# 医療検査と自動化

(日本医療検査科学会誌)

Clinical Laboratory Science Journal

第52回大会終了ご挨拶 第35回春季セミナー公告(第1報) 第53回大会公告(第1報) 総説:

白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の試み…糸賀 栄/503







## 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: ディスクリー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

本 社 〒105-6409 東京都港区虎ノ門一丁目 17番 1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスタワー お客様サポートセンタ (03) 3504-7211

www.hitachi-hightech.com/jp/science/

北海道(札幌) (080)8021-5427 東 北(仙台) (080)8438-0969 中 部(名古屋) (080)8420-6408 関 西(大阪) (080)8020-3544 九 州(福岡) (080)9564-0285

株式会社日立ハイテクノロジーズは2020年2月12日より株式会社日立ハイテクに社名変更、および、本社を上記へ移転しました。

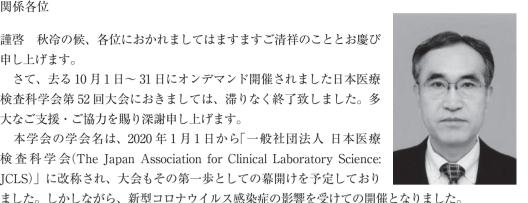
## 日本医療検査科学会第52回大会終了ご挨拶

関係各位

謹啓 秋冷の候、各位におかれましてはますますご清祥のこととお慶び 申し上げます。

さて、去る10月1日~31日にオンデマンド開催されました日本医療 検査科学会第52回大会におきましては、滞りなく終了致しました。多 大なご支援・ご協力を賜り深謝申し上げます。

本学会の学会名は、2020年1月1日から「一般社団法人 日本医療 検査科学会(The Japan Association for Clinical Laboratory Science: ICLS)」に改称され、大会もその第一歩としての幕開けを予定しており



振り返れば、大会に合わせて開催される日本臨床検査機器・試薬・システム振興協会展示会 TACLaS EXPO 2020 の通常開催を信じ、6月に「合同新型コロナウイルス感染症対策委員会 | を 設置し、準備してまいりました。しかし、想定を上回る感染拡大に伴う自治体や関係各施設から の移動の自粛や感染リスク等の状況に配慮し、8月上旬に苦渋の決断をし、WEB 開催に至った次 第です。この状況下ではありましたが、一般演題は、184題を登録いただきました。オリンピック・ パラリンピック関連の企画、国際シンポジウムは断念しましたが、そのほかのプログラムはおおむ ね実施できました。皆様には重ねて感謝申し上げます。

本大会は、総合テーマとして「これからの臨床検査のあり方」を掲げました。特別講演は、自治 医科大学学長の永井良三先生に「デジタル時代の医療検査科学」をご講演いただきました。記念 講演として日本臨床衛生検査技師会の宮島喜文会長(参議院議員)に「臨床検査を新生させ、未来 を拓く―ポスト新型コロナウイルス時代を考える―」、また、国際医療福祉大学大学院の大澤進先 生に「これからの臨床検査技師のあり方」をご講演いただきました。

教育講演、シンポジウムは「これからの臨床検査のあり方」をテーマに、分子病理検査、臨床検 査技師教育、臨床化学検査、生理学的検査、血液学検査をご講演いただきました。各種技術セミ ナー、ランチョンセミナー、モーニングセミナー、RCRP「検査値を読むトレーニング:考える臨 床検査:徹底討論-検査の奥深さを知る」も充実した内容で貴重な知見でした。

参加者には、オンデマンド配信の利点を生かし、ご都合の良い時間に専門外の領域のテーマな ども含めて幅広く学ぶ機会にしていただけたものと考えております。

医療や臨床検査の技術革新は目覚ましく、ゲノム医療、画像診断・解析技術や AI(人工知能)の 活用が進んでいます。今後も新しい技術を活用し、より幅広い医療や臨床検査のニーズに対応し ていくことが求められています。このような現況において臨床検査関係者の連携が進み、検査業 界全体の発展がますます進むことを期待しています。

次の第53回大会は、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の柳原克紀大会長のもと横浜で開催 されます。本学会のさらなる発展と皆さまの御多幸を祈念し、お礼のご挨拶とさせていただきます。 謹白

> 令和2年11月吉日 日本医療検査科学会第52回大会 大会長 横田 浩充

#### 日本医療検査科学会(旧:日本臨床検査自動化学会)

## 第35回春季セミナー公告(第1報)

テーマ:プレシ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・輸血部部長

会 期:春季セミナー 令和3年4月18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 17 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17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、国際交流委員会、編集委員会、

認定 POCCWG、遺伝子・プロテオミクス WG

## -----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:「臨床検査領域講習 | 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) ~」

- 尿沈渣検査から尿中有形成分情報へ金城 和美(琉球大学医学部附属病院検査・輸血部)
- 血球細胞分類装置を用いた血液検査室の運用笠畑 拓志(鹿児島大学病院検査部)
- 感染症診療に有用な、細菌検査室からの情報発信 清祐 麻紀子(九州大学病院検査部)
- 抗核抗体検査の自動判定システムの導入と現状の課題 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:

「プレシ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

【機器・試薬セミナー】 12:50 ~ 14:10

司会:

#### 【シンポジウムⅡ】 14:10~15:10

「AI 医療の取り組み」

- 内視鏡検査における AI 活用(仮) 戸叶 雅之(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) 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

柳原 克紀 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科病態解析・ 診断学分野(臨床検査医学) 教授

次期例会長ご挨拶

末岡 榮三朗 佐賀大学医学部臨床検査医学講座 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 35 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53回大会大会公告(第1報)

## 大会テーマ: 「日本医療検査科学会の未来を創る - 技術革新と人材育成 - 」



**期**: 2021 年 10 月 8 日(金)~10 日(日)

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: 柳原 克紀

(長崎大学大学院病態解析・診断学分野(臨床検査医学)教授)

**大会事務局**:日本医療検査科学会

TEL: 03-3813-6635 FAX: 03-3813-6679

E-mail: office@jcls.or.jp

演題募集期間:2021年4月1日(木)~4月30日(金)

## ―プログラム大綱-

#### < 企画中 >

特別講演、教育講演、シンポジウム、JACLaS 共催企画講演、 RCPC、モーニングセミナー、技術セミナー、論文賞受賞講演、 一般演題、企業共催セミナー、JACLaS 合同交流会、他



## 医療検査と自動化

第45巻 第5号 2020年 11月

## 日本医療検査科学会誌

## 目 次

#### 学会ニュース

総説	
白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の試み	栄…(503)
原著	
新たに開発された核酸増幅検査試薬「コバス6800/8800システムHBV」,	
「コバス6800/8800システムHCV」および	
「コバス6800/8800システムHIV-1」の評価 ·······田原	
脳梗塞症例を対象としたBNPおよびD-dimerの臨床的有用性に関する検討小澤	優貴…(523)
Latex Agglutination Assayを原理とするIgG4測定試薬の性能評価 - IgG4高値症例の血清IgG4値の推移からみた測定上限値向上の必要性 - ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	充子…(531)
レクチンELISA法を用いた血清フコシル化	
C4b-binding protein a-chain測定系の構築	一幸…(540)
酵素法でコレステロールとトリグリセライドの和を	
染色する全自動リポ蛋白分画法の開発山口気	系摘美…(544)
血清肝線維化マーカーに及ぼす腎機能の影響に関する検討	貴之…(551)
抗パーキンソン病薬レボドパ・カルビドパ配合剤による	
ALT値への影響と対策 ·······林	智弘…(555)
免疫グロブリン高値検体におけるキャピラリー電気泳動法と	
BCP改良法のアルブミン値乖離に関する検討山村	彩佳…(562)
技術	
CGMにおける5分毎測定時と15分毎測定時の	
血糖変動指標の値の比較検討 武石	宗一…(569)
キャピラリー電気泳動法技術を応用した小型で簡便かつ	
精確なHbA1c測定法 The Lab 001 ··················和谷	幸雄…(573)
ディープラーニングを用いた尿中赤血球の形態分類山本	雄彬…(581)
血中IgG4測定試薬「N-アッセイLA IgG4ニットーボー」の基本性能評価 ······田中真	延輝人⋯(589)
抗サイログロブリン抗体がサイログロブリン測定に与える影響について 俵木	美幸…(595)
エアシューター <sup>®</sup> 搬送による物理的衝撃がプレセプシン値に及ぼす影響 坂本	大典…(599)
TT市人	(COE)



## Clinical Laboratory Science Journal

## CONTENTS

#### JCLS News

Review
Development and Evaluation of Lyophilized Cell External Control Panels
for BCR-ABL1, PML-RARA and WT1 mRNA Quantification ······Sakae ITOGA···(503)
Reports
Evaluation of Three Newly developed Real-time PCR Assays, cobas 6800/8800 HBV,
cobas 6800/8800 HCV and cobas 6800/8800 HIV-1 Kazuko TAHARA(513)
Clinical Usefulness of BNP and D-dimer in Patients
with Cerebral Infarction ········Yuki OZAWA···(523)
Performance Evaluation of IgG4 Measuring Reagents by Latex
Agglutination Assay and Necessity to Improve the Upper Limit of
Measurement in Patient with High Level IgG4 Change. · · · · · · · MITSUKO MATSUMURA · · (531)
Development of a Lectin Antibody ELISA System for Measuring Fucosylated
C4b-binding Protein α -chain
Development of a Fully Automated Enzymatic Lipoprotein Fractionation Method
for Staining Total Cholesterol and Triglycerides
Effect of Renal Function on Serum Liver Fibrosis Markers Takayuki KUROSAWA (551)
Influence to ALT Value by the Levodopa Carbidopa of
Parkinson's Disease Drugs and the Countermeasures
Investigation of Discordance between Capillary Electrophoresis Albumin
and Modified BCP Albumin in High Immunoglobulin Concentration ······· Ayaka YAMAMURA···(562)
Reports
Comparison of Glycemic Variability Values Calculated from
Sensor Glucose Levels Measured Every 5 and 15 Minutes ······Soichi TAKEISHI···(569)
Unique HbA1c Device equipped with Small, Simple, Swift and Accurate
by Applying the Capillary Electrophoresis, The Lab 001 ·········Yukio Hosoya···(573)
Morphological Classification of Urinary Red Blood Cells
Using Deep Learning ·······Kazuaki YAMAMOTO···(581)
Fundamental Performance Assessment of "N-Assay LA IgG4 Nittobo"
for Measurement of IgG4 ··········Makito TANAKA ··· (589)
The Effect of Antithyroglobulin Antibody on Serum Thyroglobulin Level Miyuki HYOKI (595)
Impact of Air-shooter® Transportation on Presepsin Values ······ Daisuke SAKAMOTO··· (599)
Boad Meeting Minutes(605

#### 総説

## 白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の試み

Development and Evaluation of Lyophilized Cell External Control Panels for BCR-ABL1, PML-RARA and WT1 mRNA Quantification

#### 糸賀 栄

#### はじめに

ゲノム医療の急速な進歩に対応すべく法改正等も 実施され、外部精度評価の重要性が増している。 ISO 15189認定においては、施設技能試験としての 外部精度評価への参加や標準物質の使用が必須条件 となっている。現在、国内の機関により実施される のは病原体核酸検査が中心で日本臨床衛生検査技師 会が行っている結核菌群の定性、HBV-DNA定量、 HCV-RNA定量の3項目であり、ヒト遺伝子関連検 査(体細胞遺伝子検査、遺伝学的検査)については広 域な実施体制が整備されておらず、国内での体制造 りが急務である。国内で実施体制の整っていない現 状ではCAP、EMQN等の国際的大規模外部精度評 価プログラムに積極的に参加する必要がある。

日本医療検査科学会(旧日本臨床検査自動化学会)の遺伝子・プロテオミクス技術委員会(以下,本委員会)では、2002年より白血病関連遺伝子検査の外部精度評価を白血病培養細胞の凍結乾燥試料を用いて同検査の施設間差の現状把握とその是正に向けて合計5回実施してきた。白血病培養細胞の凍結乾燥品はRNA解析用試料として安定性に優れ、実際の血液サンプルの様にRNA抽出過程から調べることができることから、WHOの一次標準物質として

も利用されており実用性が高い1)。

この総説では、2018年~2019年に行った第5回外部精度評価を中心に第3回外部精度評価以降の BCR-ABL1 mRNA 定量の国際標準化の動きを踏ま えて解説する。

#### 1. 背景

BCR-ABL1 mRNA 定量検査の国際標準化の推移と本委員会の活動を Table 1 に示した。遺伝子関連検査では、白血病の微小残存病変(MRD)の検出に対してRT-PCR法の有用性が確立し、いち早く造血器腫瘍核酸増幅同定検査が保険収載されている。本委員会では、第1回外部精度評価(2002年11月)を参加23施設(Table 2)で培養細胞(K562とHL60)の凍結乾燥品を用いMajor BCR-ABL1 mRNA 定性検査について実施した。その結果、同検査に用いるRT-PCR法には多くの分析誤差要因が存在することを明らかにした<sup>2)</sup>。

MRDの検出に加え治療効果モニタリングの必要性とリアルタイムPCR法の普及からPCR定量検査が多く利用されるようになり、定性検査に加えて定量検査での施設間差の調査が必要となった。そこで本委員会では、PCR定量検査を含めた白血病関連遺伝子検査の施設間差の把握を目的に第2回外部精

Sakae ITOGA 公益財団法人 かずさ DNA 研究所 ゲノム事業推進部 臨床オミックス解析グループ 臨床解析チーム 〒 292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-23 Team Leader

Clinical Analysis Team

Laboratory of Clinical Omics Research

Department of Applied Genomics Kazusa DNA Research Institute.

2-6-7 Kazusa-kamatari, Kisarazu Chiba, 292-0818 Japan

TEL: 0438-52-3900

E-mail: sitoga@kazusa.or.jp

Table 1 BCR-ABL1 mRNA 定量検査の国際標準化の推移と遺伝子・プロテオミクス技術委員会の活動

年	検出技術/臨床研究	標準化	保険収載/自動化学会
1989	RT-PCR法 (MRDの検出)		
1990年 代~	BCR-ABL1のRT-PCR法による検出が普及		
1998			造血器腫瘍核酸増幅同定検査 (6ヶ月に1回) 2,000点
1999	リアルタイムPCR法(MRDの検出+治療効果 モニタリング)	RT-PCR定性法 (BIOMED-1). Leukemia	
2001	ABLキナーゼ阻害剤(Imatinib)による分子標的 治療		
2002			11月 <b>第1回外部精度評価</b> (定性) <sup>2)</sup>
2003	・MMRの定義(3log 減少) ・IRIS試験(論文報告). N Engl J Med <sup>4)</sup>	RQ-PCR標準化(EAC program). Leukemia	
2004	TIDEL study (增量試験). Blood		11月 白血病関連遺伝子検査アンケート調査
2005		10月 NIHコンセンサス会議(ISの提唱)	
2006	・MMRの定義(0.1%) ・IRIS試験(5年目報告). N Engl J Med	CFの概念 推奨される内部コントロール遺 伝子(ABL, BCR, GUS). Blood	
2007	次世代チロシンキナーゼ阻害剤	・NIBSCでの標準物質としてのK562/HL60 凍結乾燥細胞作製に関する基礎検討. Leukemia (2007) ・37施設で同一スタンダードを用いた場合. Leukemia (2008)	・WT1 mRNA定量が保険承認 (1ヵ月に1回) 2,000点 ・3 月 <b>第2回外部精度評価</b> (定性・定量) <sup>3)</sup>
2008		CFの実践. Blood (2008) <sup>5)</sup>	・Major bcr-abl mRNA核酸增幅精密測定(TMA法)が保険 承認1,200点 ・8月 第3回外部精度評価(予備調査)
2009	ELNの判定規準. J Clin Oncol (2009)		
2010	Stop Imatinib (STIM ) study. Lancet Oncol (2010)	WHO 一次標準物質.Blood (2010) <sup>1)</sup> 8月 CF値の安定性についての学会発表 (ASH)	・血液細胞核酸増幅同定検査(2ヶ月に1回) 2,000点 ・5月 BML CF取得 <sup>6</sup> , 10月 SRL CF取得
2011		10月 ARQ IS Calibrator Panel発売 (Asuragen社)	6月 千葉大学 CF取得
2012			<ul> <li>造血器腫瘍遺伝子検査(1カ月に1回) 2,100点</li> <li>Major BCR-ABLI mRNA(TMA法) 1,200点</li> <li>WT1 mRNA定量 2.520点</li> <li>・染色体検査2,730点</li> <li>・免疫関連遺伝子再構成2,520点</li> </ul>
2013	ELNの判定規準(改訂). Blood (2013)	ARQ IS Calibrator Panelを用いた外部精度 管理. Clim Chem (2013)	9月 <b>第3回外部精度評価</b> (BCR-ABL1定量) <sup>7)</sup>
2014	*Digital RT-PCRの利用 *According to Stop Imatinib(A-STIM) study. J Clin Oncol (2014)		
2015		認証標準物質(プラスミドDNA)(2015)	・Major BCR-ABL1 mRNA(IS) 2,520点 ・4月 アンケート調査
2016	第3世代BCR-ABL TKIポナチニブが国内承認	二次標準物質(凍結乾燥品)の評価. Leukemia (2016) <sup>8)</sup>	4月 <b>第4回外部精度評価</b> (BCR-ABL1定量) <sup>9)</sup>
2018			9月 <b>第5回外部精度評価</b> (4項目定量·定性) <sup>10)</sup>

度評価(2007年3月)を参加31施設(**Table 2**)で 実施した。新たに培養細胞(K562:BCR-ABL1 b3a2 type とNB4:PML-RARA bcr1 type)の凍結 乾燥試料を作製し、さらにcDNA試料も用いて定 量法の誤差要因の大きさを調べ、測定法の標準化に は報告の際の補正式の統一化と標準物質の使用が必 要であるとの結論を得た<sup>3)</sup>。

