿路感染症における迅速な菌種同定と適切な抗菌薬の早期投与に貢献できる検査法である可能性が示唆された。

COI開示：この研究は株式会社日立ハイテクノロジーズとの共同研究であり、群馬大学医学部附属病院倫理審査委員会の承認を得て行った。

文 献

- 1) Ken Kikuchi, Mari Matsuda, Shigekazu Iguchi, et al. Potential Impact of Rapid Blood Culture Testing for Gram-Positive Bacteremia in Japan with the Verigene® Gram-Positive Blood Culture Test. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2017;1:1-10.
- 2) 三嶋 廣繁. 新しい敗血症診断用検査薬を用いた遺伝子関連検査Verigene®の実施指針. *日本臨床微生物学雑誌*. 2017;3:1-10.
- 3) Naoki Uno, Hiromichi Suzuki, Hiromi Yamakawa, et al. Multicenter evaluation of the Verigene® Gram-negative blood culture nucleic acid test for rapid detection of bacteria and resistance determinants in positive blood cultures. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015;83:344-348.
- 4) 石原 哲, 出口 隆. 尿路性敗血症. *日本化学療法学会雑誌*. 003;51:7:435-438.
- 5) 山本新吾, 石川清仁, 速見浩士ら. JAID/JSC 感染症治療ガイドライン 2015 —尿路感染症・男性性器感染症—. *日本化学療法学会雑誌*. 2016;64:1-30.
- 6) Verigene®血液培養グラム陰性菌・薬剤耐性核酸テスト (BC-GN) 添付文書
- 7) 椎木創一. 尿路感染症. *日本プライマリ・ケア連合学会誌*. 2010;33:313-316.
- 8) 鈴木広道, 矢口勇治, 上田淳夫ら. 血流感染症に対する原因菌・薬剤耐性遺伝子迅速診断試薬 (Verigene BC-GP, Verigene BC-GN) の性能評価. *日本臨床微生物雑誌*. 2018;28:193-202.
- 9) 仲田佑未, 藤原弘光, 上灘伸子ら. 大学病院における血液培養陽性事例に関する検討. *日本環境感染学会誌*. 2016;31:107-112

一般社団法人日本臨床検査自動化学会
2019年度 第4回理事会議事録

開催日時：令和元年6月22日（日）14時30分～14時45分

開催場所：文京シビックセンター3F 和室

（東京都文京区春日1-16-21）

出席者：萱場広之理事、康東天理事、澤部祐二理事、久谷直人理事、
通山薫理事、萩原三千男理事、村上正巳理事、横田浩充理事、
内海健監事、白井秀明監事

欠席者：なし

議長は康理事が担当することとして議事に入った。

議題1. 理事長(代表理事)選出について

本日開催の定時社員総会にて承認された新理事のうち出席者8名（萱場広之理事、康東天理事、澤部祐二理事、久谷直人理事、通山薫理事、萩原三千男理事、村上正巳理事、横田浩充理事）にて互選を行い、萱場広之理事が理事長(代表理事)に選出された。

次回第5回理事会は令和元年8月25日（日）13時00分より学会事務所で行うことを確認した。

以上

2019年 9月12日

一般社団法人日本臨床検査自動化学会

代表理事

萱場広之



議事録署名人

白井秀明



議事録署名人

内海健



一般社団法人 日本臨床検査自動化学会
2019年(令和元年)度臨時社員総会議事録

開催日時：2019年10月4日(金)15時30分～15時55分

開催場所：パシフィコ横浜 第I会場

出席社員：評議員65名、はがきによる議決権行使68名

出席役員：萱場広之理事長、横田浩充副理事長、康 東天理事、
澤部祐司理事、久谷直人理事、通山薫理事、
萩原三千男理事、村上正巳理事、
内海健監事、白井秀明監事

冒頭、定款第28条に従って当社員総会の議長を担当する萱場広之理事長より、開会の挨拶があった。

開会に先立ち、萱場広之理事長より本会の出席者数が次のように報告された。評議員170名中、出席者数65名、葉書による議決権行使者68名を含めて全体として133名(78%)であり過半数を上回っており、定款第30条に照らして本臨時社員総会の成立が宣言された。

続いて、議事録署名人として古川泰司社員と池本敏行社員が選任され、審議に入った。

1. 議事

(1) 第1号議案(2020年度事業計画書)

横田浩充副理事長より、会場スクリーンに表示した事業計画案に基づいて事業計画の説明があった。4月の春季セミナーに合わせて行う理事会、各委員会について4月5日(日)の開催を4月4日(土)に修正することで指摘、確認があった。その後、拍手にて承認された。

(2) 第2号議案(2019年度予算書)

会計担当の澤部祐司理事により、会場スクリーンに表示した予算案に基づいて、前年度の予算を踏襲した上で実態に合わせて額面を調整した旨の説明があった。拍手にて承認された。

(3) 第3号議案(新規名誉会員選出)

萱場広之理事長より新規名誉会員として栢森裕三前監事が推挙され、拍手にて承認された。

(4) 第 4 号議案 (指名理事の選出)

萱場広之理事長より指名理事として高橋聡社員 (札幌医科大学)、日高洋社員 (大阪大学)、和田隆志社員 (金沢大学) が推挙され、拍手にて承認された。

2. 報告

(1) 第 1 号報告 (2021 年度 第 53 回大会長について)