分子標的治療薬の治療効果判定については国際的な大規模多施設臨床試験が行われ、その際、BCR-

ABL1定量検査の国際的な標準化が必要となった<sup>4)</sup>。 リアルタイムPCR法によるPCR定量検査は5 logに 渡る測定レンジを持ち、高感度に測定できることか ら分子標的治療薬による治療効果判定のモニタリン グに欠かせない検査法となっている。しかしながら、 施設によりコピー数算出の際のDNA 濃度求め方、 内部(内在性)コントロール遺伝子、報告値の単位 や算出方法に違いがあるため報告値が大きく異なる ことが問題となっている。報告値の違いを解消する

Table 2 参加施設一覧

第1回	gr.	第2回	第3回	第4回	第5回
北海道大学医学部附属病院	北海道大学病院	神戸大学医学部附属病院	北海道大学病院	北海道大学病院	北海道大学病院
東北大学医学部附属病院	札幌医科大学医学部附属病院	岡山大学医学部歯学部附属病院	札幌医科大学附属病院	札幌医科大学附属病院	札幌医科大学医学部附属病院
山形大学医学部附属病院	青森県立中央病院	(財)倉敷中央病院	獨協医科大学病院	群馬大学医学部附属病院	市立札幌病院
新潟大学医学部附属病院	新潟大学医歯学総合病院	広島大学医学部歯学部付属病院	群馬大学医学部附属病院	獨協医科大学病院	東北大学医学部附属病院
自治医科大学附属病院	濁協医科大学病院	山口大学医学部附属病院	㈱三菱化学メディエンス	筑波大学附属病院	獨協医科大学病院
筑波大学医学部附属病院	筑波大学附属病院	九州大学病院	東京大学医学部附属病院	千葉大学医学部附属病院	筑波大学附属病院
千葉大学医学部附属病院	埼玉県立がんセンター	長崎大学医学部歯学部附属病院	神奈川県立がんセンター	(株)ビー・エム・エル	千葉大学医学部附属病院
(株)エスアールエル	㈱ビー・エム・エル	宮崎大学医学部附属病院	横浜市立大学附属市民総合医療センター	㈱LSIメディエンス	㈱ビー・エム・エル
㈱ピー・エム・エル	千葉大学医学部附属病院		名古屋大学医学部附属病院	国立がん研究センター中央病院	㈱LSIメディエンス
㈱三菱化学ビーシーエル	㈱三菱化学ビーシーエル		京都大学医学部附属病院	東京大学医学部附属病院	㈱エスアールエル
㈱大塚東京アッセイ研究所	東京医科歯科大学		天理よろづ相談所医学研究所	㈱エスアールエル	国立がん研究センター中央病院
東京医科歯科大学	東京大学医学部附属病院		九州大学病院検査部	神奈川県立がんセンター	慶應義塾大学病院
東京大学医学部附属病院	慶慮義塾大学病院		千葉大学医学部附属病院	横浜市立大学附属市民総合医療センター	東京大学医学部附属病院
北里大学病院	㈱エスアールエル		(株)ビー・エム・エル	名古屋大学医学部附属病院	東海大学医学部付属病院
東海大学医学部附属病院	神奈川県立がんセンター		(株)エスアールエル	奈良県立医科大学付属病院	静岡赤十字病院
信州大学医学部附属病院	北里大学病院			京都大学医学部附属病院	名古屋大学医学部附属病院
名古屋大学医学部附属病院	静岡県立総合病院			長崎大学病院	京都大学医学部附属病院
三重大学医学部附属病院	信州大学医学部附属病院				天理よろづ相談所医学研究所
天理よろづ相談所病院	金沢大学				奈良県立医科大学附属病院
倉敷中央病院	名古屋大学医学部附属病院				大阪大学医学部附属病院
広島大学医学部附属病院	三重大学医学部附属病院				長崎大学病院
長崎大学医学部附属病院	京都大学医学部附属病院				
宮崎医科大学医学部附属病院	天理よろづ相談所医学研究所				

ために国際標準化が、唯一Major BCR-ABL1 mRNA 定量検査において行われている。はじめは、 国際リファレンスラボに検体を送り補正係数である Conversion factor (CF) を取得し測定値を合わせ る方法が取られていた<sup>5)</sup>。2010年に国際標準化のた め、WHOが一次標準物質として2種類のcell line (K562とHL60) の混合濃度系列による凍結乾燥品 パネルを作製している1)。このWHO一次標準物質 には、推奨される3つの内部コントロール遺伝子別 に表示値が%BCR-ABL1として付けられ、これを 用いて測定値を国際標準値 (International Scale: IS) へ変換する。本委員会では、WHOの一次標準 物質と同様に培養細胞の凍結乾燥品を作製し、日本 でConversion Factor (CF) を取得していた3施設 で値付けを行い、自家製の二次標準物質として、市 販品の二次標準物質と同じ計算法で参考変換係数を 求める第3回外部精度評価(2013年9月)を参加12 施設 (Table 2) で行った<sup>4)</sup>。

凍結乾燥品のWHO一次標準物質は数に限りがあるため、二次標準物質の製造機関(メーカー)にのみ供給され、一般的な施設では使用できない。そこで、常用の凍結乾燥品の二次標準物質を作製し、その有用性の調査が2016年に国際的なリファレンスラボ44施設を対象として大規模に行われている<sup>5)</sup>。この調査に日本から参加した施設は無く、わが国においても同様の凍結乾燥品を用いた二次標準物質の作製が急務とされた。そのような中で、国内ではWHO一次標準物質に基づく国際標準化(IS)キッ

トが保険収載された [シスメックス社 (S社) と大塚製薬社 (O社)]。本委員会では、二次標準物質を有する IS キットによる施設間差是正の効果を調べるため、第3回と同じロットの試料を用いて、IS キット (S社4施設、O社4施設)を含めた第4回外部精度評価(2016年4月)を参加14施設(Table 2)で実施した $^6$ )。

さらに、第5回外部精度評価(2018年8月)では、Major BCR-ABL1 mRNA定量検査の他にminor BCR-ABL1, PML-RARA, WT1 mRNA定量と要望のあった定性検査を加えた外部精度評価を参加 20施設(**Table 2**)で実施した。BCR-ABL1とPML-RARAについては、検出感度付近から測定レンジを広くとりLog Reductionでも比較し報告形式によらずに評価できるようにした $^{70}$ 。

#### 2. 第3回外部精度評価

#### 1) 目的

WHO一次標準物質を模した外部精度評価試料を作製した。それらをCF取得施設で値付けして自家製の二次標準物質として施設間差是正への効果を調べることを目的とした。

#### 2) 方法 (Fig. 1)

2013年9月~11月に参加12施設(内部コントロール遺伝子ABL: 10, GAPDH:1, I8SrRNA:1) へ外部精度評価試料を配布した。精度評価試料は培養細胞(K562/NB4;1.0E6個)の凍結乾燥品3濃度で、国内CF取得施設(ABL:3, GAPDH:1)で値付け

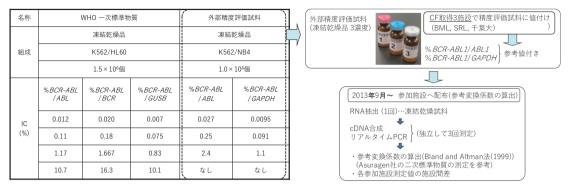


Fig. 1 第3回外部精度評価の概要とそれに用いた凍結乾燥試料

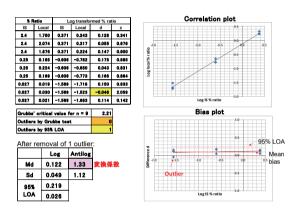


Fig. 2 第3回外部精度評価で求めた参考IS変換係数算 出の例

した。参加施設では試料からRNAを抽出し、独立して3回のMajor BCR-ABLI mRNA定量値の測定を行った。参考IS変換係数の算出にはBland and Altman法を用いた。施設間差の評価のため施設間CV(%)を求めた。

#### 3) 結果

外部精度評価に参加した12施設の参考IS変換係数を算出した。その一例をFig. 2に示した。内部コントロール遺伝子ABL1で参加した10施設の変換係数は平均値±1SDで表すと1.01±0.61であり,精度評価試料(3濃度;2.4%,0.25%,0.027%)の施設間CV(%)は順に62,84,83であった(Fig. 3)。WHO一次標準物質(濃度;1.2%,0.11%,0.012%)を値付けした際の国際リファレンスラボ7施設での施設間CV(%)は順に84,90,90であり今回の外

部精度評価より大きな施設間差であったが, IS変 換後では41, 41, 41と半減していた。

#### 4) 結論

第3回外部精度評価ではMajor BCR-ABL1 mRNA定量値について実施し、参加12施設へ参考 IS変換係数を報告した。国内のIS未報告施設では、IS報告の導入より施設間差を半減できる可能性がある結果を得た。

#### 3. 第4回外部精度評価

#### 1) 目的

Major BCR-ABL1 mRNA定量検査は、ISキットが保険収載され国際標準化が進んでいる。また、自家製試薬を用いた検査法(LDT)を用いる施設では市販の二次標準物質を用いてISで報告することもできる。第4回の外部精度評価では、第3回外部精度評価と同一ロットの凍結乾燥試料を用いてISキットや二次標準物質の使用により、Major BCR-ABL1 mRNA定量値の施設間差がどの程度まで収束したかを調査した。

#### 2) 方法

2016年4月に参加14施設(うち2施設は2つの測定系で参加)へ外部精度評価試料を配布した。外部精度評価試料は、WHO一次標準物質を模して作製した培養細胞(K562/NB4;1.0E6個)の凍結乾燥品3濃度で、第3回外部精度評価と同一ロットを使用した。参加施設では外部精度評価試料からRNAを抽出し、Major BCR-ABL1 mRNAの定量測定を行った。施設間差の評価のため施設間CV(%)を求めた。また、参考として各施設の測定値を標準偏差

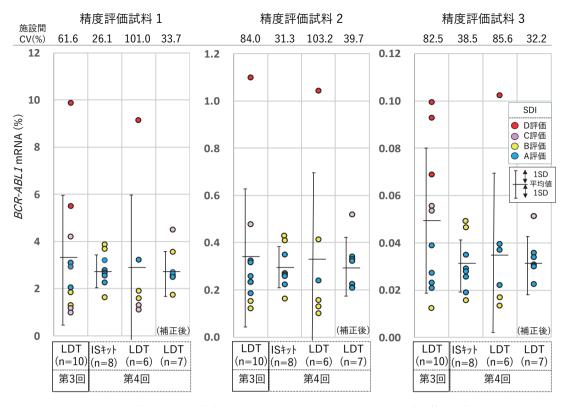


Fig. 3 第3,4回外部精度評価におけるMajor BCR-ABL1 mRNA 定量値の分布

指数(standard deviation index; SDI またはzスコア)で評価した。SDI を求めるにあたり  $M_{adjE}$ , SDE はISキット (n=8)の平均値,SD値を用い,zスコアはロバスト法より算出した。LDTで参加した施設で第3回外部精度評価にも参加し,参考IS変換係数を求めた施設については,それによる補正値でも評価した。

#### 3) 結果

#### (1) 測定法

RNA抽出試薬については、最も多くの5施設で「QIAamp RNA Blood Mini Kit」が使用され、2施設で「RNeasy Mini Kit」と「Maxwell® RSC simplyRNA Blood Kit」が使用されていた。その他は1施設での使用であった(ISOGEN + PureLink RNA micro kit, RNA STAT-60, TRIzol Reagent, PureLink RNA Mini Kit, ISOGEN)。

リアルタイム PCR法について ISキットを使用していたのは8施設 [ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR

DX試薬;S社 (4施設), Major BCR-ABL mRNA測定キット「オーツカ」;O社 (4施設)] であり、LDTの使用は8施設であった。内部コントロール遺伝子についてはLDTの2施設で18SrRNAが使用されていた以外は全てABL1であった。

#### (2) 測定結果

内部コントロール遺伝子ABL1で参加した14施設の測定値の分布を第3回外部精度評価 (n=10) の結果を含めFig. 3に示した。IS キット群 (n=8) における精度評価試料1, 2, 3の平均値 (%) ± 1SDを順に示すとS 社キット (n=4) は2.8 ± 0.6, 0.30 ± 0.09, 0.027 ± 0.014 であり,O 社 キット (n=4) は2.8 ± 0.9, 0.30 ± 0.10, 0.035 ± 0.010 であり,2 キットの測定値は近似していた。IS キット群 (n=8) の施設間 CV (%) は濃度順に26.1, 31.3, 38.5 であった。この大きさは第3回外部精度評価 (n=10) の61.6, 84.0, 82.5 に比べ半分以下の値であり,施設間差が収束していた。LD T群 (n=6) における精度

#### A 第4回外部精度評価の報告書の例(LDTで参加の施設)

#### 2. 測定結果(%)

施設番号	精度管理試料 1	精度管理試料 2	精度管理試料 3
11	1.1	0.10	0.013

#### 【参考】

#### 1. SDI 評価 (2スコア;ロバスト法)

参考のため SDI 評価を行いました

	施設番号	精度管理語	試料 1	精度管理	試料 2	精度管理試料3	
		SDI	評価	SDI	評価	SDI	評価
	11	С	2.5	В	-1.97	В	-1.5

※SDI を求めるにあたり Madje ,SDE は標準化(IS)キット(n=8)の平均値、SD 値を用いました

IS キット(n=8)	精度管理試料1	精度管理試料 2	精度管理試料 3	
Mean±1SD	$2.8 \pm 0.7$	$0.30 \pm 0.09$	$0.031 \pm 0.012$	

| SDI | ≦1 A評価 1< | SDI | ≦2 B評価 2< | SDI | ≦3 C評価 3< | SDI | D評価

#### 2. 参考 IS 変換係数による補正

参考のため第3回外部精度管理で求めた貴施設の参考IS変換係数 "2.23" を用いて再計算をしました。

施設番号	精度管理試料 1	精度管理試料 2	精度管理試料 3
11	2.5	0.32	0.030

	施設番号	精度管理試料1		精度管理	試料 2	精度管理試料 3		
		SDI	評価	SDI	評価	SDI	評価	
	11	-0.3	A	-0.53	A	0.1	A	

#### B 第5回外部精度評価の報告書

コメント

【結果報告 2】Major BCR-ABL1 mRNA 定量 (6ページ)

①報告値: IVD(IS) キット(n=8)を基にした SDI 評価では  $\lceil A$  または B」評価でした。

No.		Bl		B2		B3		4	B5	
No.	SDI	評価	SDI	評価	SDI	評価	SDI	評価	SDI	評価
i	1.5	В	1.2	В	-0.4	A	-1.9	В	-1.004	В

②Log Reduction: IVD キット(n=8)を基にした SDI 評価では試料(B4)が低値傾向でした。

	No.	B1/B2		B1/B3		B1/B4		B1/B5	
		SDI	評価	SDI	評価	SDI	評価	SDI	評価
	i	-1.1	В	1.6	В	2.1	С	1.1	В

【結果報告3】PML-RARA mRNA 定量 (7 ページ)

①報告値:低濃度試料(P4) まで検出されています。各施設間での測定値の分布が大きいため評価を行っていません。

②Log Reduction:LDT キット(n=10)を基にしたSDI評価では「A」評価でした。

NI.	P1/P2		Pl	/P3	P1/P4		
No.	SDI	評価	SDI	評価	SDI	評価	
i	0.5	A	-0.4	A	0.5	A	

【結果報告 4】 WT/mRNA 定量 (8 ページ)

①報告値:IVDキット同士で近似した測定値となっています。

②Log Reduction: IVD キット(n=4)を基にした SDI 評価では「A」評価でした。

No.	B5/P4			
140.	SDI	評価		
i	-0.2	A		

【結果報告 5】 minor BCR-ABL1 mRNA 定量 (9 ページ) ①報告値: 低濃度検体(約 260 コピ-/アッセイ)の測定が検出されています。

Fig. 4 第4回, 第5回外部精度評価の報告書の例

評価試料1, 2, 3の施設間CV(%)は順に101.0, 103.2, 85.6であった。二次標準物質による変換係数(1施設)と第3回で二次標準物質を模して求めた参考IS変換係数(6施設;18S rRNAの1施設を追加)を用いて測定値を補正したところ,施設間CV(%)は順に33.7, 39.7, 32.2と改善されていた(Fig. 3)。

内部コントロール遺伝子に*ABL1*を用いる14施設の測定値をSDIで評価したところ, ISキット群 (n=8) ではA評価が62.5%, B評価37.5%であった。LDT群 (n=6) ではA評価が22.2%, B評価が50.0%, C評価が27.8%であった。二次標準物質または参考 IS変換係数による補正を行うとLDT群 (n=7) ではA評価が71.4%, B評価が9.5%, C評価が19.0% と改善されていた (Fig. 3)。

#### 4) 結論

第4回外部精度評価の参加施設へは、Fig. 4Aに示したように報告を行った。Major BCR-ABL1 mRNA 定量検査の調査を実施したところ、ISキットの使用により、施設間差が前回の第3回外部精度

評価に比べ半減していた。また、LDT使用施設でも二次標準物質の使用によりISキットでの施設間差に近づけられる可能性が示唆された。

#### 4. 第5回外部精度評価

#### 1) 目的

第5回外部精度評価では検出感度付近から測定レンジを広くとり報告形式によらずに評価できるようにLog Reductionで比較できる試料とした。さらに、minor BCR-ABL1、PML-RARA、WT1 mRNA定量を加えて参加20施設で実施した。これらの測定項目は、ISキット、自家調製試薬法(LDT)、保険収載キット(以下IVDキット)と多彩であり、白血病関連遺伝子検査の施設間差の現状調査を行った。