萱場広之理事長より、2021 年度の大会長に長崎大学の柳原克紀先生が担当することとなった旨、報告があった。その後、柳原克紀先生から挨拶があった。

3. 2019 年度大会(第 51 回)大会長挨拶

東海大学の宮地勇人大会長より挨拶があった。

4. 2020 年度春季セミナー(第 34 回)例会長挨拶

琉球大学の前田士郎例会長より挨拶があった。

5. 2020 年度大会(第 52 回)大会長挨拶

東邦大学の横田浩充大会長より挨拶があった。

6. 閉会


萱場広之理事長より閉会が告げられた。

以 上

2019 年 12 月 8 日

一般社団法人 日本臨床検査自動化学会

議 長 萱場広之 

議事録署名人 古川泰司 

議事録署名人 池本敏行 

一般社団法人 日本臨床検査自動化学会

2019年度 第5回理事会議事録

開催日時： 2019年8月25日（日）13時00分～17時00分

開催場所： 日本臨床検査自動化学会事務所（文京区本郷）

出席者： 萱場広之理事長、横田浩充副理事長、康東天理事、
ゞ谷直人理事、通山薫理事、萩原三千男理事、村上正巳理事
白井秀明監事、

欠席者： 澤部祐司理事、内海健監事

議題1. 理事長挨拶

萱場理事長より、新理事長就任の挨拶と第4回理事会にご参集頂いたことへの謝辞があった。

1-1. 指名理事、担当地域、担当役務（資料1）

- ・役員については従前と大きく変更はないが、指名理事として日高先生と和田先生に継続していただき、もう一方は北海道・東北地区から高橋聡先生に要請した。役務担当として康先生にPOCT委員会をお願いした。高橋先生には編集委員会をお願いする予定である。

議題2. 報告事項

2-1. 総務職務報告（横田副理事長）

- ・今月の21日から23日まで熊本で日本臨床検査学教育学会学術大会が開催され、JACLaSの残松理事長と井上副理事長が来場され、機器試薬の展示コーナーにてJACLaS Awardを来年も募集したいとの案内をしていた。国際化を是非とも推進して欲しいとの声があった。

以上の報告があった。

2-2. 地域担当報告(各理事)

- 1) 北海道・東北地区：特になし
- 2) 関東地区：特になし
- 3) 東海地区：特になし
- 4) 北陸地区：特になし
- 5) 近畿地区：特になし
- 6) 中国・四国地区：次回に評議員候補を提案する予定

7) 九州地区：特になし

2-3. 第 51 回大会について（石川）

事務局より大会準備は順調に進捗し最終段階となっていることと、以下の報告があった。

- ・ JACLaS 交流会の第一部として、KiLa(キラ)というマジックショーを開催する。
- ・ JACLaS Award 2019 の講演会は、学生の参加は学生証の提示で無料にて参加可能、ノベルティとしてモバイルバッテリーを配布する。
- ・ 抄録集に、国際活動キックオフ／記念シンポジウムと JACLaS セミナー（対象：JACLaS 会員）を追記した。JACLaS セミナーは学会期間中の開催でオープン参加のため、参加者は専用のネームホルダーを着用する。

2-4. 第 52 回大会のテーマ(暫定)について（横田副理事長）（資料 2）

横田副理事長より資料に基づいて以下の説明があった。

- ・ 大会会期：2020 年 9 月 24 日(木)～26 日(土)
- ・ 学会名の改称に伴いメインテーマの副題を「日本医療検査科学会の幕開け」とした。
- ・ シンポジウム数が今年から 6 つに増えている。数の妥当性については今年の大会の状況を踏まえて判断する。

2-5. 第 33 回春季セミナー収支報告（石川）（資料 3）

事務局より資料に基づき以下の報告があった。

- ・ 大会長の高橋先生から収支報告が届いた。内容に問題はなく 177 名の参加があり盛会であった。

2-6. その他

- ・ 特になし。

議題 3. 審議事項

3-1. 2020 年度事業計画書（横田副理事長）（資料 4）

資料に基づいて説明があり、以下の内容も含めて事業計画内容を承認した。

- ・ 刊行物は、来年の第 45 巻からオンライン化となる。
- ・ 雑誌名は「医療検査と自動化」とし、名称の下に「一般社団法人 日本医療検査科学会誌」を入れる。

（コメント：本会議後、一般社団法人を抜いた「日本医療検査科学会誌」とすることで修正合意済み）

- ・抄録集は補刷として扱い、印刷物は抄録集とマニュアル冊子のみとする。
- ・事業計画等の資料の学会名称部分を改称に変更する。

3-2. 2020年度予算書（石川）（資料5）

澤部理事が急遽欠席のため、事務局より資料に基づいて説明があり、以下の内容も含めて承認した。

- ・収入の部で、名目上の赤字を削減したいため、会費収入の賛助会員費と事業収入の著作権使用料の予算案を増やした。
- ・支出の部では、会誌発送費がオンライン化となるため減額、大会会場費を削減し大会経費を増額した。
- ・管理費の旅費交通費を170万円としてあるが、消費税増税や2018年度の実績に合わせて増額(200万円)すべきとの意見があった。
- ・予算立て時点で赤字決済は望ましくなく収支0円とするのが望ましいため、前記の旅費交通費は170万円のままとし、租税公課を50万円減額して50万円、その他雑費を6万減額して94万円とする。
- ・3-1議題と同様に学会名称部分を改称に変更する。

3-3. 臨時社員総会について（横田副理事長）（資料6）

資料に基づいて以下の説明があった。

- (1) 開催案内確認
- (2) 式次第および資料の確認
- (3) 出欠はがき確認
- (4) その他

- ・出欠はがきの内容で、2つ目(下側)の波線を削除することで審議内容を承認した。

3-4. 会員総会配布資料について（横田副理事長）（資料7）

事務局から説明があり、以下の事項を修正することで承認した。

- ・タイトルを「会員総会」に訂正
- ・日時を「10月4日(金)16:00～17:00」に訂正
- ・第4号報告は、理事長から指名理事まで全ての役員の名前を記載