#### 2) 方法

Fig. 5に第5回外部精度評価の概要を示した。精度 評価試料は前回と同様に2種類の培養細胞(K562と NB4)の混合した凍結乾燥品であるが4~5logの希釈

#### 1. 外部精度評価試料と実施項目



- ① Major BCR-ABL1 mRNA 定量・定性 … 5本パネル(5 Log 濃度):試料B1~B5
- ② PML-RARA (bcr1) mRNA定量・定性・・・ 4本パネル(4 Log 濃度):試料P1~P4 … 高値2濃度 ③ WT1 mRNA定量 : 試料B5 P4 ④ minor BCR-ABL1 mRNA 定量·定性··· 低值1濃度 : 試料P4



#### Ⅱ. 報告内容

(1) 参加施設概要

2018年9月から

a.参加施設内訳, b.参加項目数内訳, c.RNA抽出試薬, d.リアルタイムPCR装置, e.内部コントロール遺伝子, f.補正式

1.RNA濃度、2.Major BCR-ABI 1 mRNA、3.PMI -RARA mRNA、4. WT1 mRNA、 5 minor BCR-ABI 1 mRNA



Fig. 5 第5回外部精度管理評価の実施概要

報告形式によらずに評価できるようにLog Reductionでも比較し、検出感度付近も調査できる試料とした。

系列を作製しMajor BCR-ABL1, PML-RARAの定 量検査用とした。低濃度試料も作製し検出感度付近 も調べられるようにした。加えて、K562細胞とNB4 細胞はいずれもWT1 mRNAを高発現しているため WT1 mRNA 定量検査用とした。また、K562細胞は minor BCR-ABL1もわずかに発現しているため minor BCR-ABL1 mRNA 定量検査にも用いた。定 量検査加えて定性検査の要望も多かったため、検出 感度付近の試料を用いてBCR-ABL1. PML-RARA mRNA 定性検査での参加も受け付けた。

#### 3) 結果

#### (1) 参加施設の属性

Fig. 6に第5回外部精度評価の参加施設の概要を示 した。参加施設については第1回から大学病院の割合 が多く、特に要望のあった定性検査を加えて実施した。 RNA抽出試薬ではキアゲン社が半数を占め、リアル タイムPCR装置については、項目により割合は異な るがロシュ社とサーモフィッシャー社で2分していた。 内部コントロール遺伝子の種類については、IVDキッ トにより異なりMajor BCR-ABL1検査でABL1. WT1検査でGAPDHが多く、LDTのみの項目では その2つが混在していた。報告の際に用いる補正式 については、同じIVDキットを使用する以外は、 各施設で微妙に異なり施設間差の大きさの原因とな っていた。この傾向は第2回の調査時から変わって おらず、測定法導入時の方法を継承し続けている施

設が多かった。Major BCR-ABL1 m RNA 定量検査 については国際標準化が進んでいるが、いまだ大学 病院を中心にLDTが多く使用され、しかも市販の 二次標準物質を用いたIS値での報告もなされてい なかった。

#### (2) 測定結果 (Fig. 7)

#### ① Major BCR-ABL1 mRNA

ISキット(n=8)を基にしたSDI評価を行った。 ISキット同士では近似した結果を示した。LDTとIS キットでは検出感度に差が見られた。加えて、LDT の8施設については補正式の違いもあり、SDI評価 の91%がCまたはD評価となった。そこで、補正式 にかかわらず施設内で定量値の増減を正確にモニタ リングできるかを評価するために高濃度試料(B1) を基準にLog Reductionで比較にした。報告値での 比較より収束した結果を示した。右下がりの直線と なっていない施設ではいずれかの濃度の測定に問題 がある可能性がある。ISキットでは1施設でC評価 が1つ見られたが、それ以外はAまたはB評価であ った。LDTではSDI評価の59%がAまたはB評価 であり、C評価とD評価は順に22%,19%であった。 ISキットでの性能が高い結果を示していた。LDT であっても市販の二次標準物質を用いてISで報告 することができる。しかしながら、検出感度やLog Reductionで問題がみられた施設では測定法の見直 しが必要かもしれない。

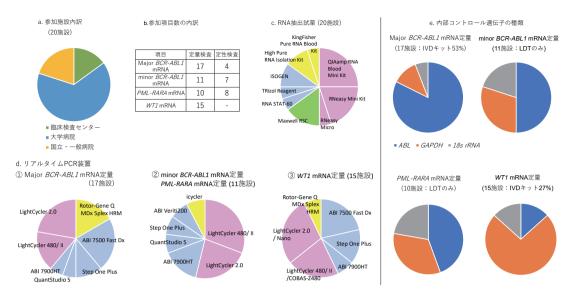


Fig. 6 第5回外部精度管理評価の参加施設の概要

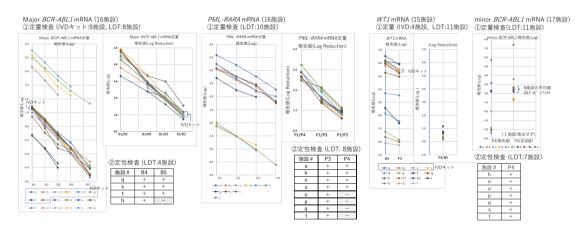


Fig. 7 第5回外部精度評価の測定結果

ISキット8施設については、第4,5回外部精度 評価での施設間CV(%)を比較した(Fig.8)。第 4回と第5回では同等の結果を示しており施設間CV 28~52%で一定の水準を保っていた。2010年に WHOで一次標準物質を値付けした際のリファレン スラボ7施設での施設間CV(%)と比較しても日本のISキットは国際水準にあると言える。

#### ②PML-RARA mRNA 定量

低濃度試料 (P4) で検出感度に差が見られた。定性検査において特に顕著で半数の施設は検出できな

かった。報告値では、各施設間で補正式の違いから 測定値の分布が大きくSDI評価は行わなかった。

高濃度試料 (P1) からのLog Reductionでは報告値での比較より収束した結果となった。この定量系についてはLDTのみで基準となる測定法が無いため全施設 (n=10) よりSDI評価したため、「検出せず」以外は全てAまたはB評価となった。Log Reductionの施設間CV (%) をISキット (Major BCR-ABLI) 群とPML-RARA LDT群で比較すると4.5~9.7 (平均7.3) %と9.7~17.1 (平均14.2) %でありLDT群で

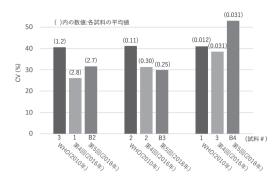


Fig. 8 第4,5回外部精度評価におけるISキットによる Major BCR-ABL1 mRNA 定量値の施設間差 (CV%)の比較

WHO - 次標準物質を値付けした際の国際リファレンスラボ7施設と第4,5回外部精度評価でのISキット8施設で測定値を施設間CV(%)で求めて比較した。

#### は施設間差が大きかった。

#### ③ WT1 mRNA 定量

IVDキット群では近似した報告値となった(最大最少の差0.3log)。LDT群では各施設で補正式が異なるため大きな施設間差を示した。これについては、2007年の第2回の調査時と同様な傾向であった。今回用いた試料(B5, P4)は高濃度のみのためLog ReductionでのSDI評価は行わなかった。

#### ④ minor BCR-ABL1 mRNA 定量

低濃度試料1濃度 (P4) での評価で、1施設以外は検出することができた。報告値については各施設での補正式が異なるため施設間での違いが大きかったが、実測値では比較的近似していた。近似していた6施設から平均値を求め、「低濃度検体(約260コピー/アッセイ)の測定が検出されています」として報告した (Fig. 4B)。

#### 4) 結論

Major BCR-ABL1 mRNA 定量検査については、ISキットが市販されたことにより一定の施設間差を維持できるようになった。しかし、LDTを使用する施設では大きな施設間差を示していた。LDTについては、市販の二次標準物質を用いてISで報告することが出来るが実施している施設は見られなかった。LDTのMajor BCR-ABL1、PML-RARAmRNA 検査において、特に検出感度付近での施設間差が大きく今後の検討課題である。検出感度の正

確な把握にはリコー社の技術を利用することができる<sup>11,12)</sup>。

WT1 mRNA定量検査については、IDVキットが広く使用され施設間差が少なくなっていた。LDTを使用している施設では、IDVキットとの違いを正確に把握しておくことが重要と考える。WT1 mRNA定量検査の国際標準化については、ヨーロッパでのキアゲン(旧Ipsogen)社キットと日本でのIVDキットの両者が併存しており、特に標準化の取り組みは行われていない。

#### おわりに

本委員会でのこれまでの白血病関連遺伝子検査の 外部精度評価の試みを以下にまとめた。

- ・外部精度評価の試料として培養細胞の凍結乾燥品 が有用であることを実証した。
- ・培養細胞の凍結乾燥試料は培養細胞の種類(Kasumi-1, THP-1, KOCL-48など)を変えることにより、多種類で低頻度の融合遺伝子に対応した試料を比較的容易に作製することができる。今後は標準化の進んでいない測定項目の標準物質としても利用可能である。
- ・白血病関連遺伝子検査においても標準化の進んだ ISキット・IVDキットにおいては、臨床化学検 査のようにSDI評価が可能である。Log Reductionでの比較は補正方法の異なるLDTを含めた 評価に利用できる。
- ・白血病関連遺伝子検査では多くの施設でLDTを使用しているが、このような外部精度評価を通じてIS・IVDキットとの違いを正確に把握しておくことが重要である。
- ・検出感度付近の施設間差が大きく、その原因究明 が今後の課題である。それを調べるための製品も 市販されている。
- ・今後もこのような外部精度評価の国内での永続的 な実施が必要である。

外部精度評価にご参加いただいた施設の関係各位 にこの場をかりて深謝いたします。

本論文の発表に関して、開示すべきCOI関係に ある企業などはありません。

#### 文 献

- White HE, Matejtschuk P, Rigsby P, et al. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. Boold 2010;116:111-117.
- 2) 横田浩充,吉川直之,矢冨裕,ほか.造血器腫瘍核酸増幅同定検査の標準化に向けたRT-PCR法分析誤差要因の検討 Major bcr/ablキメラmRNAの検出を例として. 日本臨床検査自動化学会会誌2004:29:21-26
- 3) 糸賀栄, 横田浩充, 南木融, ほか. 模擬標準物質を 用いたMajor BCR-ABLキメラ遺伝子定量検査の施 設間差是正への試み.日本臨床検査自動化学会会誌 2009:34:275-283
- Hochhaus A, Hensley ML, Gathmann I, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2003;349: 1423–1432.
- 5) Branford S, Fletcher L, Cross NC, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between

- clinical trials. Blood 2008; 112: 3330-3338.
- Yoshida C, Fletcher L, Ohashi K, et al. Harmonization of molecular monitoring of chronic myeloid leukemia therapy in Japan. Int J Clin Oncol 2012;17:584-589.
- 7) 糸賀栄, 横田浩充, 南木融, ほか. BCR-ABL1定量 検査の外部精度管理報告. 日本臨床検査自動化学会 会誌 2014;39:4:684.
- Cross NCP, White HE, Ernst T, et al. Development and evaluation of a secondary reference panel for BCR-ABL1 quantification on the International Scale. Leukemia 2016; 30:1844-1852.
- 9) 糸賀栄, 横田浩充, 南木融, ほか. BCR-ABL1 mRNA 定量検査の外部精度管理報告(第4回). 日本臨床検 査自動化学会会誌 2016:41:4:536.
- 10) 糸賀栄. 各検査領域の外部精度管理のあり方 遺伝 子関連検査の外部精度管理(評価). 日本臨床検査自 動化学会会誌 2018;44:4:315.
- 11) Seo M, Takabatake R, Izumi S, et al. Novel Bioprinting Application for the Production of Reference Material Containing a Defined Copy Number of Target DNA. Anal Chem 2019;91(20):12733-12740.
- 12) 株式会社リコーHP (https://industry.ricoh.com/ healthcare/biomedical/standard-dna)

新たに開発された核酸増幅検査試薬「コバス 6800/8800 システム HBV」, 「コバス 6800/8800 システム HCV」 および「コバス 6800/8800 システム HIV-1」の評価

## 新たに開発された核酸増幅検査試薬「コバス 6800/8800 システム HBV」, 「コバス 6800/8800 システム HCV」および 「コバス 6800/8800 システム HIV-1」の評価

Evaluation of Three Newly developed Real-time PCR Assays, cobas 6800/8800 HBV, cobas 6800/8800 HCV and cobas 6800/8800 HIV-1

田原和子 $^{1)}$  出口松夫 $^{2)}$  鍵田正智 $^{1/2)}$  吉岡  $\hat{\mathbf{u}}^{1/2)}$  塚本寛子 $^{1)}$  高尾美有紀 $^{1/2)}$  前田育宏 $^{1)}$  日高 洋 $^{1)}$ 

**Abstract** We evaluated three newly developed cobas 6800/8800 HBV, cobas 6800/8800 HCV and cobas 6800/8800 HIV-1 for the nucleic acid amplification tests that enable the quantification of hepatitis B virus (HBV) DNA, hepatitis C virus (HCV) RNA and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA, respectively.

In the dilution test for the cobas 6800/8800 HBV, the linearity was maintained in the range of 1.6 to 8.7 Log IU/mL. Quantification values between the cobas 6800/8800 HBV and the COBAS TaqMan HBV v2.0 showed a good correlation in 81 samples (r=0.981, v=0.990x+0.059).

In the dilution test for the cobas 6800/8800 HCV, the linearity was maintained in the range of 1.4 to 7.1 Log IU/mL. Quantification values between the cobas 6800/8800 HCV and the COBAS TaqMan HCV v2.0 showed a good correlation in 113 samples (r=0.996, y=1.022x-0.015).

In the dilution test for the cobas 6800/8800 HIV-1, the linearity was maintained in the range of 2.3 to 6.3 Log copies/mL. Quantification values between the cobas 6800/8800 HIV-1 and the COBAS TaqMan HIV-1 v2.0 showed a good correlation in 35 samples (r=0.979, y=1.045x+0.104).

In conclusion, three newly developed assays are sensitive, linear and correlate well with the established previous assays used in clinical practice.

Key words cobas 6800/8800, HBV, HCV, HIV-1, real-time PCR

#### 1. はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) やC型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染者はウイルス感染による炎症の持続により, 肝硬変や肝がんに進展する可能性がある。検査を行うことで感染者を早期に発見し, 医療機関においてその病態を把握し, 治療や経過観察を行うことが重要とされる1.2。

Received Feb. 21, 2020; Accepted Jun. 22, 2020 Kazuko TAHARA<sup>1)</sup>, Matsuo DEGUCHI<sup>2)</sup>, Masanori KAGITA<sup>1)2)</sup>, Nori YOSHIOKA<sup>1)2)</sup>, Hiroko TSUKAMOTO<sup>1)</sup>, Miyuki TAKAO<sup>1)2)</sup>, Ikuhiro MAEDA<sup>1)</sup>, Yoh HIDAKA<sup>1)</sup>

1) 大阪大学医学部附属病院 臨床検査部

②大阪大学医学部附属病院 感染制御部

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15

また、HBV既往感染者においては、免疫抑制や化学療法などによりHBVの再活性化がおこり、重症化しやすいことから発症そのものを阻止することが重要とされる¹¹。

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染者は、免疫系の CD4陽性Tリンパ球が減少し、免疫不全の状態となっ て後天性免疫不全症候群(AIDS)を発症する。検査を 行うことでHIV感染者を早期に発見し、HBVやHCV感

2-15, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871 Corresponding author: 田原和子

Corresponding author : m/s

TEL: 06-6879-6676

E-mail: taharaka@hp-lab.med.osaka-u.ac.jp

<sup>&</sup>lt;sup>1)</sup>Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Hospital

<sup>&</sup>lt;sup>2)</sup>Infection Control and Prevention, Osaka University Hospital

染者と同様に医療機関にてその病態を把握し,治療や経 過観察を行うことが重要となる<sup>3</sup>。

リアルタイムPCR法を測定原理とする核酸定性・定量検査は、ウイルス感染の診断、治療効果予測および治療効果判定などにも使用され、今日の医療現場では必要不可欠な検査となっている。

今回、我々はロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 (以下、ロシュ社と略す)より新たに発売されたHBV DNA測定試薬「コバス6800/8800システムHBV」、HCV RNA測定試薬「コバス6800/8800システムHCV」および HIV-1 RNA測定試薬「コバス6800/8800システムHIV-1」の性能を把握するため、旧法(ロシュ社)と比較検討 を行った。

#### 2. 材料および方法

#### 1) 材料

材料は、大阪大学医学部附属病院臨床検査部にHBV DNA検査またはHCV RNA検査の依頼があった患者血清およびHIV-1 RNA検査の依頼があった患者血漿(抗凝固剤EDTA-2K)を使用した。残余検体の保存には、ポリプロピレン製の滅菌チューブを使用し、測定まで-80℃にて凍結保存した。また、HIV-1 RNA検査に用いる残余検体の分離には、リンパ球の混入を避けるように留意した<sup>4,5)</sup>。なお、本研究は当院の観察研究倫理審査委員会の承認(承認番号:16302)を得て実施した。

#### 2) 測定機器

測定機器は、ロシュ社の遺伝子解析装置「コバス 6800システム」を使用した。本装置は、サンプルサプライモジュール、トランスファーモジュール、プロセス モジュールおよびアナリティックモジュールから構成され、核酸抽出から核酸増幅および検出までを自動的に行うことが可能である。一方、旧法の機器は、ロシュ社のコバス AmpliPrep およびコバス TaqMan を組み合わせた「TaqManオートシステム A」を使用した。

#### 3) 測定試薬

新法の試薬は、ロシュ社の「コバス 6800/8800 システム HBV」、「コバス 6800/8800 システム HCV」 および「コバス 6800/8800 システム HIV-1」(以下、各々新 HBV、新 HCV および新 HIV と略す)を使用した $^{6-10}$ 。一方、旧法の試薬は、ロシュ社の「コバス TaqMan HBV オート v2.0」、「コバス TaqMan HCV オート v2.0」 および「コバス TaqMan HIV-1 オート v2.0」(以下、各々旧 HBV、旧 HCV および旧 HIV と略す)を使用した $^{11-13}$ 。

#### 4) 測定原理

新法は旧法と同様、リアルタイムPCR法を測定原理

としている。 反応工程は、 検体に 検体希釈液を加えたも のを試料とし、プロテアーゼ試液、定量標準DNAまた は定量標準RNAを含む定量標準試液. 磁性粒子および ライシス試薬を添加して加温する。これによりウイルス が溶解し、検体や定量標準試液中の核酸が磁性粒子に吸 着する。洗浄後、吸着した核酸を溶出試液にて遊離させ、 マスターミックス1および2を加えて増幅工程に進む。 まず初めに、DNAウイルスの測定では2本鎖DNAを高 温で1本鎖に変性させる。一方、RNAウイルスの測定 においては、逆転写反応を行い、相補的な逆転写DNA (cDNA) を合成し、さらに高温にして1本鎖に変性さ せる。次に、温度を下げると1本鎖DNAの標的配列に 蛍光色素 (レポーター) と消光物質 (クエンチャー) で 標識したDNA プローブがハイブリダイズする。また. プライマーが標的配列の3'末端側へアニールし、DNA ポリメラーゼなどを用いて核酸増幅が行なわれる。相補 鎖が伸長される際、このDNAポリメラーゼは既にハイ ブリダイズしているDNAプローブに対して5'→3'エク ソヌクレアーゼ活性を示すため、DNA プローブは分解 される。これにより、それまで隣接していたレポーター とクエンチャーが分離し、クエンチャーの作用で消光さ れていたレポーターは蛍光を発する。この蛍光強度をサ イクル毎に測定し、蛍光強度が一定量以上になるサイク ル数を求めてCt値(Cycle-to-threshold value)とする。 既知量の定量標準DNAまたは既知量の定量標準RNA のCt 値と反応液中の標的DNAまたは標的RNAのCt 値を比較して検体中のHBV DNA、HCV RNAまたは HIV-1 RNAの濃度を算出する。

#### 5) 新法における主な変更点

試薬に関する主な変更点としては、新HBVでは測定範囲の拡大や単位の変更 $^6$ などがある。また、運用に関する主な変更点としては、新法ではHCV RNA測定とHIV-1 RNA測定の同時測定が可能となったことや検体を測定する毎に3項目共通のコントロールが自動測定されるようになったこと、新法の測定時間( $^24$ テスト)が旧法の約5時間から半分の約 $^25$ 時間に短縮されたことなどがある。さらに、検体量に関する主な変更点としては、新HIVで使用する検体量が $^500~\mu$ Lに減量されたこと $^7$ や全ての新法において $^200~\mu$ Lの検体量で測定する方法が追加されたことである。ただし、検体量を減量して測定する際には定量範囲の下限値に留意する必要がある。

#### 6) 方法

HBV DNA測定法, HCV RNA測定法およびHIV-1 RNA測定法については**Table 1**に示すように、各々の

	HBV DNA quan	tification assay	HCV RNA quan	tification assay	HIV-1 RNA quantification assay		
	New HBV	Old HBV	New HCV	Old HCV	New HIV	Old HIV	
	cobas 6800/8800	COBAS TaqMan	cobas 6800/8800	COBAS TaqMan	cobas 6800/8800	COBAS TaqMan	
	HBV	HBV v2.0	HCV	HCV v2.0	HIV-1	HIV−1 v2.0	
Instrument	cobas 6800	TaqMan auto	cobas 6800	TaqMan auto	cobas 6800	TaqMan auto	
	system	system A	system	system A	system	system A	
Reagent	cobas 6800/8800	COBAS TaqMan	cobas 6800/8800	COBAS TaqMan	cobas 6800/8800	COBAS TaqMan	
	system HBV	HBV auto v2.0	system HCV	HCV auto v2.0	system HIV-1	HIV-1 auto v2.0	
Material	Serum	Serum	Serum	Serum	Plasma	Plasma	
processing volume	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	850 μL	
(input volume)	(650 μL)	(650 μL)	(650 μL)	(650 μL)	(650 μL)	(1000 μL)	
Unit	Log IU/mL	Log IU/mL*1	Log IU/mL	Log IU/mL	Log copies/mL*2	Log copies/mL*2	

Table 1 Instrument, reagent, material and unit for the six assays

**Table 2** Four categories and interpretation of results for the six assays

			HBV (Log IU/mL)	HCV (Log IU/mL)	HIV-1 (Log copies/mL)	
	Not Detect	ed	Not Detected	Not Detected	Not Detected	
cobas 6800/8800		Below the Lower Limit*1	< 1.0	< 1.2	< 1.3	
(New)	Detected	Within the Linear Range*2	1.0 - 9.0	1.2 - 8.0	1.3 - 7.0	
		Above the Upper Limit*3	9.0 <	8.0 <	7.0 <	
	Not Detect	ed	Not Detected	Not Detected	Not Detected	
COBAS TagMan v2.0		Below the Lower Limit*1	< 1.3	< 1.2	< 1.3	
(Old)	Detected			1.3 - 8.2	1.2 - 8.0	1.3 - 7.0
		Above the Upper Limit*3	8.2 <	8.0 <	7.0 <	

<sup>\*1:</sup> Calculated value is below the lower limit of quantitation of the assay.

測定機器および専用試薬を用いて測定を行い、操作および判定方法は添付文書に従った。なお、判定値の比較についてはTable 2に示すように、「検出せず」、「検出(下限未満)」、「検出(定量範囲内)」および「検出(上限超)」の4種類に分類した。

#### 7) 統計処理

解析にはExcelアドインソフトStatcel 3<sup>14)</sup>を使用した。

#### 3. 成績

#### 1) 同時再現性

#### (1) 新HBV

HBV DNA 濃度の異なる4種類のプール血清を使用し 10回の重複測定を行った。4種類の試料の変動係数(以下、CV と略す)は、**Table 3**に示すように $0.00\sim3.50\%$ であった。

#### (2) 新HCV

HCV RNA 濃度の異なる4種類のプール血清を使用し10回の重複測定を行った。4種類の試料のCV は, Table 3 に示すように0.71~5.19%であった。

#### (3) 新HIV

HIV-1 RNA 濃度の異なる3種類のプール血漿を使用し 6回の重複測定を行った。3種類の試料のCVは, Table 3 に示すように1.50~13.72%であった。

#### 2) 希釈試験

#### (1) 新HBV

HBV DNA 高濃度プール血清をHBV DNA 陰性プール 血清にて5°希釈したものを試料とし、新HBV の希釈直 線性について調べた。5回測定した結果をFig. 1-aに示 した。高濃度プール血清原液の測定値の平均から理論値 を算出し、その理論値(x)と測定値(y)にて単回帰分

<sup>\*1:</sup> The unit of the HBV DNA cocentration had used "Log copies/mL" until about the end of 2016 (1 IU = 5.82 copies).

<sup>\*2:</sup> HIV-1 RNA cocentration transformed into common logarithm.

<sup>\*2:</sup> Calculated value is within the linear range of the assay.
\*3: Calculated value is above the upper limit of quantitation of the assay.

	col		/8800 HE =10 )	3V*1	col	oas 6800/ ( n=	/8800 HC :10 )	V*1	cobas 68	800/8800 ( n=6 )	HIV-1*2
Specimen	Α	В	С	D	E	F	G	Н	I	J	К
Mean	1.93	2.70	4.30	7.70	1.86	2.42	5.37	7.24	1.90	2.73	5.43
SD	0.067	0.000	0.000	0.000	0.097	0.079	0.048	0.052	0.261	0.137	0.082

5.19

3.26

0.90

0.71

13.72

5.00

1.50

Table 3 Within-run reproducibility for the three new assays

CV : coefficent of variation

3.50

CV (%)

0.00

0.00

0.00

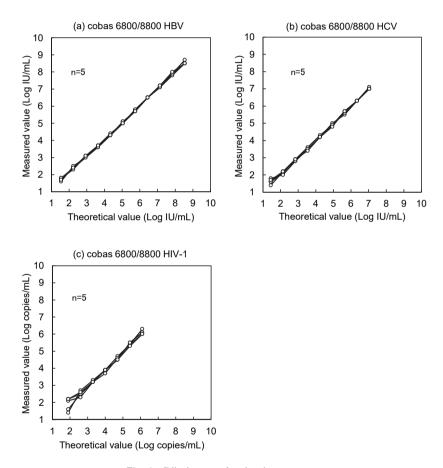


Fig. 1 Dilution test for the three new assays

<sup>\*1:</sup> The unit of each mean and standard deviation (SD) is "Log IU/mL".
\*2: The unit of each mean and standard deviation (SD) is "Log copies/mL".

析を行った。測定値が算出された $1.6\sim8.7$  Log IU/mLの55試料における決定係数は0.999, 回帰式はy=0.981x+0.149であった。添付文書に記載されている定量範囲内の $1.6\sim8.7$  Log IU/mLで直線性を認めた。

#### (2) 新HCV

HCV RNA 高濃度プール血清をHCV RNA 陰性プール血清にて5° 希釈したものを試料とし、新HCVの希釈直線性について調べた。5回測定した結果をFig. 1-bに示した。上記と同様に単回帰分析を行ったところ、測定値が算出された $1.4\sim7.1$  Log IU/mLの45試料における決定係数は0.998、回帰式はy=0.978x+0.096であった。添付文書に記載されている定量範囲内の $1.4\sim7.1$  Log IU/mLで直線性を認めた。

#### (3) 新HIV

HIV-1 RNA高濃度プール血漿をHIV-1 RNA 陰性プール血漿にて5° 希釈したものを試料とし、新HIVの希釈直線性について調べた。5回測定した結果をFig. 1-cに示した。理論値が1.90 Log コピー/mLと算出された1ポイント目の試料の測定値は、 $1.4\sim2.2$  Log コピー/mLの範囲でバラツキを認めた。そこで、1ポイント目の5試料の測定値を除き上記と同様に単回帰分析を行った。測定値が算出された $2.3\sim6.3$  Log コピー/mLの30試料における決定係数は0.993,回帰式はy=1.029x-0.194であった。添付文書に記載されている定量範囲内の $2.3\sim6.3$  Log コピー/mLで直線性を認めた。

#### 3) 新法旧法の比較

#### (1) HBV

HBV 感染患者の血清167検体を用いて、新HBVと旧HBVで測定を行った。

判定値の比較結果をFig. 2-aに示した。旧法では「検出せず」が38検体であったのに比し、新法では33検体と5検体減少した。また、旧法では「検出(定量範囲内)」が86検体であったのに比し、新法では93検体と7検体増加した。新法で「検出(上限超)」となった検体は認められなかった。

新法と旧法で判定が一致したのは129検体あり、その割合は77.2%(129/167)であった。新法と旧法において、判定結果が不一致となった検体は、以下の38検体であった。旧法で「検出せず」38検体中、新法で「検出(下限未満)」であったものは13検体、一方、新法で「検出せず」33検体中、旧法で「検出(下限未満)」であったものは8検体であった。また、旧法で「検出(下限未満)」39検体中、新法で「検出(定量範囲内)」であったものは8検体で、その測定値は1.0~2.7 Log IU/mLであった。一方、新法で「検出(下限未満)」41検体中、旧法で「検

出(定量範囲内)」であったものは5検体で、その測定値は $1.3\sim1.8 \log IU/mL$ であった。さらに、旧法で「検出(上限超)」4検体中、新法で「検出(定量範囲内)」であったものは4検体で、その測定値は $8.0\sim8.6 \log IU/mL$ であった。

新法と旧法でともに「検出(定量範囲内)」となった 81 検体の測定値の比較結果をFig. 2-b に示した。相関係 数は0.981、回帰式はy=0.990x + 0.059であった。

#### (2) HCV

HCV感染患者の血清151検体を用いて、新HCVと旧HCVで測定を行った。

判定値の比較結果をFig. 3-aに示した。旧法では「検出せず」が24検体であったのに比し、新法では21検体と3検体減少した。また、旧法では「検出(定量範囲内)」が113検体であったのに比し、新法では119検体と6検体増加した。

新法と旧法で判定が一致したのは138検体あり、その割合は91.4%(138/151)であった。新法と旧法において、判定結果が不一致となった検体は、以下の13検体であった。旧法で「検出せず」24検体中、新法で「検出(下限未満)」であったものは5検体、一方、新法で「検出せず」21検体中、旧法で「検出(下限未満)」であったものは2検体であった。また、旧法で「検出(下限未満)」14検体中、新法で「検出(定量範囲内)」であったものは6検体で、その測定値は1.2~1.5 Log IU/mLであった。新法と旧法でともに「検出(定量範囲内)」となった113検体の測定値の比較結果をFig. 3-bに示した。相関係数は0.996、回帰式はy=1.022x - 0.015であった。

#### (3) HIV

HIV-1感染患者の血漿83検体を用いて、新HIVと旧HIVで測定を行った。

判定値の比較結果をFig. 4-aに示した。旧法では「検出せず」が32検体であったのに比し、新法では33検体と1検体増加した。また、旧法では「検出(定量範囲内)」が35検体であったのに比し、新法では43検体と8検体増加した。

新法と旧法で判定が一致したのは66検体あり、その割合は79.5%(66/83)であった。新法と旧法において、判定結果が不一致となった検体は、以下の17検体であった。旧法で「検出せず」32検体中、新法で「検出(下限未満)」であったものは3検体、一方、新法で「検出せず」33検体中、旧法で「検出(下限未満)」であったものは6検体であった。また、旧法で「検出(下限未満)」16検体中、新法で「検出(定量範囲内)」であったものは6検体で、その測定値は1.3~1.7 Logコピー/mLであった。さらに、

(a)							
					Detected		
			Not Detected	Below the Lower Limit	Within the Linear Range	Above the Upper Limit	Total
BV	Not	Detected	25	8	0	0	33
300 H	- P	Below the Lower Limit	13	23	5	0	41
00/8i w HE	Detected	Within the Linear Range	0	8	81	4	93
cobas 6800/8800 HBV (New HBV)	ٔ مُ	Above the Upper Limit	0	0	0	0	0
cop		Total	38	39	86	4	167

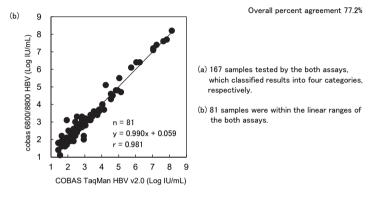
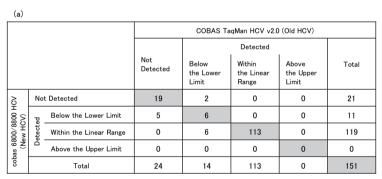


Fig. 2 Comparison of the results on the new HBV and the old HBV



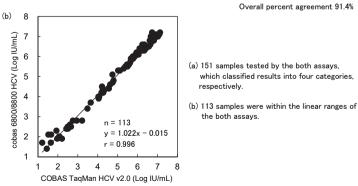


Fig. 3 Comparison of the results on the new HCV and the old HCV

旧法で「検出せず」32検体中,新法で「検出(定量範囲内)」であったものは2検体で,その測定値は1.6~1.8 Logコピー/mLであった。

新法と旧法でともに「検出(定量範囲内)」となった 35 検体の測定値の比較結果を**Fig. 4-b**に示した。相関係 数は0.979、回帰式はv=1.045x+0.104であった。

#### 4) 低濃度域におけるHIV患者3症例におけるHIV-1 RNA測定値の推移

3症例の低濃度域におけるHIV-1 RNA測定値の推移をFig. 5に示した。

症例1の新法と旧法の値は、初めほぼ一致しながら低下したが、600日以降では新法の測定値は、旧法の測定値より高めに推移する傾向が認められた。一方、症例2と症例3の新法と旧法の値は、「検出せず」、「<1.3 Logコピー/mL」および「 $1.3\sim1.6$  Logコピー/mL」の範囲でほぼ一致しながら推移した。

#### 4. 考察

当検査室では、2009年10月よりPCR検査用自動測定装置「TaqMan オート システムA」を使用してHBV DNA検査, HCV RNA検査およびHIV-1 RNA検査を行ってきた。今回、我々は「コバス6800システム」で測定可能な3項目の測定試薬を用いて、各々の性能を把握するため、旧法との比較検討を行った。なお、測定は日常検査と同じ検体量500  $\mu$  Lを用いて実施した。

新HBVは、同時再現性において旧HBV15)よりやや良 好であり、希釈試験の検討においては1.6~8.7 Log IU/ mLの範囲で良好な定量性を認めた。また、旧HBVと の測定値の比較においても、良好な相関関係を認めた。 新法と旧法の判定結果が不一致となった38検体のうち 旧法で「検出(上限超)」であった4検体を除く34検体 について臨床経過を調べたところ、22検体は核酸アナ ログ製剤による治療中の患者検体、3検体はペグインタ ーフェロン製剤による治療中の患者検体、1検体はイン ターフェロン製剤による治療歴のある患者検体. 8検体 はHBe抗原が陰性で経過観察中の患者検体であった。 また、上記34検体の測定結果においては、旧法で「検 出せず」や「<1.3 Log IU/mL」であった29検体中16 検体が, 新法で各々「<1.0 Log IU/mL」や「1.0~1.1 Log IU/mL」を示したことから、新法では測定範囲の 下限値が拡大されたことにより、一部の検体については 下限値未満での検出や定量範囲内での検出が可能になる のではないかと思われた。一方,旧法で「検出(上限超)」 すなわち8.2 < Log IU/mLであった4検体について臨床 経過を調べたところ、1検体はHBe抗原が陽性でウルソ