- ・3.委員会報告のタイトルを「学術委員会報告」に変更

⑧国際交流委員会、⑨編集委員会、⑩倫理・COI委員会の記載を削除

3-5. 第52回大会ポスターについて（横田副理事長）

- ・事務局から第52回大会ポスターの学会名称について説明があり、新学会名は改称名とし1～2年間は旧学会名称を併記することを承認した。

3-6. 新学会名称の商標登録について（石川）（資料8）

事務局から以下の説明があった。

- ・学会名称の商標登録について特許事務所から資料提示があり、特許事務所経由手続きで40万円程度の費用が必要。（ロゴの商標登録もすると+40万円・合計80万円ほどの支出となる）
- ・他学会も殆ど商標登録していない。

審議の結果、本日は結論が出せないため、本審議案は一旦保留とし他学会の事務局に登録状況について問い合わせした上で、次回以降に再審議することとした。

3-7. 新学会名のロゴ、デザインについて（石川）（資料9）

事務局から以下の説明があった。

- ・試作ロゴ6案の内、何れかのロゴで良ければデザイン料として12万円程度で作成が可能。

審議の結果、Plan3のバリエーション内の下段の案にすることとした。会員に対しては、学会名と学会ロゴが新しくなった旨のポスターを作成し大会時等に広報することとした。

3-8. 評議員推薦（横田副理事長）（資料10）

- ・資料に基づいて説明があり審議の結果、推薦を承認した。

3-9. 国際交流委員会内規について（康理事）（資料11）

康理事から資料に基づいて説明があった。

- ・前回の案に対して、内容を簡素化し本会の標記部分を本委員会にした。一部の誤記と体裁を修正することとし、9月1日付けで制定することを承認した。

3-10. POCセミナー趣意書（通山理事）（資料12）

- ・資料に基づいて説明があり、提案通り承認した。

3-11. 委員会委員異動申請（遺伝子プロテオミクス、微生物検査、医療情報） （通山理事）（資料 13-15）

資料に基づいて申請の説明があった。

- ・微生物検査・感染症委員会の委員交代は、申請に問題なく承認した。
- ・POC 技術委員は交代申請だが、前任者の退任申請が欠損しているため差し戻しとした。
- ・医療情報委員会は松下先生の新任申請があるが、松下先生が 2 つの委員会となるため、医療情報委員会はオブザーバーとすることで承認した。
- ・遺伝子プロテオミクス技術委員は、申請に問題なく承認した。

3-11. その他

- ・萱場理事長から、編集委員会の査読業務を 2 名体制とし内 1 名を編集委員とする旨の文言訂正を委員に諮った結果、40 名中 38 名から回答があり全て賛成であった。評議員の記載を社員(評議員)とすることで、内規変更を承認した旨を COI 委員会に通知することとした。
- ・事務局から、第 51 回大会から若い世代向けへの取り組みとして、ツイッターによる情報発信を試行したい旨の説明があった。発信内容に対して不満の書き込み等により炎上の懸念があるとの意見があったが、今年の大会で試行してみて、効果や問題点を評価することとした。
- ・2021 年の第 53 回大会(パシフィコ横浜)の大会長について、萱場理事長から長崎大学の柳原先生に了承が得られたとの報告があった。理事会として本件を承認し臨時社員総会・会員総会で報告することとした。
- ・第 53 回大会の会期は 10 月 8 日(金)・9 日(土)・10 日(日)だが、第 1 日目の午前から演題やシンポジウムを組入れて大会プログラムに余裕を持たせられるよう、委員会開催を前日の木曜の午後もしくは夕方にするか否かについては継続審議とすることとした。

議題 4. その他

4-1. 次回の開催日程

- ・標記について確認し、以下の通りとした。

(1) プログラム委員会

2019年10月3日(木) 10:30~11:00 511号室(昼食付)

(2) 第5回理事会

2019年10月3日(木) 11:00~12:30 511号室

(3) 臨時社員総会

2019年10月4日(金) 15:30~16:00 503号室

(4) 会員総会

2019年10月4日(金) 16:00~17:00 503号室

(5) 学術委員長会議

2019年10月4日(金) 14:00~15:00 511号室

4.2. 今後の理事会開催日程について

- ・第6回理事会 2019年12月8日(日) 13:00~
- ・第7回理事会 2020年2月9日(日) 13:00~

以上

2019年12月8日


一般社団法人 日本臨床検査自動化学会

理事長

菅嶋 宏之 

議事録署名人

(出席監事)

白井 秀明 

一般社団法人 日本臨床検査自動化学会
2019年度 第6回理事会 議事録

開催日時：2019年10月3日（木）11時00分～12時30分

開催場所：パシフィコ横浜 511+512号室

出席者：萱場広之理事長、澤部祐二理事、メ谷直人理事、通山薫理事、萩原三千男理事、村上正巳理事、横田浩充理事、白井秀明監事

欠席者：康東天理事、内海健監事

議 題

1. 理事長挨拶

・第51回大会長である宮地先生より、ご挨拶を頂いた。学会が昨年50周年を迎え「次の半世紀への第一歩」「がんゲノム医療の元年」「令和元年」「学会名称の変更」など今年が学会にとって大きな節目、日本が検査に関する技術・科学をリードしていくと象徴する第一歩の大会にしたいとの挨拶があった。

・萱場理事長より、ご参集頂いたことへの謝辞があった。学会の業務作業の多様化によりに学会事務局常勤職員の増員を考えており、澤部理事・萩原理事と相談の下労働条件の見直しを行った。

・また日本臨床標準協議会の理事会議案書を細萱先生から回覧の依頼があり回覧したとの報告があった。

2. 報告事項

2-1. 総務職務報告（横田理事）

先述した常勤職員増員にあたり、事務局事務職員諸手当を確認した。また、51回大会の準備を進めている旨の報告があった。

2-2. 地域担当報告（各理事）

- ・北海道・東北地区：地区が広いため新理事である高橋先生を地域担当に追加
- ・中国・四国地区：3名の評議員推薦があり、審議事項3-4にて審議
- ・上記以外の地区：特になし（康理事が欠席の為、九州地区の報告なし）

2-3. 臨時時社員総会について（横田理事）

(1) 出欠はがき返信数確認（資料1）

評議員 170名 返信 139名

出席 70名 欠席数 68名 無効票 1名 返信率 82%

(2) 議事録署名人の選出について

医師 1名・技師 1名を当日選出する旨の報告があった。

(3) 式次第および提出資料の最終確認（資料2）

次第および提示内容について問題ないことを確認した。

(4) その他

特になし

2-4. 会員総会について（資料3）（横田理事）

(1) 式次第および提出資料の最終確認

次第および提示内容について問題ないことを確認した。

(2) その他

特になし

2-5. 認定 POC コーディネーター制度運営規定と細則の中間報告（資料4）（石川）

担当である康理事が欠席の為、中間報告として資料4に基づき確認をした。議論は次回理事会にて行う事です承された。

2-6. 国際交流委員会より寄付金について（資料5）（萩原理事）

・9月15日までを一旦の応募期間として5社から寄付金を頂いた。額面に関して一部企業から大きい額面でも良いのではないかとのご意見も頂いたが、前年度の予算建ての際に本件をできていなかったため、現1口20万とした。目標としては500万円を見積もっていたが現状としては120万円の寄付を頂戴しており、10月5日の国際活動キックオフ記念シンポジウムにて活動方針にご賛同いただける企業があればご協力をお願いする準備を進めているとの報告があった。

・使用目的は、英文での委員会活動パンフレット・学会紹介資料の作成、アジア圏内の臨床検査関連のキーマンと交流をして情報交換する場を設ける為に使用するとの報告があった。

2-7. Twitter 開設報告（石川）

2019年9月よりTwitterを開設した。閲覧者は約1000人、フォロワーは21人である。現状は大きな問題もなく稼働しているため、今後も大会情報やセミナー案内等進めていく旨の報告があった。

2-8. その他

石川より、大会時の託児所の申し込み状況（3日3名、4日3名、5日4名）の報告があった。

3. 審議事項

3-1. 学会 HP リニューアルについて（資料6）（石川）

資料6に基づいてリニューアルにかかる費用と新HPのデザインや機能を紹介した。スマートフォン対応・英文対応すること検討しているとの報告があった。スマートフォンから使用する場合、スマートフォン専用の画面を作成するかは再度確認しメール審議にて判断することとした。

3-2. 委員会異動申請（血液検査機器、科学技術、生理検査）（通山理事）（資料7-9）

資料に基づいて説明があり、審議の結果申請通り承認された。

3-3. 2021年度大会（金～日開催）の開催期間について（横田副理事長）（資料10）

2021年度大会は金～日曜日での丸3日間での開催となり、設営の為木曜日の夜から会場を押さえ、ランチョンセミナーは3日間開催となることが決定した。

3-4. 評議員推薦（通山理事）（資料11-13）

資料に基づいて説明があり、審議の結果申請通り承認された。

3-5. 展示会出展企業への参加証配布に関して (石川)

現状の参加証配布方法で変更なしとした。

3-6. 転載許諾申請 (萱場理事長) (資料 14)

メール審議にて判断することとした。

3-7. その他

白井監事より、理事の職種が臨床検査技師 3 名・医師 8 名の為比率が悪いとの指摘があった。臨床検査技師から指名理事を 1 名追加することで承認された

4. その他

4-1. 次回開催日程

(1) 理事会

2019 年 12 月 8 日 (日) 13:00-17:00 学会事務所

上記の日程にて決定した。

以 上

2019 年 12 月 8 日

一般社団法人 日本臨床検査自動化学会

議 長 萱場 元之



議事録署名人 白井 彦明
(出席監事)



投稿規定

投稿規定が改定されました。
令和2年1月1日以降の投稿に適用します。

(令和元年10月5日改定)

1. 医療検査と自動化（日本医療検査学会誌）に投稿される論文は、臨床検査に関する新知見（自動化に限定せず機器・試薬の検討でも可）のあるもので、他誌に発表されていないものとする。すでにその内容の一部を学会などで発表したものは、その旨を論文末尾に記載する。
2. 投稿者（連名者も含む）は本学会の会員に限る。連名者は臨時会員（論文投稿用）でも可とする。
3. 投稿論文の種類は、原著、技術、症例、短報とする。
機器・試薬の検討は技術へ投稿されたい。原著は、技術の開発・改良、臨床的評価など一歩進めたオリジナリティーのあるもの、または、他の機器・試薬との比較検討を詳細に行い、臨床検査の進歩に寄与するものとする。症例は検査値が臨床的または技術的に興味ある報告とする。
4. 投稿にあたっては、本誌の原稿作成要領に従う。論文投稿に際しては、（一社）日本医療検査学会「医学研究の利益相反（COI）に関する指針に従って、筆頭著者およびCorresponding author（連絡責任者）は「医療検査と自動化 COI申告書」（様式2-Aまたは様式2-B）を提出しなければならない。また、指定の著者チェックリストを添付する。規定に沿わない場合は、返却あるいは訂正を求めることがある。
5. 投稿論文は、いずれも編集委員会の審査により論文の種類（原著、技術など）および採否を決定する。
6. 投稿論文の著作権は日本医療検査学会に帰属するものとする。
7. Corresponding author（連絡責任者）を表紙に明記する。Corresponding authorは論文の審査過程に関わる連絡担当者となるほか、当該論文の責任を負う。
8. 研究倫理に関して：ヒトを対象とした臨床検査に関する論文はヘルシンキ宣言に沿ったものであること。また、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省）を遵守すること。遺伝学的検査に関しては、「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）に従うこと。臨床検査を終了した検体を用いた研究に関しては、「臨床検査を終了した残余検体（既存試料）の業務、教育、研究のための使用について—日本臨床検査医学会の見解—」（2018年1月に公表。日本臨床検査医学会ホームページから閲覧可能）を参照のこと。動物実験については、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議）に従うこと。必要な際、当該研究が各施設内の倫理委員会等の承認のもとに行われたことを明記する。