デオキシコール酸による治療中の患者検体、3検体は HBe抗原が陽性で経過観察中の患者検体であった。また、上記4検体の新法における測定結果は、「検出(定量範囲内)」すなわち8.0~8.6 Log IU/mLを示したことから、新法では測定範囲の上限値が拡大されたことにより、日常検査でも上限値を超える検体は減少するものと思われた。新法を用いることで、核酸アナログ製剤の投与によってHBV DNA量が速やかに低下するような症例やHBe抗原が陰性でHBV DNA量が多い症例、またはHBe抗原が陽性でHBV DNA量が多い症例などにおいては、旧法よりもウイルス量の詳細な推移を経過観察することが可能になると思われた。

新HCVは、同時再現性において旧HCV12)とほぼ同等 の範囲で良好な定量性を認めた。また、旧HCVとの測 定値の比較においても、良好な相関関係を認めた。新法 と旧法の判定結果が不一致となった13検体について臨床経 過を調べたところ、6検体はインターフェロン製剤をベース にした直接作用型抗ウイルス薬 (direct acting antivirals: 以下、DAAと略す)による治療中の患者検体、6検体は DAAのみによる治療中の患者検体、1検体はアラニンアミ ノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase: ALT) 正常の持続感染患者検体であった。また、上記13検体 の測定結果は、旧法で「検出せず」や「<1.2 Log IU/ mL」であった13検体中11検体が、新法で各々「<1.2 Log IU/mL」や「1.2~1.5 Log IU/mL」を示したことか ら、僅かながら新法の方が下限値未満での検出や定量範 囲内での検出がより可能になったのではないかと思われ た。インターフェロン製剤をベースとした治療では、治 療開始後4週時点のHCV RNA検査で「検出せず」であ ること (rapid virological response:以下, RVRと略す) が、HCV RNAが持続的に治療終了後も検出されないこ と (sustained virological response:以下, SVRと略す) に寄与すると報告されている20。今回, 新法のほうが僅 かに検出しやすくなったことで、治療開始後4週時点の 検査結果がこれまでのように「検出せず」とはならず. RVR判定がSVRの寄与因子として機能しなくなるので はないかと思われた。しかし、新法と旧法のRVR判定 率は統計学的には同等であること 6.16) や現在標準的な治 療法となっているDAA治療においては、RVR判定と治 療効果には関連性がないことが報告されている16)こと から、新法を旧法と同様に日常検査として使用すること に問題はないと思われた。

新HIVは、同時再現性において旧HIV $^{17.18}$ とほぼ同等であり、希釈試験の検討においては $2.3\sim6.3$  Logコピー

				COBAS TaqMan HIV-1 v2.0 (Old HIV)					
			Not Detected	Below the Lower Limit	Detected Within the Linear Range	Above the Upper Limit	Total		
<u>-</u>	Not Detected		27	6	0	0	33		
6800/8800 HIV-1 (New HIV)	Below the Lower Limit		3	4	0	0	7		
00/88 w HI	Detected	Within the Linear Range	2	6	35	0	43		
)89 se	ŏ.	Above the Upper Limit	0	0	0	0	0		
cobas		Total	32	16	35	0	83		

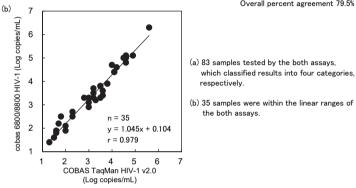


Fig. 4 Comparison of the results on the new HIV and the old HIV

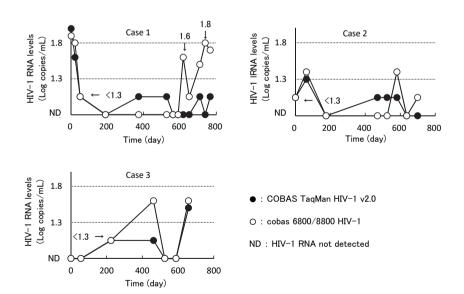


Fig. 5 Changes in HIV-1 RNA low-levels for the three cases of HIV-1 infection

/mLの範囲で良好な定量性を認めた。また,旧HIVとの測定値の比較においては,良好な相関関係を認めた。新法と旧法の判定結果が不一致となった17検体について臨床経過を調べたところ,いずれも抗HIV薬による治療中の患者検体であった。また,上記17検体の測定結果は,旧法で「検出せず」や「<1.3 Log 2 ピー/mL」であった17検体中11検体が,新法で各々「<1.3、1.6~1.8 Log 2 ピー/mL」を「1.3~1.7 Log 2 ピー/mL」を示したことから,僅かながら新法の方が下限値未満での検出や定量範囲内での検出がより可能になったのではないかと思われた。

今回、3項目について検討を行った結果、新HBVは 旧法より良好な性能を有し、新HCVおよび新HIVは旧 法とほぼ同等な性能を有していることを確認した。しか しながら、新HIVについては、2 Logコピー/mL未満に おいて同時再現性のCVが13.72%であったことや希釈試 験の検討において2.3 Logコピー/mL未満でバラツキを 認めたことから、新HBVや新HCVに比べ低濃度域にお ける測定値にバラツキが生じやすいことを確認した。福 武は、以前よりコバス TaqMan HIV-1 v2.0法 (旧HIV) を含むどのHIV-1 RNA測定試薬においても、低濃度域 での測定値の再現性を示すCVが大きいため、1回の測 定結果から正確な判断を下すことは難しく、病態の解析 については十分な注意が必要であることを報告してい た<sup>18)</sup>。また、今回、症例ごとにHIV-1 RNA 測定値の推 移を観察したところ,一部の症例では新法の測定値が旧 法の測定値よりも若干高めに推移する傾向にあることも わかった。試薬発売から約1年後にロシュより、旧法で 「検出せず」あるいは「<20コピー/mL(<1.3 Logコ ピー/mL)」と測定された検体の一部では、新法で20~ 200コピー/mL (1.3~2.3 Logコピー/mL) に測定され る場合があるとの報告があった19)。この報告内容は、今 回の検討結果と一致するものであるが、2.3 Logコピー/ mL未満でバラツキが生じやすいことを考慮すると、日 常検査では再検査を行う必要があると思われた。現在、 HIV 感染症に対する治療の目標は、原則 HIV-1 RNA 量 を検出限界以下に抑え続けることである3。また、抗 HIV薬の変更を考慮する目安は、HIV-1 RNA量が2回 以上連続して200コピー/mL (2.3 Logコピー/mL) 以 上検出された場合となっている3)。このため、旧法と同 様に新法を日常検査として使用することに問題はない が、今後、新HIVについては、低濃度域における測定 値のバラツキが改善されることが望まれる。

#### 5. 結論

3項目の測定試薬を用いて各々の性能を把握するため、旧法との比較検討を行った結果、「コバス6800/8800システムHBV」は旧法より良好な性能を有し、「コバス6800/8800システムHCV」および「コバス6800/8800システムHIV-1」は旧法とほぼ同等な性能を有していることを確認した。また、測定時間が短縮されたことによって迅速な結果報告も可能となり、日常検査として有用な測定法であると思われた。

なお、本論文の一部は、日本臨床検査自動化学会第49 回大会(2017年9月横浜)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) 日本肝臓学会肝炎診療ガイドライン作成委員会. B型肝炎治療ガイドライン (第3.1版). 2019.
- 2) 日本肝臓学会肝炎診療ガイドライン作成委員会. C型肝炎治療ガイドライン (第6.2版). 2018.
- 3) 日本エイズ学会 HIV 感染症治療委員会. HIV 感染症 「治療の手引き」(第22版). 2018.
- 4) ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社. HIV-1 RNA 検査に関するお知らせ vol.3. 2010.
- 5) 松岡優, 丸山裕美, 奥村志乃ほか. コバス TaqMan HIV-1 検査に用いる血漿検体中の細胞成分による偽 陽性反応の検討. 医学検査 2013;62:550-555.
- 6) 菅原昌章, 佐々木彩乃, 南口絵美ほか. HBV DNA 測定試薬コバス6800/8800システムHBVおよびHCV RNA測定試薬コバス6800/8800システムHCVにお ける既存測定法との基礎的性能評価. 医学と薬学 2016:73:1329-1339.
- 7) 目崎和久, 照屋勝治, 永井正樹ほか. 新たに開発されたコバス6800/8800システムHIV-1の検討. 医学と薬学2016;73:705-709.
- Maasoumy B, Bremer B, Lehmann P, et.al. Commutability and concordance of four hepatitis B virus DNA assays in an international multicenter study. Therapeutic Advances in Gastroenterology 2017;10:608-618.
- 9) Vermehren J, Stelzl E, Maasoumy B, et.al. Multicenter Comparison Study of both Analytical and Clinical Performance across Four Roche Hepatitis C Virus RNA Assays Utilizing Different Platforms. Journal of Clinical Microbiology 2017;55:1131-1139.
- 10) Tan NK, Carrington D, Pope CF. Verification of the Roche cobas<sup>®</sup> 6800 PCR 200 μ1 and 500 μ1 protocols for the quantification of HIV-1 RNA, HBV

- DNA and HCV RNA and evaluation with COBAS® Ampliprep/COBAS® TaqMan® assays. Journal of Medical Microbiology 2018;67:1711-1717.
- 11) 佐々木沙耶, 佐藤繁樹, 狩野吉康ほか. HBV DNA 測定試薬コバス TaqMan HBV 「オート」 v2.0 における 既存測定法との比較検討. 医学と薬学 2009;61:787-795.
- 12) 佐々木沙耶, 谷村絵美, 佐藤繁樹ほか. HCV RNA 測定試薬コバス TaqMan HCV「オート」v2.0 におけ る既存測定法との基礎的性能評価. 医学と薬学 2013;70:669-678.
- 13) 福武勝幸, 岡慎一, 味澤篤ほか. 新たに開発された コバス TaqMan HIV-1「オート」v2.0の検討. 医療 と検査機器・試薬 2011;34:189-195.
- 14) 柳井久江. 4Stepsエクセル統計(第3版). (有)オーエムエス出版;埼玉, 2011.

- 15) 丸山裕美,新井幸枝,松岡優ほか、コバスTaqMan HBV「オート」v20の基礎検討. 埼臨技会誌 2009;56: 205-205.
- 16) 鈴木文孝, 鈴木義之, 芥田憲夫ほか. DAAs治療中 における HCV RNA 測定試薬コバス 6800/8800 シス テム HCV と既存法コバス TaqMan HCV「オート」 v2.0 との分析学的性能および臨床的性能の検討. 医 学と薬学 2018:75:1071-1078.
- 17) 奥村志乃, 丸山裕美, 新井幸枝ほか. コバス Taq-Man HIV-1「オート」v2.0 の基礎検討. 埼臨技会誌 2011;58:261-261.
- 18) 福武勝幸. 低レベルHIVウイルス血症の評価と検査方法の変遷. HIV感染症とAIDSの治療 2012;3:47-53.
- ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社. HIV-1 RNA 量検査に関する重要なお知らせ. 2018.

## 脳梗塞症例を対象としたBNPおよび D-dimerの臨床的有用性に関する検討

Clinical Usefulness of BNP and D-dimer in Patients with Cerebral Infarction

小澤優貴 大塚喜人

**要 旨** 脳梗塞(Cerebral Infarction:CI)が疑われた患者を対象にBNP, D-dimerの有用性を後方視的に検討した。2015年1月から2018年12月の期間中にBNP, D-dimerの測定が可能であった760例を対象にCIとの関連性を評価した結果, CI:659例, non-CI:101例であり, CIではBNP, D-dimerが高値を示した。特に, 心原性脳塞栓症(cardioembolic infarction:CE)では両項目ともに著明な上昇を認め、BNPはCIとCE, D-dimerはCEに関連する独立変数であった。ROC-AUC解析の結果, BNPおよびD-dimerのAUCはそれぞれ0.700, 0.599であり, CEを結果因子とした場合は0.876, 0.698であった。NIHSS scoreとの相関は両項目とも有意に正の相関性が認められた。BNP, D-dimerはCEの判別や重症度の補助診断に有用と考えられ、特にBNP高値はCIと強い関連性がある可能性が示唆された。

**Abstract** The usefulness of BNP and D-dimer was examined retrospectively in patients with suspected cerebral infarction (CI). As a result of evaluating the relevance to CI in 760 patients who were able to measure BNP and D-dimer during the period from January 2015 to December 2018, CI: 659 cases, non-CI:101 For example, CI showed high values for BNP and D-dimer. In particular, cardioembolic infarction (CE) showed marked increases in both items, BNP was CI and CE, and D-dimer was an independent variable related to CE. As a result of ROC-AUC analysis, the AUC of BNP and D-dimer were 0.700 and 0.599, respectively, and 0.876 and 0.698 when CE was the outcome factor. The correlation with NIHSS score was significantly positive for both items. BNP and D-dimer are considered to be useful for CE discrimination and auxiliary diagnosis of severity. In particular, high BNP levels may be strongly related to CI.

Key words CI, CE, NIHSS score, BNP, D-dimer

#### 1. 序文

脳卒中は脳血管の閉塞や破綻による局所的な脳血流遮断によって突然の神経脱落症状を生じる疾患群であり、国内の死因上位を占める脳卒中の約60%は脳梗塞(Cerebral Infarction: CI)であったとされている。近年、画像検査を始めとした医療診断機器の進歩によりCIの診断技術は大きく向上しているが、これら画像検査に血液バイオマーカーを用いることができれば、迅速かつ的確な診断と治療方針の選定に大きく役立つ可能性があ

る。CIに対する血液バイオマーカーの研究は早期診断や予後予測について様々な報告がなされており $^{1,2,3}$ , 今回我々は、ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド(brain natriuretic peptide:BNP)およびD-dimerに着目し、CIとの関連性について後方視的に検討した。

#### 2. 対象および方法

#### 1) 対象

2015年1月から2018年12月の期間中, 救急外来受診時に CIを疑われ, 初期診療時または入院時にBNP, D-dimerの

Received Nov. 25, 2019; Accepted Mar. 16, 2020 Yuki OZAWA, Yoshihito OTSUKA 医療法人鉄蕉会 亀田総合病院臨床検査部 〒296-8602 千葉県鴨川市東町929番地 Department of Clinical Laboratory, kameda medical Center, 929 higashicho,Kamogawa City, Chiba Prefecture 296 8602

Corresponding author: 小澤 優貴

TEL: 04-7092-2211(内線6074) FAX: 04-7099-1196

E-mail: ozawa.yuki@kameda.jp

測定が可能であった760例を対象とした。本検討は亀田総合病院臨床研究倫理委員会の承認(承認番号:19-039)を得て実施した。

#### 2) 方法

#### (1) 測定および原理

BNPの測定原理は、2サイトサンドイッチ法による化学発光免疫測定法であり、機器・試薬はケミルミ ADVIA Centaur CPおよびケミルミBNP(シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社)を用いて行った。測定範囲上限を超えた場合には用手的希釈後に測定した。D-dimerの測定はラテックス免疫比濁法を原理とした全自動血液凝固測定装置CS-5100とリアスオートTM・Dダイマーネオ(シスメックス社)を使用した。(2) 検討方法

電子カルテの診療記録より、年齢、性別、BNP (pg/ mL), D-dimer (μg/mL), Cre (mg/dL), eGFR (ml/ min/1.73m2), CRP (mg/dL) の検索と, 心房細動 (Atrial fibrillation: Af) ならびに心不全 (Heart failure: HF) の有無を調査し、症例背景の評価を行った。af、HFの 有無は初期診療時から入院加療中に検出された場合を有 とした。結果は年齢,血液検査項目を中央値(四分閾値), その他項目を例数(%)で示した。臨床的検討として、 BNPおよびD-dimerを用いてCI群とnon-CI群、各臨床 病型による分類、組織プラスミノーゲンアクチベーター (rt-PA) 適応例と非適応例の中央値を比較し、従属変 数をCIおよびCEの有無、独立変数を年齢、性別、各血 液検査項目とした多変量解析を実施した。また、Afと Hfを保有する症例を考慮し、それらを除外した症例と Propensity Score Matchingにより選出された症例につ いても多変量解析を行った。対象となった症例は救急科 または神経内科の医師によって臨床所見や各種検査を総合的に評価され、それぞれの分類を診療記録に基づいて行った。鑑別性能の評価としてROC曲線下面積(receiver operating characteristic-area under the curve: ROC-AUC), 感度(%)・特異度(%)、オッズ比(95% Confidence interval)を算出し、NIHSS scoreの抽出が可能であった症例については、BNPおよびD-dimerとの相関性を検討した。

#### (3) 統計学的手法

対応のない対象群の比較であり正規性の仮定を必要としないことから、2群間の有意差比較には $\chi^2$ 検定、Mann-Whitney U検定、3群間以上の場合にはSteel-Dwass 法による多重比較検定を行った。多変量解析には2項ロジスティックス回帰分析を用いた。また、相関性の検討はノンパラメトリック検定としてSpearmanの順位相関係数によって解析を行い、有意水準5%未満を統計学的有意差ありと判断した。なお、全てのデータ解析に株式会社社会情報サービスのエクセル統計を使用した。

#### 3. 成績

#### 1) 症例背景

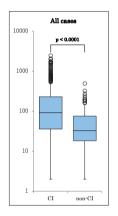
症例背景を Table 1 に示す。対象患者760名の内訳は、男性:453名(59.6%)、平均年齢76歳(68-82)、女性:307名(40.4%)、平均年齢82歳(74-88)であり、CI群659例(86.7%)、non-CI群101例(13.3%)であった。臨床病型はアテローム血栓性脳梗塞(atherothrombotic infafction:AT群)221例(33.5%)、ラクナ梗塞(lacunar infafction:LI群)79例(12.0%)、心原性脳塞栓症(cardioembolic infarction:CE群)256例(38.9%)その他脳梗塞(stroke of other determined etiology:

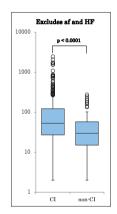
	~						
	all (n=760)	CI (n=659)	non-CI (n=101)	p-value			
Age (Quartile range)	78(69-85)	79(70-85)	75(64-82)	0.0005			
Male n(%)	453(59.6)	385(58.4)	68(67.3)	0.0894			
af n(%)	201(26.4)	186(28.2)	15(14.8)	0.0045			
HF n(%)	68(9.0)	66(10.0)	2(2.0)	0.0084			
BNP (pg/mL)	77.0(31.3-201.5)	92.5(36.0-230.3)	32.9(18.3-75.5)	p<0.0001			
D-dimer (µg/mL)	1.2(0.5-2.8)	1.2(0.5-3.0)	0.9(0.3-1.6)	0.0014			
Cr (mg/dL)	0.83(0.66-1.04)	0.83(0.66-1.05)	0.82(0.65-1.01)	0.4160			
eGFR (ml/min/1.78m2)	62.2(48.8-77.4)	61.8(48.4-76.4)	69.1(52.1-81.5)	0.0245			
CRP (mg/dL)	0.17(0.07-0.67)	0.17(0.07-0.66)	0.18(0.08-0.67)	0.7346			

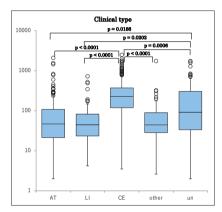
Table 1 Case background

	all (n=190)	CI (n=95)	non-CI (n=95)	p-value
Age (Quartile range)	78(69-82)	80(74-84)	74(64-82)	0.0003
Male n(%)	117(61.5)	55(57.9)	62(65.3)	0.2965
af n(%)	26(13.7)	13(13.7)	13(13.7)	-
HF n(%)	4(2.0)	2(2.0)	2(2.0)	-
BNP (pg/mL)	53.9(23.2-116.5)	78.0(32.8-169.9)	32.9(16.8-64.3)	p<0.0001
D-dimer (µg/mL)	1.1(0.5-2.3)	1.4(0.7-2.8)	0.9(0.3-1.6)	0.0014
Cr (mg/dL)	0.81(0.63-1.01)	0.77(0.62-1.01)	0.83(0.65-1.00)	0.6124
eGFR (ml/min/1.78m2)	67.9(51.1-80.7)	67.8(50.5-82.4)	68.2(53.7-79.7)	0.9684
CRP (mg/dL)	0.21(0.08-0.80)	0.29(0.07-0.98)	0.18(0.09-0.68)	0.5333

Table 2 Case background extracted by Propensity Score Matching







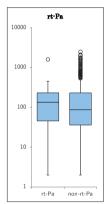
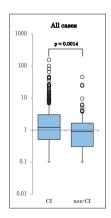
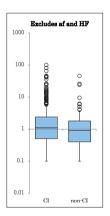
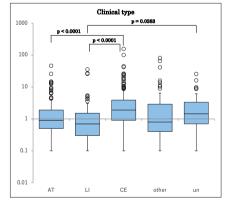


Fig. 1 [a] Comparison of median BNP by category







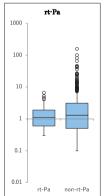


Fig. 1 [b] Comparison of median D-dimer by category

**Table 3** Multivariate analysis by logistic regression analysis

CI vs non-CI (n=760)	Partial regression coefficient	Standart error	Odzz ratio	95% Confidence interval	p-value
Age	0.0220	0.0049	1.0223	1.0124-1.0322	p<0.0001
Distinction by sex	-0.1420	0.2304	0.8676	0.5523-1.3629	0.5377
Af	-0.1133	0.3457	0.8929	0.4534-1.7582	0.7431
HF	0.2488	0.7889	1.2825	0.2733-6.0193	0.7524
BNP	0.0062	0.0017	1.0062	1.0028-1.0096	0.0004
D-dimer	0.0106	0.0181	1.0107	0.9755-1.0472	0.5567
Cr	-0.0608	0.1076	0.9410	0.7620-1.1620	0.5723
eGFR	-0.0032	0.0039	0.9968	0.9891-1.0045	0.4187
CRP	-0.0415	0.0405	0.9594	0.8862-1.0385	0.3050
CE vs non-CI (n=357)					
Age	-0.0030	0.0067	0.9970	0.9840-1.0103	0.660
Distinction by sex	-0.6847	0.3177	0.5042	0.2705-0.9400	0.0312
Af	1.3885	0.3725	4.0090	1.9320-8.3192	0.000
HF	0.2050	0.8172	1.2275	0.2474-6.0908	0.8019
BNP	0.0118	0.0021	1.0118	1.0076-1.0161	p<0.000
D-dimer	0.0345	0.0259	1.0351	0.9838-1.0891	0.183
Cr	-0.2350	0.1998	0.7906	0.5344-1.1696	0.2398
eGFR	-0.0053	0.0053	0.9947	0.9844-1.0051	0.3160
CRP	-0.0136	0.0587	0.9865	0.8793-1.1069	0.8176
CE vs AT,LI,other,un (n=659)					
Age	-0.0090	0.0045	0.9911	0.9825-0.9998	0.0448
Distinction by sex	-0.3849	0.2127	0.6806	0.4485-1.0326	0.070
Af	2.9575	0.2551	19.2500	11.6766-31.7356	p<0.000
HF	0.9462	0.4388	2.5758	1.0898-6.0877	0.0311
BNP	0.0015	0.0004	1.0015	1.0007-1.0023	0.0002
D-dimer	0.0308	0.0126	1.0312	1.0061-1.0570	0.014
Cr	-0.3449	0.1152	0.7083	0.5651-0.8877	0.002
eGFR	-0.0074	0.0041	0.9926	0.9846-1.0007	0.073
CRP	-0.0259	0.0408	0.9744	0.8996-1.0556	0.525

other群) 49例 (7.4%), 分類不能の脳梗塞 (stroke of undetermined etiology: un群) 54例 (8.2%) であった。 CI群659例のうち186例 (28.2%) はAf, 66例 (10.0%) はHFを指摘されており、CI群ではnon-CI群と比較してこれら心疾患の合併率は有意に高値を示した (p=0.0045, p=0.0084)。血液項目ではCI群のBNP, D-dimerで有意に高値を示し (p<0.0001, p=0.0014), eGFRでは有意に低値を示した (p=0.0245)。 Propensity Score Matchingにより選出された症例は190例であり、年齢、BNP、D-dimerで有意差を認めた (Table 2)。

#### 2) 各分類による中央値の比較

CI群のBNPは92.5(36.0-230.3), D-dimerは1.2(0.5-3) であり、non-CI群と比較して有意に高値を示した (p<0.0001、p=0.0014)。AfおよびHFを有する症例を除外した場合、BNP 52.8 (28.2-122.8)、D-dimer 1.1 (0.5-2.4) となり、BNPのみ有意に高値であった (p<0.0001、p=0.0781)。各臨床病型では、CE群のBNP 226.4 (118.3-369.3)、D-dimer 1.9 (0.9-3.9) で著明な上昇を示した (p<0.0001)。rt-PA静注療法の適応症例と非適応症例の中央値を比較したところ、共に有意差は認められなかった (Fig. 1[a]、Fig. 1[b])。

#### 3) 多変量解析

各項目の多変量解析からオッズ比を求めた結果, CI では年齢1,0223 (1,0124-1,0322 p<0,0001) と BNP 1,0062 (1,0028-1,0096 p=0,0004) に有意な影響を認めた。 AfおよびHfを除外した542症例と Propensity Score Matching によって抽出された190症例の検討でも同様の結果が得

**Table 4** Multivariate analysis of cases extracted by propensity score matching

Cl vs non-Cl (n=190)	Partial regression coefficient	Standart error	Odzz ratio	95% Confidence interval	p-value
Age	0.0293	0.0144	1.0297	1.0012-1.0591	0.0412
Distinction by sex	-0.1312	0.3519	0.8770	0.4400-1.7481	0.7092
Af	-1.2412	0.6444	0.2890	0.0817-1.0220	0.0541
HF	-1.7505	1.6165	0.1737	0.0073-4.1280	0.2789
BNP	0.0075	0.0022	1.0076	1.0032-1.0120	0.0007
D-dimer	0.0143	0.0264	1.0144	0.9631-1.0683	0.5895
Cr	-0.4871	0.5744	0.6144	0.1993-1.8942	0.3965
eGFR	-0.0002	0.0084	0.9998	0.9834-1.0165	0.9804
CRP	-0.0191	0.0684	1.0193	0.8915-1.1655	0.7797

 Table 5
 Comparison of differential performance between CI and clinical types

comparison	Sample Size	Markers in Panel	Cut off	Sensitivity/Specificity(%)	Odds ratio	95% Confidence interval
Cl vs non-Cl	760	BNP	60.7	60.6/72.3	4.0010	2,5186-6,3558
CI VS non-CI	100	D-dimer	1.1	56.6/57.4	1.7591	1.1519-2.6866
Cl vs non-Cl	760	BNP	18.4	88.5/25.7	2.6593	1.6032-4.4111
CI vs non-Ci	160	D-dimer	0.5	79.2/31.7	1.7671	1.1161-2.7977
AT vs non-CI	322	BNP	33.9	63.8/50.5	1.7978	1.1159-2.8962
AT VS HOR-CI	322	D-dimer	1.2	44.3/62.4	1.3209	0.8156-2.1394
LI vs.non-CI	180	BNP	33.3	63.3/50.5	1.7586	0.9640-3.2083
LI VS non-CI	180	D-dimer	1.1	38.0/57.4	0.8258	0.4525-1.5073
CE vs non-CI	357	BNP	102.4	78.5/84.2	19.4148	10.5306-35.7942
GE VS NOTI-GE	301	D-dimer	1.3	62.1/66.3	3.2301	1.9911-5.2401
other us non-Cl	150	BNP	32.2	69.4/48.5	2.1359	1.0375-4.3971
other vs non-ci	150	D-dimer	1.3	49.0/66.3	1.8918	0.9434-3.7933
un vs non-Cl	155	BNP	79.0	55.6/76.2	4.0104	1.980-8.1224
un vs num-cr	153	D-dimer	1.1	61.1/57.4	2.1196	1.0798-4.1607
CE vs AT.Li.other.un	959	BNP	113.9	76.6/76.2	10.4465	7.2231-15.1085
CL 13 AT, LI, other, on	003	D-dimer	1.1	71.5/52.9	2.8103	2.0114-3.9265
CI vs non-CI	760	BNP,D-dimer	60.7 , 1.1	75.6/46.5	2.6922	1.7522-4.1364
CE vs non-CI	357	BNP,D-dimer	102.4 , 1.3	88.7/58.4	10.9959	6.3242-19.1185
CE vs AT.LI,other.un	659	BNP,D-dimer	113.9,1.1	91.0/44.9	8.2595	5.1560-13.2311

られた。CEでは、Af 4.0090 (1.9320-8.3192 p=0.0002) の 有無、BNP 1.0118 (1.0076-1.0161 p<0.0001) が有意な独立 変数として抽出され、D-dimer は各病型分類に関連した 独立変数であった(**Table 3、Table 4**)。

#### 4) ROC-AUC解析

BNP およびD-dimer の ROC-AUC はそれぞれ0.700, 0.599であり、Propensity Score Matching によって選択された190症例では0.696, 0.634であった(Fig. 2)。BNPのcut off値を ROC-AUC 解析より算出した60.7に設定した場合、感度 60.5、特異度 72.3、オッズ比 4.001 (2.519-6.356)を示し、当院の基準範囲上限値である18.4で求めた場合は感度 88.5、特異度 25.7、オッズ比 2.659(1.603-4.441)であった。D-dimer はcut off値 1.1で感度 56.6、特異度 57.4、オッズ比 1.759(1.152-2.687)、cut off値 0.5で感度 79.2、特異度 31.7、オッズ比1.767(1.116-2.798)であった。各臨床病型では、各分類に比較してCE群で良好な結果を示した(Table 5)。

#### 5) BNP, D-dimerとNIHSS scoreの相関性

NIHSS score の抽出が可能であった244例について相関性を検討した (Fig. 3[a], Fig. 3[b])。BNPではy=0.01x+8.3485, 相関係数x=0.400, D-dimerではy=0.1288x+9.9423 相関係数x=0.284であり、両項目とも有意に正の相関関係が認められた(x=0.0001)。臨床病型による比較では、CE群のみBNPで相関係数x=0.366, D-dimerで相関係数x=0.267と有意な正の相関関係を認めた

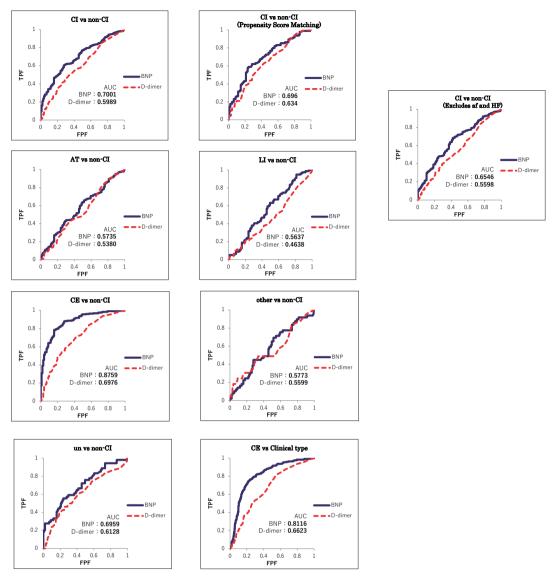


Fig. 2 AUC evaluation of BNP and D-dimer using ROC curve

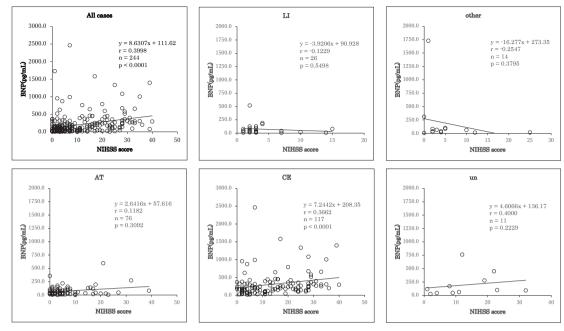


Fig. 3 [a] Correlation between BNP and NIHSS score

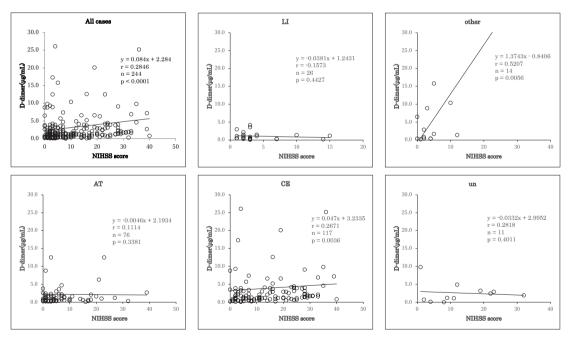


Fig. 3 [b] Correlation between D-dimer and NIHSS score

 $(p<0.0001, p=0.0036)_{\circ}$ 

#### 4. 考察

CIは血管内腔の狭窄や閉塞による大脳の低灌流によって引き起こされ、病巣あるいはその周囲からタンパク質が漏出、分泌されるとともに、エネルギー不全や酸化ストレス、微小血管傷害、凝固・線溶反応の活性化、炎症および最終的な壊死を含む結果として、神経、グリア細胞、血管内皮細胞の壊死をもたらすものである4。これら脳血管障害では多数の基礎疾患を有していること、障害される部位によって多種多様の症状を呈すること、梗塞性または出血性の病変など病態の障害因子が単一でないことが多く、診断に苦慮する場合も少なくない。

今回、CIが疑われた症例を対象にBNPおよびD-dimer の検討を行った結果、CI群の臨床的背景として28.2%に Af, 10.0%にHFを合併しており、BNP 76.95pg/mL、 D-dimer 1.2 μ g/mLと有意に上昇していることが確認さ れた。BNPは環状構造を有する32個のアミノ酸残基に よって構成されるペプチドホルモンであり、心室壁への 容量・圧負荷が刺激となって、左心室拡張末期圧上昇や 心拍出量低下と相関して著明に増加する。そのため、 HF診断や重症度、リスク評価を反映する血液バイオマ ーカーとして広く知られているが、Afの存在<sup>5,6)</sup>や高年 齢化、腎不全等<sup>7)</sup>がBNP値を上昇させるとの報告もあ る。D-dimer は血栓形成と線溶反応を反映し、凝固系統 の亢進や血栓塞栓症などフィブリン血栓の形成に付随し 上昇する。CI群では腎機能の悪化が懸念されるが, eGFRとBNPに関する報告®に照らした場合。eGFR値 から推定される腎機能低下の影響は少ないと考えられ、 さらに、今回の対象患者による病型分類ではCEが最も 多いことから、CIの発症とBNP、D-dimerの上昇には AfならびにHFの合併が関与していると考えられた。

CIと血液検査の関連性については、これまでにいくつかの報告がなされている<sup>1,2,3)</sup>。Hasanら<sup>9)</sup>のメタ解析では、CRP、P-セレクチン、ホモシステインがCI患者と健常者の鑑別するマーカーであり、GFAPがCIと脳出血を鑑別するマーカーであったと報告している。Montanerら<sup>10)</sup>は、707名のCI患者を対象とした血液バイオマーカーの研究で、CE患者のBNPとD-dimerが上昇していることを報告した。各分類による中央値を比較すると、CI群のBNP、D-dimerの両項目ともnon-CI群と比較して有意に高値であり、過去の報告を支持する結果であった。特にBNPではAfおよびHFの影響で高値を示すことから、それらを除外した症例による検討でも有意に高値であり、さらに、Propensity Score Matching