原稿作成要領

1. 投稿原稿はA4判用紙にWordファイルで作成した1行40字×1ページ40行（1600字）の原稿をプリントアウトしたものを原則とする。書体は日本語は明朝体、英語はCentury体を本文の基本書体とし、図表はExcel、WordまたはPowerPointファイルで作成する。欧文と数字は1文字のときは全角、2文字以上は半角で入力する。数字と単位の間には半角スペースを入れて記述する。また、入力ソフト名・タイトル・著者名・所属機関名を明記した電子媒体（CDなど）を提出する。原稿の表紙には次の事項を記載する。
 - 1) 表題（和文および英文）
 - 2) 著者名（和文および英文）
 - 3) 所属機関名とその住所（和文および英文）
 - 4) 原著、技術、症例、短報いずれを希望かを明記（英文の例：Koki MOTEGI）
2. 原著原稿は次の順序に配列することが望ましい。
 - (1)表紙（1. 参照）
 - (2)本文（i 参照）
 - (3)表
 - (4)図（写真など）とその説明
 - i. 本文は、要旨（英文で200語以内）、キーワード（英文で5項目以内）。はじめに、材料および方法（測定機器、測定原理など）、成績、考察、結論、文献の順序に記載する。
 - ii. 文献は必要最低限にし、引用順に番号をつけ、本文最後に一括して記載する。本文中の引用箇所には肩付きで、右片括弧に入れて記載する。文献の記載法を別表1に示す。
3. 技術原稿もこれに準ずる、但し英文要旨に替えて和文要旨を要する。
4. 原著の規定頁数は原則として1編につき刷り上がり8頁以内、技術および症例は6頁以内とする（1頁分は1600字に相当する）。
図と表は、あわせて10枚以内とする（図表は1枚、400字に相当する）。
短報は刷り上がり2頁以内、図と表はあわせて3枚以内とする。

	英文要旨	和文要旨	本文原稿枚数 (1枚1600字)	図表	刷上り頁数
原著	200語	—	8枚以内	10枚以内	8頁以内
技術	—	250字	6枚以内	10枚以内	6頁以内
症例	—	250字	6枚以内	10枚以内	6頁以内
短報	—	—	2枚以内	3枚以内	2頁以内

上記の規定頁数を超過した場合はその分の実費を徴収する。

- 文章は、口語体、当用漢字、新かな遣いとし、横書き。句読点、括弧は1字分を要し、改行のさいは、冒頭1字分あける。外国人名は原語とし、地名は適宜とする。外来語で日本語化したものはカタカナで、ほかは外国語綴りのままとする。
- 図・表タイトルの内容、説明は英文で、別紙にまとめて記載する。原則として原図を送付すること。また、図・表・写真は1枚ごと別紙にして通し番号を入れ、本文原稿の欄外に挿入箇所を明示する。当方でトレースを必要とする場合、あるいはカラー印刷を希望する場合は、実費を徴収する。
- 度量衡の単位は漸次SI単位による表現を採用するが、差し当り別表2に示すようにする。
- HbA1cの表記については、日本糖尿病学会の指針に基づき、NGSP値を用い、HbA1c値の初出にNGSP値であることを明記する。
- 投稿原稿が英文の場合も和文の規定に準ずるが、この際には和文抄録(800字以内)も示す。
- 別刷は最低50部として実費を請求する。別刷の部数は編集委員会から著者校正時に問い合わせる。
- 投稿論文は、オリジナル原稿1部、電子媒体(CDなど)を下記に送付する。

〒113-0033 東京都文京区本郷2-31-2 (笠井ビル)

「医療検査と自動化」編集委員会宛

Tel. 03-3818-3205/Fax. 03-3818-6374 E-mail:t-gaku@gk9.so-net.ne.jp

別表1 引用文献

著者名は3名以内の場合は連記、4名以上は第4著者以降をほか(英文の場合はet al.)とする。英文は姓、名(イニシャル)の順とする。雑誌名は略記とする。

(雑誌)

著者名、論文タイトル、雑誌名、発行年(西暦):巻:頁-頁(通巻頁で最初と最後)。

例) 奈良信雄, 室橋郁夫, 松本文枝ほか. マイコプラズマ感染症の診断におけるDNAプローブ法の有用性に関する研究. 感染症誌 1991; 65: 1527-1532

Thue G, Gordon MK, Gerecke DR, et al. Survey of office laboratory tests in general practice. Scand J Prim Health Care 1994; 12: 77-83.

(単行本)

著者名、論文タイトル、編者名、書名、版、出版社名:発行地、発行年(西暦)頁-頁。

例) 三橋知明, 甲状腺ホルモン受容体異常, 中井利昭ほか編, 遺伝子診断実践ガイド, 第1版, 中外医学社:東京, 1995: 185-188.

Goldfin A Adrenal medulla. In: Greenspan FS, Baxter JD, eds, Basic & Clinical Endocrinology, 4th ed, Appleton & Lange: Conneticut, 1994: 370-389.

別表2 度量衡の単位

a) 接頭語には次のものを用いる。

10^{-18} = a (atto)	10^{-6} = μ (micro)	10^1 = da (deca)	10^9 = G (giga)
10^{-15} = f (femto)	10^{-3} = m (milli)	10^2 = h (hecto)	10^{12} = T (tera)
10^{-12} = p (pico)	10^{-2} = c (centi)	10^3 = k (kilo)	10^{15} = P (peta)
10^{-9} = n (nano)	10^{-1} = d (deci)	10^6 = M (mega)	10^{18} = E (exa)

b) 接頭語を二重に用いない。 $\mu\mu\text{g}$ ($\gamma\gamma$) \rightarrow pg

c) 長さに関する単位は $\text{m}\mu \rightarrow \text{nm}$, $\text{\AA} \rightarrow 0.1\text{nm}$ (あるいは 100pm), $\mu \rightarrow \mu\text{m}$ などとする。

d) 容量の単位は「L」を用い、 dm^3 , cc, cm^3 などを用いない。 $\text{dm}^3 \rightarrow \text{L}$, $\text{cc} \rightarrow \text{mL}$, $\text{mm}^3 \rightarrow \mu\text{L}$

e) 濃度に関する単位は、モル濃度は mol/L とし、慣用として mol/L をMとしてもよい。その他は mg/dL , g/dL , g/L などとするが、分母を「L」におきかえることが望ましい。 $7\text{g/dL} \rightarrow 70\text{g/L}$, $100\text{mg/dL} \rightarrow 1\text{g/L}$ ($1,000\text{mg/L}$) 原則として分母に接頭語をつけない。分子量の確定しているものは漸次モル濃度におきかえることが望ましい。

f) $\text{mol/min/L} \rightarrow \text{mol}/(\text{minL}^{-1})$, または $\text{mol min}^{-1}\text{L}^{-1}$ とする。

追記

標準化に関連した用語の定義や意味については「JCCLS 用語委員会: 臨床検査関係 ISO国際規格の用語とその邦訳語 (ver.1.1). 日本臨床検査標準協議会誌 18(1): 3-41, 2003」を参照する。なお、CLSI(IHNCCLS)のwebsite (<http://www.clsi.org>)でも検索できる。

「医療検査と自動化」論文投稿時の著者チェックリスト

1. 投稿者は（一社）日本医療検査科学会会員であるか
2. 同じ内容の論文を他誌に発表していないか
3. 研究倫理に関して投稿規定に沿っているか
4. 論文の内容が施設内倫理委員会の承認を必要とする際は、承認を得ている旨、明記しているか
5. 論文の体裁について
 - (a) 表紙に (1)表題、(2)著者名、(3)所属機関名とその所在地 (4)論文の種類（原著、技術、症例、短報）を明示しているか
 - (b) 原稿の字数は原稿作成要領に沿っているか
(原著：本文は A4判用紙（40字×40行=1600字）8枚以内、図表は10枚以内、技術・症例：本文は6枚以内、図表は10枚以内、短報：本文は2枚以内、図表は3枚以内)
 - (c) 論文の体裁（配列）は原稿作成要領に沿っているか
 - (d) 原著の場合、要旨は英文で記載されているか
 - (e) 図表のタイトル、説明文は英文で記載されているか
 - (f) 本文中に図表の挿入箇所を明示しているか
 - (g) 引用文献の記載方法は原稿作成要領に沿っているか
 - (h) 度量衡の単位は原稿作成要領に沿っているか
 - (i) 原稿にページ数を記載しているか
 - (j) Corresponding author（連絡責任者）および連絡先を記載しているか
6. 全著者は本論文投稿への関与を確認し、自署して下さい。

著者名	会員番号 または臨時会員

著者名	会員番号 または臨時会員

- 付記 1. 論文の内容は臨床検査に関する新知見のあるもので、他誌に未発表のものに限ります。
2. 掲載された論文の著作権は全て（一社）日本医療検査科学会に帰属します。
3. 論文の表紙に Corresponding author（連絡責任者）および連絡先を記載すること。
4. 会員または臨時会員の登録手続き中の場合は、その旨記載して下さい。

様式 2-A (論文投稿用)

医療検査と自動化 (日本医療検査科学会誌) COI 申告書
(筆頭著者・Corresponding author (連絡責任者) が企業に属さない場合)

著者名: _____

(共著者を含む)

論文題名: _____

(筆頭著者・Corresponding author (連絡責任者) について、投稿時から遡って過去 2 年以内での論文内容に関する企業・組織または団体との COI 状態を記載)

項目	該当の状況	有であれば著者名：企業名などの記載
① 本人あるいは配偶者、一親等の親族の営利を目的とする企業・法人組織・団体の社員、役員、顧問職への就任 1つの企業・組織や団体からの報酬額が年間100万円を超えた場合.	有 ・ 無	
② 株式の利益 1つの企業から年間100万円を超えた場合、あるいは当該株式の5%以上保有	有 ・ 無	
③ 特許使用料 1つにつき年間100万円を超えた場合	有 ・ 無	
④ 講演料 1つの企業・団体からの年間合計100万円を超えた場合	有 ・ 無	
⑤ 原稿料 1つの企業・団体から年間合計100万円を超えた場合	有 ・ 無	
⑥ 研究費・助成金などの総額 1つの企業・団体からの研究経費を共有する所属部局 (講座、分野あるいは研究室など) に支払われた年間総額が100万円を超えた場合	有 ・ 無	
⑦ 奨学 (奨励) 寄付金などの総額 1つの企業・団体からの奨学寄付金を共有する所属部局 (講座、分野あるいは研究室など) に支払われた年間総額が100万円を超えた場合	有 ・ 無	
⑧ 企業などが提供する寄付講座 (企業などからの寄付講座に所属している場合に記載)	有 ・ 無	
⑨ 旅費、贈答品などの受領 1つの企業・団体から年間5万円を超えた場合	有 ・ 無	

(本 COI 申告書は論文掲載後 2 年間保管されます)

(申告日) 年 月 日

筆頭著者・Corresponding author (連絡責任者) (署名) _____ (印)

(何れかに○)

* 筆頭著者、Corresponding author (連絡責任者) は各々記載すること

様式 2-B (論文投稿用)