によって選出された症例での多変量解析においても有意 な関連因子であった。しかし、非循環器疾患において BNPが上昇するメカニズムは明らかでなく、Afあるい はHFをはじめとした潜在的な心疾患の存在がBNP上 昇に寄与したものと考えられる。CIの臨床病型は適切 な治療を行う上で極めて重要であり、特にCEは広範囲 の梗塞巣を生じ、再発率・死亡率が高く、予後不良であ ると報告されていることから11),速やかに分類を行う必 要がある。CEではBNP 226.4, D-dimer 1.9と著明な上 昇を認めており、CIの病型分類、特にCEとの鑑別に有 用とする報告<sup>12,13)</sup>とも一致していることから、BNPお よびD-dimerの測定が抗凝固療法や抗血小板療法など 治療法の選定にも役立つと考えられた。さらに、有意差 は認めなかったものの、rt-PA静注療法が可能な発症4.5 時間以内の超急性期CI症例においてBNPの上昇が確認 された。

Whiteleyら<sup>14)</sup>は、CI診断に有用と考えられた90%以 上の感度を示す5個のマーカーと、90%以上の特異度を 示した14個のマーカーを報告した。一方、診断性能に 限界のある単一マーカーよりも、複数のマーカーを組み 合わせたマルチマーカーによる検討も行われている15)。 BNP, D-dimer, MMP-9, S100 ßを含むマルチマーカ ーは、脳卒中の同定に感度86%、特異度37%、虚血性脳 卒中に限定すると、感度73%、特異度72%で健常者との 区別が可能であったのに対し、caspase-3、D-dimer、 MMP-9、sRAGEなど6種類の蛋白を用いた検討では感 度98%, 特異度17%であったと報告した<sup>16)</sup>。これまでに 研究されたCIのバイオマーカーは、測定の標準化や結 果確認までの迅速性など実用化に多くの課題があるが、 今回用いたBNPおよびD-dimerは、測定操作が比較的 簡便で測定精度・再現性が高く、より早期に結果を確認 することができるため、多くの施設で導入・測定されて いる。鑑別性能に関する検討では、BNPのROC-AUC が0.700、感度60.5%、特異度72.3%を示し、cut off値を 18.4pg/mLに定めた場合, 感度は85%以上を示したが特 異度は著明に低下した。D-dimerのAUCは0.599、感度 56.6%, 特異度57.4%であり, cut off値を0.5 μ g/mLに 定めた場合でも、感度は80%未満であった。対して、 CEを結果因子とした場合, BNPのAUCが0.876, D-dimerでは0.698とCIの鑑別より高い精度でCEを区 別できると考えた。

NIHSS score は脳卒中症状の重症度を反映し、CEでは灌流域全域に虚血をきたし致命的もしくは重度の機能障害を残す可能性が高い。BNPおよびD-dimerはCI群ならびにCEのNIHSS score と有意な正の相関関係を認

め、神経重症度<sup>17)</sup> や院内死亡<sup>7)</sup> の予測マーカーに有用とする報告もあることから、CIを疑う症例に対する測定 意義は大きいと考える。

本検討の主な限界として、検査データを診療記録より 抽出しているため、初期症状から検体採取、血液検査ま での時間が統一されていないこと、D-dimer は同一固体 であっても採取条件によって検査値に変動を来す可能性 があること、AfおよびHF以外の心疾患やバイタルサイ ンなどの情報が不十分なことである。また、CIであっ た659症例のNIHSS scoreを全症例で抽出できなかった ことに検討の限界を認めた。

#### 5. 結語

CIではBNPおよびD-dimerの上昇が認められた。 BNPはD-dimerと比較して、臨床病型におけるCEの判別や重症度の補助診断を行う上でより優れた血液マーカーであると考えられた。

本論文の要旨は、日本臨床検査自動化学会第50回大会(2018年9月神戸)において発表し、"JJCLA"編集委員会より学会誌掲載候補論文として推薦された。

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。

#### 対 献

- 1) 鈴木一夫, 北園孝成. CIのバイオマーカー探索研究 REBIOS (Research for Biomarkers in Ischemic Stroke) における成果と今後-Biomarkerを用いた reverse translational reserchを中心に-. 日薬理誌 2011;137:247-249
- Tokami H, Ago T, Sugimori H et al. REBIOS Investigators: RANTES has a potential to play a neuroprotective role in an autocrine/paracrine manner after ischemic stroke. Brain Res 2013;1517:122-132.
- Matsuo R, Ago T, Kamouchi M et al. Clinical significance of plasma VEGF value in ischemic stroke research for bio-markers in ischemic stroke (REBI-OS) study. BMC Neurol 2013;13:32.
- Brouns R, De Deyn P.P. The complexity of neurobiological pROC-AUCesses in acute ischemic stroke. Clin Neurol Neurosurg 2009;111:483-495.
- Llombart V, Antolin-Fontes A, Bustamante A et al. "B-type natriuretic peptides help in cardioembolic

- stroke diagnosis: Pooled data meta-analysis," Stroke 2015:46:1187-1195.
- Shibazaki K, Kimura K, Fujii S et al. "Brain natriuretic peptide levels as a predictor for new atrial fibrillation during hospitalization in patients with acute ischemic stroke," Am J Cardiol 2012;109:1303–1307.
- Morita E, Yasue H, Yoshimura M et al. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. Circulation 1993;88:82-91.
- 8) 大倉ひろ枝, 伊藤寛子, 吉岡秀樹ほか. 心機能評価 におけるN末端-proBNP測定の診断的意義と腎機能 による影響-BNPとの比較検討-. 臨床病理 2010;58:139-147.
- Hasan N, McColgan P, Bentley P et al. Towards the identification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review. Br J Clin Pharmacol. 2012;74:230-240.
- Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P et al. Etiologic diagnosis of ischemic stroke sub-types with plasma biomarkers. Stroke 2008;39:2280-2287.
- 11) Kimura K, Kazui S, Minematsu K et al. "Hospital-based prospective registration of acute ischemic stroke and transient ischemic attack in Japan," J Stroke Cerebrovasc Dis 2004;13:1-11.
- 12) Sakai K, Shibazaki K, Kimura K et al. Brain natriuretic peptide as a predictor of cardioembolism in acute ischemic strokepatients: brain natriuretic peptide stroke prospective study. Eur Neurol 2013;69:246-251.
- 13) Shibazaki K, Kimura K, Iguchi Y et al. Plasma brain natriuretic peptide can be a biological marker to distinguish cardioembolic stroke from other stroke types in acute ischemic stroke. Intern Med 2009;48:259–264.
- 14) Whiteley W, Tseng MC, Sandercock P. Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke: a systematic review. Stroke 2008;39:2902–2909.
- 15) Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J et al. Clinical usefulness of a biomarkerbased diagnostic test for acute stroke:the Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) study. Stroke 2009;40:77– 85.
- Jickling GC, Sharp FR, Biornarker panels in ischemicstroke. Stroke 2015;46:915–920.
- 17) Shibazaki K, Kimura K, Iguchi Y et al. Differences in brain natriuretic peptide value between transient ischemic attack and stroke patients with atrial fibrillation. EurNeurol 2011;66:271-276.

# Latex Agglutination Assay を原理とする IgG4 測定試薬の性能評価 - IgG4 高値症例の血清 IgG4 値の推移からみた測定上限値向上の必要性-

Performance Evaluation of IgG4 Measuring Reagents by Latex Agglutination Assay and Necessity to Improve the Upper Limit of Measurement in Patient with High Level IgG4 Change.

松村充子 嶋田昌司 松尾収二 倉村英二 潮崎裕也 高田真奈美 余村 求

**Abstract** Latex agglutination assays to assess the performance of a reagent to measure immunoglobulin G4 (IgG4) levels demonstrated a coefficient of variation (CV) for intermediate precision of up to 9.2% and a lower limit of quantification of 4.5 mg/dL at 20% CV. The linearity was confirmed up to 676.8 mg/dL. IgG4 values increased by 5% when the turbidity exceeded 2,061 FTU. The relationship between this (y) and the conventional (x) methods for standard spindle regression was y=1.18x-12.4. There were no influences on IgG4 values in samples (IgG:2,017-4,546 mg/dL, IgA:409-2,535 mg/dL, IgM:304-6,576 mg/dL, RF:509-3,364 IU/L, M protein:3.0-46.6 mg/dL). We confirmed the dilution accuracy in most analyzers for up to 50-fold dilutions (1,250 mg/dL).

The 95% percentile of IgG4 in healthy adults was 9.2-140.7 mg/ dL. These results showed the utility of this reagent in clinical settings.

However, the upper limit of measurement (1,250 mg/dL) was too low to interpret the degree of IgG4-related disease (IgG4RD). In this study, 6% (28/444) of tests had IgG4 values above 1,250 mg/dL. Improvement of the upper limit of measurement will allow more widespread use of this reagent.

**Key words** latex Agglutination Assay, IgG4, postzone phenomenon, IgG4 related disease

#### 1. 緒言

IgG4関連疾患(IgG4RD)は、わが国で発見された全身の炎症性疾患で、その診断には血清IgG4の測定が必須である。現在、IgG4の測定は免疫比ろう法と免疫比濁法の2法があるが、国内では汎用の分析装置で測定可能な後者の免疫比濁法が主流である。

今回検討したIgG4測定試薬(以下LA-IgG4) はラテックス免疫比濁法を原理とし、IgG4に特異性の高いモノクローナル抗体を使用している。このため、IgG1、IgG2およびIgG3との交差反応は無く、IgG4に特異性の高い測定方法である。また、IgG4の標準物質の値付け

Received Jan. 14, 2020; Accepted Feb. 27, 2020 MITSUKO MATSUMURA, MASASHI SHIMADA, SHUJI MATSUO, EIJI KURAMURA, YUUYA SHIOZAKI, MANAMI TAKADA, MOTOMU YOMURA

公益財団法人 天理よろづ相談所病院 臨床検査部

には質量分析計を用いており、トレーサビリティ体系が 確立した測定法となっている。

しかし、IgG4RDの血清 IgG4濃度は、LA-IgG4の測定上限値である500 mg/dLを遥かに上回る症例が多く、治療の方針や治療の効果を観察するには更に測定範囲を広げる必要があると思われた。今回、LA-IgG4の性能評価に加え IgG4高値3症例における血清 IgG4の濃度と病態の推移を提示し、LA-IgG4の測定範囲の拡大が必要であることを報告する。

本研究は,天理よろづ相談所病院の倫理委員会の承認 (承認番号976)を得て行った。

〒632-8552 奈良県天理市三島町200

Department of Laboratory Medicine, Tenri Hospital

200 Mishima, Tenri-Shi, Nara, 632-8552 Corresponding author: 松村 充子 TEL: 0743-63-5611 内線 7441

E-mail: mitsuko@tenriyorozu.jp

#### 2. 測定試料および測定方法

#### 1) 試料

試薬性能の評価に用いた試料は当院における日常検査後の残余血清であり、いずれも非連結、匿名化して用いた。

#### 2) 測定試薬, 測定装置および測定原理

#### ① 本法

評価の対象となる測定試薬は、ニットーボーメディカル株式会社製『N-アッセイ LA IgG4ニットーボー』とした。測定装置は、株式会社日立ハイテクノロジーズ製Labospect008を用いた。

測定原理はFig. 1に示したLatex Agglutination Assay 法を原理としている。試料にマウス抗ヒトIgG4モノクローナル抗体 (MAb) を反応させると,抗原抗体複合物が生成される。これにヒトIgG4感作ラテックス粒子 (La) を添加すると競合的に凝集塊が生成される。試料中のIgG4が少なければ,Laと凝集塊を形成するMAbが多くなり,濁度が増加して吸光度は高くなる。一方,試料中のIgG4が多ければ,Laと凝集塊を形成するMAbが少なくなり,濁度が減少して吸光度は低くなる。そして,570 nmの波長でMAbとLaが形成した凝集塊の量を吸光度変化量として測光し、試料中のIgG4濃度を定量する。

なおポストゾーン回避のため、試料はすべてあらかじめ20倍希釈した後、測定することが前提となっている。もし試薬メーカーが保証している測定上限値500mg/dLを超えた場合は、測定装置Labospect008が有する最大の自動希釈倍数50倍まで希釈して測定することが可能である。すなわち自動希釈によって、測定上限値500 mg/dLの25倍に相当する1250 mg/dLまで測定が可能である。

#### ② 対照法

比較対照となる測定試薬は、株式会社医学生物学研究 所製『IgGサブクラスBS-TIA3 IgG4』を用い、測定装置 は日本電子株式会社製BM8000を用いた。

測定原理は、ラテックス免疫比濁法であり、ヒトIgG サブクラスに対するポリクローナル抗体(ヒツジ)をラテックス粒子に感作し、ヒトIgG4との抗原抗体複合物を 596nmで定量する。 標準物質はERM-DA470k/IFCC である。なお対照法は院外検査である。

#### 3. 研究内容

#### 1) 性能評価

#### (1) 精度

併行精度は、50 mg/dL、150mg/dLの2種類の管理試料(試薬製造元提供) および422 mg/dLのヒトプール血清の3濃度を連続20回測定した。

室内精度は、併行精度で用いた50 mg/dL, 150 mg/dLの2種類の管理試料および129 mg/dL のヒトプール血清の合計3濃度の試料について、1日の午前と午後の2回測定し、これを15日間繰り返した。

#### (2) 定量限界

低濃度管理試料(試薬製造元提供)を生理食塩水にて希釈し、0~147 mg/dLまでの8濃度試料を作成した。これらの低濃度試料を5日間にわたり2重測定し、CVが20%を示した濃度を精度プロファイル図(precision profile)から求め定量限界とした。

(3) 直線性およびポストゾーンの確認 対象とした試薬では、測定方法に記したごとく、

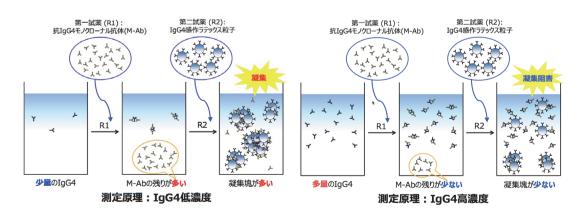


Fig. 1 Latex Agglutination Assay

測定前に試料を20倍希釈するが、直線性およびポストゾーンの確認には、試薬製造元から提供された確認用の試料(400 mg/dL)を前希釈せず測定する方法で評価した。よって、8000 mg/dLの試料として、生理食塩水で20段階に希釈し1段階につき3重測定した。

#### (4) 干渉物質の影響

干渉物質の影響は、干渉チェックAプラス(シスメックス株式会社製)を用いて確認した。干渉チェックAプラスは、ビリルビンC21 mg/dL、ビリルビンF19 mg/dL、溶血へモグロビン500 mg/dLおよび乳び(ホルマジン濁度数)2290 FTUを含んでいた。これ以外に溶血へモグロビンについては、日常検査で遭遇するマトリックスに近い材料で確認するため、精製水で溶血させたヒト〇型プール全血から1070 mg/dLの溶血液を作製し、併せて検討材料とした。

管理試料 (IgG4 150 mg/dL) に干渉チェック AプラスおよびヒトO型溶血液を段階的に添加し、変化率を求めた。

#### (5) 対照法との相関

患者残余検体100検体について、LA-IgG4と対照法の1gG4値の250 mg/dLまでの相関と、500 mg/dLまでの相関を確認した。

(6) 免疫グロブリン高値, RF高値およびM蛋白検体 における非特異反応の確認

 $IgG~2017\sim4546~mg/dL$ の30検 体、 $IgA~409\sim2535~mg/dL$ の30検 体、 $IgM~304\sim6576~mg/dL$ の30検体、RFは $509\sim3364~IU/L$ の30検体およびM蛋白は $3.0\sim46.6~mg/dL$ の35検体について、原倍のIgG4測定値と生理食塩水にて3倍希釈したときのIgG4測定値とを比較した。

#### (7) 汎用分析装置における希釈精度の確認

汎用分析装置における希釈精度の確認は以下のごとく行った。通常の分析パラメータ(20倍希釈)をNo. 1, 希釈再検用パラメータ(50倍希釈)をNo. 2および90倍希釈パラメータをNo. 3とした。これらの3種類の分析パラメータにおいて,50mg/dL,150mg/dLの管理試料とヒトプール血清422.1mg/dLの合計3種類の試料について測定値の再現性(測定回数20回)を確認した。

#### 2) 基準範囲の算出

当院の職員健診対象者303名(男性117名,女性186名, 年齢19~60歳で,平均年齢±SDは男性28±3歳,女性 28±5歳)の血清を用いて,ノンパラメトリック法にて 血清IgG4の95パーセントタイル値を算出した。男性と 女性の性差を確認するため、F検定で有意差(p<0.001)を 確認したのちt検定を実施した。

#### 3)IgG4高値検体の頻度とIgG4高値例における血清 IgG4の推移

2019年4月から9月の6ヶ月間の当院における血清 IgG4の依頼件数のうち、試薬製造元が保証する測定上 限値500 mg/dLと、自動分析装置が有する最大希釈倍 率から換算される測定上限値1250 mg/dLを上回った検 体の頻度を調査した。

その際、調査期間6ヶ月を含む2年以上にわたって IgG4が1250mg/dL以上を示した症例について、IgG4値 と病状、病態の推移を調査した。結果的には3症例の経過を調査した。

#### 4. 結果

#### 1) 性能評価

#### (1) 精度

併行精度のCVは、50 mg/dL、150 mg/dLの2 種類の管理試料(試薬製造元提供)およびヒトプール血清で、それぞれ2.5%、1.7%および0.7%であった。室内精度のCVは、9.2%、2.9%および3.0%であった(Table 1)。

#### (2) 定量限界

精度プロファイル図 (precision profile) から求めたCV20%の濃度は4.5 mg/dLで、試薬製造

Table 1 Repeatability and Intermediate precision

	Low	Hight	Serum pool
N	20	20	20
Mean	59.2	149.5	422.1
Range	5.3	8.5	12.6
SD	1.5	2.5	3.0
CV(%)	2.5	1.7	0.7