医療検査と自動化 (日本医療検査科学会誌) COI 申告書
(筆頭著者・Corresponding author (連絡責任者) が企業に属する場合)

著者名 : _____

(共著者を含む)

論文題名 : _____

私は (〇〇株式会社) の社員であり、本研究に関わる費用等は所属企業の経費等にて支払われています。
(上記を参考に記載)

(申告日) 年 月 日 (本 COI 申告書は論文掲載後 2 年間保管されます)
筆頭著者・Corresponding author (連絡責任者) (署名) _____ ④
(何れかに○)

*筆頭著者、Corresponding author (連絡責任者) は各々記載すること

賛助会員

(令和元年12月31日現在)

会社名	郵便番号	住所
アークレイマーケティング(株)	160-0004	東京都新宿区四谷1-20-20 大雅ビル 3F
アイ・エル・ジャパン(株)	108-0073	東京都港区三田1-3-30 三田神田ビル
(株)アイディエス	150-0011	東京都渋谷区東2-22-14 ロゼ氷川 4F
アポットジャパン(同)	108-6305	東京都港区三田3-5-27 住友不動産三田ツインビル西館
アルフレッサファーマ(株)	540-8575	大阪府大阪市中央区石町2-2-9
(株)エイアンドティー	221-0056	神奈川県横浜市神奈川区金港町2-6 横浜プラザビル
栄研化学(株)	110-8408	東京都台東区台東4-19-9 山口ビル7
(株)エクセル・クリエイツ	542-0081	大阪府大阪市中央区南船場1-16-13 堺筋ベストビル 5F
(株)LSIメディエンス	101-8571	東京都千代田区内神田1-13-4 THE KAITEKIビル
オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス(株)	141-0032	東京都品川区大崎1-11-2 ゲートシティ大崎イーストタワー
(株)カイノス	113-0033	東京都文京区本郷2-38-18
関東化学(株)	103-0022	東京都中央区日本橋室町2-2-1
キャンメディカルシステムズ(株)検体検査システム営業部	212-0015	神奈川県川崎市幸区柳町70-1
極東製薬工業(株)	103-0024	東京都中央区日本橋小舟町7-8
合同酒精(株)酵素医薬品研究所	271-0064	千葉県松戸市上本郷字仲原250
シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス(株)	141-8673	東京都品川区大崎1-11-1ゲートシティ大崎ウェストタワー
シスメックス(株)	651-2241	兵庫県神戸市西区室谷1-3-2
(株)シノテスト	101-8410	東京都千代田区神田駿河台3-7-9
(株)CGI	106-0041	東京都港区麻布台1-7-3 神谷町スクエアビル 8F
積水メディカル(株)	103-0027	東京都中央区日本橋2-1-3
セラビシオン・ジャパン(株)	220-0004	神奈川県横浜市西区北幸1-11-5 相鉄KSビル 9F
(株)テクノメディカ	224-0041	神奈川県横浜市都筑区仲町台5-5-1
テルモ(株)	163-1450	東京都新宿区西新宿3-20-2 東京オペラシティタワー 49F
デンカ生研(株)	103-8338	東京都中央区日本橋室町2-1-1
東京貿易メディシス(株)	191-0052	東京都日野市東豊田1-14-21
東ソー(株)	105-8623	東京都港区芝3-8-2
東洋鋼鈑(株)技術研究所	744-8611	山口県下松市東豊井1296
日水製薬(株)	110-8736	東京都台東区上野3-24-6 上野フロンティアタワー 20F
ニッポボーメディカル(株)	102-0083	東京都千代田区麴町2-4-1 麴町大通りビル
ニプロ(株)	531-8510	大阪府大阪市北区本庄西3-9-3
日本光電工業(株)	161-8560	東京都新宿区西落合1-31-4
日本電子(株)	100-0004	東京都千代田区大手町2-1-1 大手町野村ビル 13F
ノバ・バイオメディカル(株)	108-0073	東京都港区三田3-13-16 43 MTビル7F
バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)	140-0002	東京都品川区東品川2-2-24 天王州セントラルタワー
ピオメリュー・ジャパン(株)	107-0052	東京都港区赤坂2-17-7 赤坂溜池タワー 2F
日立化成ダイアグノスティックス・システムズ(株)	104-6004	東京都中央区晴海1-8-10
(株)日立製作所	110-0015	東京都台東区東上野2-16-1 上野イーストタワー 8F
(株)日立ハイテクノロジーズ	105-8717	東京都港区西新橋1-24-14
富士フイルムメディカル(株)	106-0031	東京都港区西麻布2-26-30 富士フイルム西麻布ビル
富士フイルム和光純薬(株)	103-0023	東京都中央区日本橋本町2-4-1 日本橋本町東急ビル 6F
富士フイルム和光純薬(株)三重工場	510-1222	三重県三重郡菰野町大強原2613-2
富士レビオ(株)	163-0410	東京都新宿区西新宿2-1-1 新宿三井ビル
古野電気(株)	662-0934	兵庫県西宮市西宮浜2-20
平和物産(株)	550-0012	大阪府大阪市西区立売堀1-3-13
ベックマン・コールター(株)	135-0063	東京都江東区有明3-5-7 TOC 有明ウエストタワー 13F
(株)ベリタス	105-0013	東京都港区浜松町1-10-14 住友東新橋ビル3号館 5F
(株)ヘレナ研究所	330-0061	埼玉県さいたま市浦和区常盤9-21-19
(株)堀場製作所	601-8510	京都府京都市南区吉祥院宮の東町2
(株)ミズホメディー	841-0048	佐賀県鳥栖市藤木町5-4
メルク(株)メルクミリポア事業本部	153-8927	東京都目黒区下目黒1-8-1 アルコタワー 5F
ラジオメーター(株)	140-0001	東京都品川区北品川4-7-35
ロシュ・ダイアグノスティックス(株)	105-0075	東京都港区港南1-2-70 品川シーズンテラス

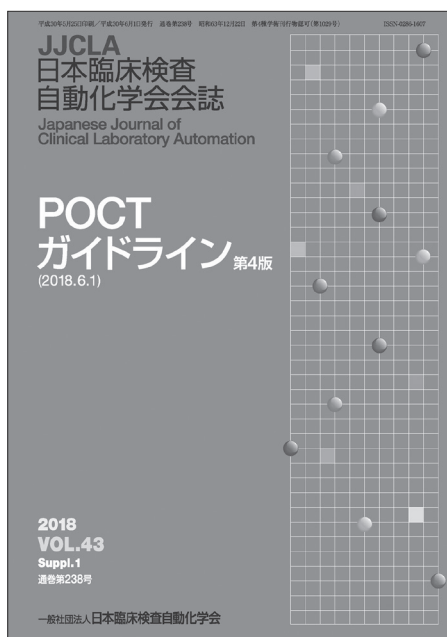
JJCLA Vol.43 Suppl.1

POCT 第4版 ガイドライン

POC技術委員会 編
価格:2,000円+税 送料別

■主な目次

- 第1章 ガイドライン作成の基本方針
- 第2章 POCTの定義
- 第3章 POCTの和名
- 第4章 備えるべき機能・文書
- 第5章 添付文書および取扱説明書に記載すべき事項
- 第6章 導入に際しての留意点
- 第7章 システムとしての組み方
- 第8章 診療録へのデータの記録
- 第9章 被検者(患者)への検査データの提供方法
- 第10章 被検者への教育・啓発
- 第11章 検査データの保証
- 第12章 POCTにおける経済効率
- 第13章 関連職種との連携による管理体制の構築
- 第14章 臨床検査室および臨床検査技師の役割
- 第15章 医師、看護師等に対する支援・協調
- 第16章 生体検査としてのPOCTのありかた
- 第17章 被検者が自ら行う検査の管理
- 第18章 災害とPOCT
- 第19章 POCTにおけるデータ交換仕様の動向
- 第20章 ISOによる臨床検査室認定および医療機関のJCI認定
- 第21章 指先部からの採血方法とセンサー等の装着



一般社団法人 日本臨床検査自動化学会

〒113-0033 東京都文京区本郷 4-2-5 MAビル6F Tel. 03-3813-6635 Fax. 03-3813-6679
ホームページ <http://www.jscla.com/> e-mail: jidouka@jscla.com

編集後記

令和二年1月から「医療検査と自動化」誌の編集委員長を拝命しました札幌医科大学の高橋 聡と申します。学会誌が「医療検査と自動化」の誌名となって初めての発行となりました。今までの「日本臨床検査自動化学会誌」から引き続き、日本医療検査科学会 会員の皆さまの研究発表と教育活動に寄与させていただきたいと考えております。編集委員の皆さまにも円滑に査読をしていただけるように工夫していきたいと思っております。また、会員の皆さまのご研究を、是非、本誌へ投稿していただけますようお願いいたします。

第45巻1号では、東京女子医科大学の佐藤麻子先生が総説として「糖尿病の診断基準とHbA1c」を寄稿してくださいました。糖尿病診断基準の変遷、そして、

HbA1cの問題点と国際標準化についての解説は、知識と今後の問題点の整理に大いに役立つ内容と思います。さらに、3編の原著、8編の技術、1編の症例、1編の報告（短報）が掲載されており、臨床検査の幅広い分野から臨床研究と試薬・機器の基礎的検討・性能評価についての興味深い内容となっています。

札幌では冬の代名詞でもある雪まつりが開幕しております。編集後期執筆時点では、寒さが例年よりも厳しい印象です。厳しい(長い)冬の後には春がやってきます。研究や論文執筆も時には苦しいこともあるかと思いますが、この学会誌への掲載がまさに花開く春の如しと乗り越えていただけましたら幸甚です。

編集委員長 高橋 聡

「医療検査と自動化」編集委員会

編集委員長 高橋 聡

副編集委員長 石井潤一

編集幹事 村上正巳, 盛田俊介, 横田浩充

編集委員 阿部正樹, 池田勝義, 石井良和, 磯部和正, 渭原 博, 氏家真二, 大久保滋夫, 岡野芳幸, 長田 誠, 萱場広之, 栢森裕三, 康 東天, 澤部祐司, 静 怜子, 澁谷和俊, 厩谷直人, 白井秀明, 清宮正徳, 千本松孝明, 竹越一博, 通山 薫, 中山智祥, 長井 篤, 永井正樹, 南木 融, 野村文夫, 萩原三千男, 春木宏介, 菱沼 昭, 日高 洋, 藤巻慎一, 松尾収二, 松原朱實, 三島清司, 三橋知明, 宮下徹夫, 行正信康, 和田隆志

英文校閲 S. Bernice Miwa

医療検査と自動化（日本医療検査科学会誌）

—Clinical Laboratory Science Journal—

第45巻 第1号（通巻第247号） 2020年2月1日発行

発行 一般社団法人 日本医療検査科学会

制作 「医療検査と自動化」編集委員会

発行人 萱場広之

〒113-0033 東京都文京区本郷2-31-2

事務所 〒113-0033 東京都文京区本郷4-2-5

Tel. 03-3818-3205 Fax. 03-3818-6374

Tel. 03-3813-6635 Fax. 03-3813-6679

e-mail : t-gaku@gk9.so-net.ne.jp

ホームページ <http://www.jcls.com/> e-mail : office@jcls.or.jp

送付先変更等の手続きのご案内

入会・送付先変更・退会のご用命は、本学会ホームページに記載しております「会員マイページ」より手続きが行えます。補冊購入のご注文は上記学会事務所までE-mail・Fax・郵送にてご連絡下さい。