(Units:mg/dL)

	Low	Hight	Serum pool
Day	15	15	15
Mean	50.0	150.9	129.6
Range	14.3	14.9	12.9
Within-day precision	1.2	2.0	2.8
Between-day precision	4.5	3.9	2.7
Overall precision	4.6	4.4	3.9
Within-dayCV(%)	2.4	1.3	2.2
Between-dayCV(%)	8.9	2.6	2.1
OverallCV(%)	9.2	2.9	3.0

(Units:mg/dL)

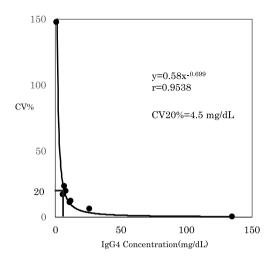


Fig. 2 Limit of Quantity

元が保証している測定下限値の6.0 mg/dLを下回る良好な結果であった(Fig. 2)。

#### (3) 直線性およびポストゾーンの確認

高濃度管理試料(試薬製造元提供のIgG4濃度8000 mg/dL)について、残差変動の分散と変動の分散との動の分散比の有意確率より676.8 mg/dLまで直線性を確認した。676.8 mg/dL以上の高濃度域における測定値は、約1300 mg/dLで平坦化しポストゾーン現象は認めなかった(Fig. 3)。

#### (4) 干渉物質の影響

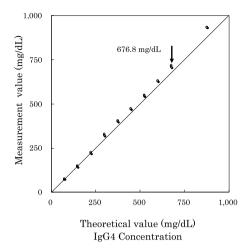
ビリルビンC 21 mg/dL, ビリルビンF 19 mg/dL, 溶血ヘモグロビン500 mg/dLおよびヒトO型プール全血の溶血ヘモグロビンは1070 mg/dLまで影響は認めなかった。しかし、ホルマジン濁度については2061 FTU以上で、管理試料が5%以上高値となった (Fig. 4)。

#### (5) 対照法との相関

患者残余検体100検体における対照法との関係は、標準主軸回帰式でy=1.18x-12.4、相関係数は0.991、Syx=15.81 であった。低 濃 度 域 $0\sim250$ mg/dLの80検体はy=1.12x-7.30、相関係数は0.985、Syx=9.70であった(**Fig. 5**)。

(6) 免疫グロブリン高値, RF高値およびM蛋白検体 における非特異反応の確認

原倍 (x) と 3 倍希釈値 (y) の関係と、希釈誤差 (y-x) の平均値  $\pm$  標準偏差 (SD) および CV は、 IgG 高値検体で y=0.92x-2.53、  $-2.2\pm7.8$  mg/ dL、 3.6%、 IgA 高値検体で y=0.95x-0.63、  $-3.8\pm$ 



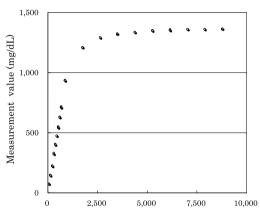


Fig. 3 Dilution Linearity and Confirmation of post zone phenomenon

IgG4 Concentration (mg/dL)

7.7 mg/dL, 2.0%, IgM高 値 検 体 で y=0.99x+0.22,  $-0.2\pm5.6$  mg/dL, 33.8%, RF高 値検体でy=0.96x-1.70,  $-3.8\pm5.0$  mg/dL, 1.3% およびM蛋白検体でy=0.93x-2.0,  $-0.7\pm7.1$  mg/dL, 10.8%であった。いずれの検体においても原倍と3倍希釈値が大きく乖離する検体は認めず、非特異的反応は認めなかった(Fig. 6)。

#### (7) 汎用分析装置における希釈精度の確認

通常の分析パラメータ (20倍希釈) No.1, 希 釈再検用パラメータ (50倍希釈) No.2および90 倍希釈パラメータ No.3それぞれにおいて, 研究 内容で示した3種類の試料について希釈再現性 (測定回数20回) を確認したところ, 最大のCV は, 通常の分析パラメータ No.1で2.5%, 希釈再

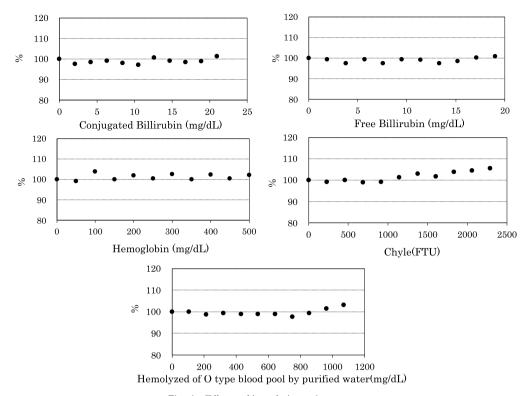


Fig. 4 Effects of interfering substances.

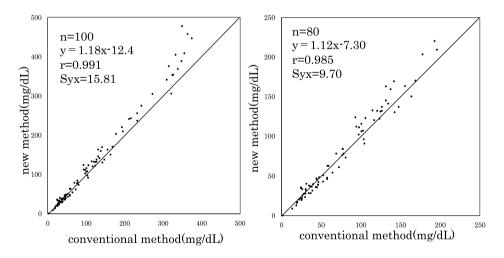


Fig. 5 Correlation between conventional method and new method

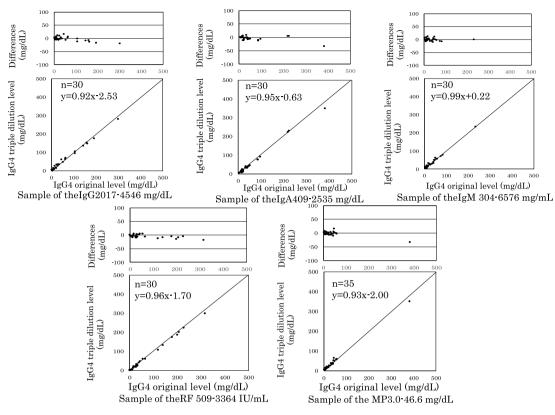


Fig. 6 Comparison between original level and triple dilution level by hight sample of the RF, IgG, IgM, IgA, M-protein.

Table 2 Repeatability of the dilution function by Hitachi Labospect

Analysis parameters		No. 1	No. 2	No. 3
SampleVolume (µL)		5.0	2.0	2.0
Diluent( $\mu$ L)  Condition of the stirring		95.0	98.0	178.0
		4	4	4
n		20	20	20
	Average	59.1	61.3	73.0
Control L	SD	1.5	2.3	4.4
	CV(%)	2.5	3.7	6.1
	Average	149.4	144.2	152.6
Control H	SD	2.5	4 20 61.3 2.3 3.7 144.2 3.3 2.3 415.5 5.8	4.3
	CV(%)	1.7	2.3	2.8
	Average	422.1	415.5	430.0
Pool	SD	3.0	5.8	9.2
	CV(%)	0.7	1.4	2.2
				(Units:mg/dL)

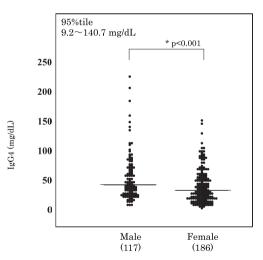


Fig. 7 Distribution of healthy people

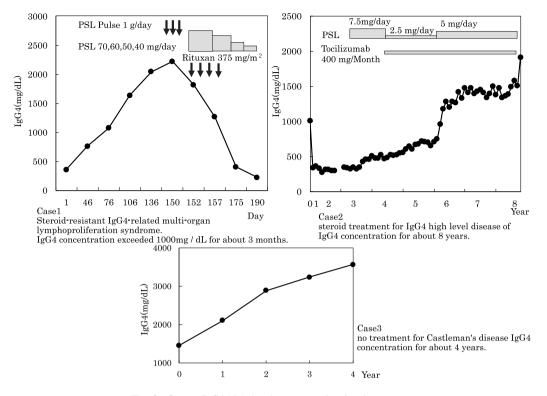


Fig. 8 Serum IgG4 high level concentration for three cases

検用パラメータ No.2 で 3.7% および 90 倍希釈の分析パラメータ No.3 で 6.1% であった。すなわち、20 倍希釈および 50 倍希釈では精度良好であったが、90 倍希釈で精度の低下を認めた(Table 2)。

#### 2) 基準範囲の算出

血清 IgG4 の 95 パーセントタイル値は、9.2  $\sim$  140.7 mg/dL であった。性差は t 検定にて有意差を確認し、男性が女性より高い傾向であった。95 パーセントタイル値は、男性が 11.6  $\sim$  175.6 mg/dL、女性が 8.6  $\sim$  106.0 mg/dL であった(Fig. 7)。

#### IgG4高値検体の頻度とIgG4高値の3症例における 血清IgG4の推移

2019年4月から9月の6ヶ月間の血清 IgG4の依頼件数 444検体のうち,500 mg/dL以上の検体が51検体(11%)を占め、さらに51検体のうち28検体は自動分析装置が有する希釈再検の上限である1250 mg/dLを上回った(6%)。

調査期間6か月を含む2年以上にわたって,血清IgG4が継続的に高値であった3症例について血清IgG4濃度の推移を示した(**Fig. 8**)。

症例1は、ステロイド抵抗性のIgG4関連多臓器リンパ増殖症候群疑い例であった。貧血と呼吸不全が急速に進行し、1ヶ月間(5回測定)の血清IgG4は1261~2220 mg/dLと変動した。ピーク値は2220 mg/dLで、症状の軽快とともに血清IgG4は斬減した。

症例2は,前立腺癌と膵癌術後のキャッスルマン病であった。血清IgG4の漸増により,生物学的製剤とステロイド剤の併用が必要となった。直近2年間(24回測定)の血清IgG4値は $1200\sim1913.4~mg/dL$ で推移し,平均の血清IgG4は1427~mg/dLであった。

症例3は、自覚症状が乏しい無治療のキャッスルマン病で、無治療な4年間(5回測定)の平均血清IgG4は2653 mg/dLであった。血清IgG4は1460から3563 mg/dLへ漸増し、顎下部のみに認めたリンパ腫は胸膜へも播種し、かつ胸水も確認された(Fig. 8)。

#### 5. 考察

Latex Agglutination Assay法を原理とするニットーボーメディカル株式会社製『N-アッセイLA IgG4ニットーボー』の性能は、室内精度において低濃度管理試料

の総合CVは9.2%であったが、日内精密度のSD値は1.2 mg/dLと良好であった。定量限界は、試薬製造元が保証している測定下限値の6.0 mg/dLを下回り、一方、直線性は676.8 mg/dLで測定上限値の500 mg/dLを上回っていた。抗原過剰で測定値が低下するポストゾーン現象は8000 mg/dLまで認めなかった。干渉物質の影響においては、ホルマジン濁度2061 FTU以上で測定値が高くなる影響を認めたが、これはラテックス免疫比濁法および免疫比濁法など濁度の変化を捉える測定法に共通する影響因子であり、本試薬における特有な現象では無い。精製水で溶血させたヒト〇型プール全血で溶血の影響がないことから、赤血球の膜が破壊されて起こる溶血の影響や非特異的反応は無いと思われた100。

対照法との比較では250 mg/dL以上の測定範囲で、 本法が対照法に比べて高値となったが、本法は対照法よ り正確性が保証されていると考えた。その根拠は、本法 の測定原理とトレーサビリティ体系にある。本法は直線 性が保たれている676.8 mg/dL以下の測定範囲では、第 1 試薬中の抗ヒトIgG4モノクローナル抗体が試料中の IgG4と結合し(1ステップ), 余剰にIgG4が存在しても 第2試薬中のIgG4感作ラテックス粒子と試料中のIgG4 が競合し(2ステップ)、測定値が偽低値化することは ないと考えられる。一方、対照法は試料中のIgG4と抗 ヒトIgG4ポリクローナル抗体の凝集反応を1ステップ で捉えるため、余剰にIgG4が存在すると反応が抑制さ れてポストゾーン現象が生じている可能性があるで。ま た、本法はモノクローナル抗体を用い、トレーサビリテ ィ体系は標準物質を質量分析計を用いてIgG4のみを定 量しているのに対し、対照法はポリクローナル抗体を用 い、IgG4の表示値が明記されていないERM-DA470k/ IFCC5 を標準物質としている。以上より、本法は対照 法より正確性が高いと判断した。また、免疫グロブリン 高値とRF高値およびM蛋白の患者検体における非特異 反応の確認では、いずれの検体においても、原倍と生理 食塩水で3倍に希釈したときのIgG4測定値は一致し非 特異的反応もみられなかった。

基準範囲はノンパラメトリック法で算出した健常者の 95パーセンタイル値としたところ,  $9.2\sim140.7~mg/dL$  となった。 95パーセントタイル値の上限を超えたのは, 男 性6名(<math>26歳  $\sim49$ 歳 で、 $1gG4は141.1\sim225.4~mg/dL$ ) および女性2名(23歳および26歳で、1gG4は151.5~mg/dLおよび147~mg/dL)の若年者であった。松木ら<sup>1)</sup> は508人の健常者を母集団として求めた基準範囲は5~118 mg/dLであったと報告している。また<math>1gG4の分布は年齢により異なり $^{314}$ )、基本的に対数正規分布を示す

ものの高濃度の領域にもう一つのピークをもつ2峰性となり、その要因はアレルギー素因をもつ例でIgG4が正常より高値を示すこと $^4$ と云われている。本検討で他の報告より基準範囲が高めとなった要因は、対象者にアレルギー素因を持つ者が含まれていた可能性が考えられた。また、亀子ら $^2$ は、IgG4は男性が女性より高値であると報告しており、本検討においても男女差が確認できた。これより、IgG4の厳密な基準範囲の設定には、性差、年齢、およびアレルギー素因を十分考慮した母集団で基準範囲を設定することが望ましいと考える。

Table 2より50倍希釈を行う希釈再検用パラメータ No. 2の測定上限である1250 mg/dL以上の測定値を得 るための分析パラメータのCVは2~3倍程度高くなり、 汎用分析装置での自動希釈性能に限界があると思われ る。よって、IgG4高値検体の測定において、手希釈操 作が加わることで希釈の頻度が多くなり、精確性を保証 することが困難であった。当院におけるIgG4高値検体 の頻度を調査すると、希釈再検用パラメータの測定上限 である1250 mg/dLを超える検体が約1割程度あり, IgG4高値検体が高頻度に存在していた。IgG4高値の3 症例における血清IgG4の血中濃度の推移は、3症例とも 本法の測定上限値である500 mg/dLを遥かに超えて、 希釈再検用パラメータの上限値である1250 mg/dLを超 えて推移した。またIgG4高値3症例の血清IgG4の血中 濃度推移は治療の効果を反映して鋭敏に変動し、かつ患 者の病勢を捉えていた。

症例1では、リツキサンとステロイドパルス治療の併用により、急性増悪のピーク値2220 mg/dLから呼吸不全が軽快するに伴いIgG4は漸減し、症例2ではIgG4値が漸増する度に投与薬剤量が増量された。そして症例3においても、無治療の状態ではIgG4が漸増し、全身のリンパ節腫脹と症状が悪化した。このように、IgG4値は患者の病勢を鋭敏に反映するため、医師はIgG4値から治療の方針を選択し、経過の観察にIgG4値を重要視している。よって本法は1250 mg/dL以上の高濃度域においても精確性が求められる。

血清 IgG4が非常に高値となる症例が多い IgG4RD は、未だその病態が解明されていない疾患群で高  $\gamma$  グロブリン血症とリンパ節腫脹を伴う疾患群と区別がつきにくい。そして IgG4の称性である Fab arm exchange Fab により、リウマチ因子のような非特異的な反応と Fab Fab

が回避されたIgG4の標準的な測定法となり、今後の IgG4RD の研究において一貫したデータ収集が可能になるであろう。

#### 6. 結論

N-アッセイLA IgG4ニットーボー試薬の性能は、ポストゾーン現象や非特異的反応が無い優れた性能を有していた。ただし、日常においてIgG4高値症例の割合が比較的高いことを考慮すると、測定範囲が拡大すれば精確性の保証とランニングコストの軽減が期待でき、より有用な測定法となる。

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) 松木友里, 照内友也, 森和雄.汎用自動分析装置における IgG4 測定試薬「N-アッセイLA IgG4 ニットーボー」の性能評価. 医学と薬学 2018.75.849-858.
- 2) 亀子光明, 北村弘文, 川茂幸, 他.ネフェロメトリー 法によるIgG4測定法の基礎的検討と臨床的意義。臨 床病理, 2010:58.393-396.
- 3) 川口竜二, 小笠詩子, 引地一昌, 他.ヒトIgGサブクラスのEIA法による分別定量. 臨床病理.1992.40:4.435-440
- 4) 井関幹郎, 小泉友喜彦, 小佐野満. 「血清 IgG サブク

- ラス濃度の各年齢層における基準値-免疫拡散法による検討」日本臨床免疫学会会誌,1990;13,328-336.
- 5) 川茂幸,伊藤哲也,守田由香,他.新規IgGサブクラス 測定試薬「IgGサブクラスBS-TIA3IgG1」「IgGサブク ラスBS-TIA3IgG2」「IgGサブクラスBS-TIA3IgG3」 「IgGサブクラスBS-TIA3IgG4」の基礎性能とIgG4の 臨床的有用性の検討,医学と薬学,2017:74.463-470.
- Marijin van der Neut Kolfschoten, Janine Schuurman, Mario Losen, et al. Anti-Inflammatory Activity of Human IgG4 Antibodies by Dynamic Fab Arm Exchange, Science. 2007;317.1554-1557.
- Arezou Khostroshahi, Lynn A.Cheryk, Mollie N. Carruthers, et al.Spuriously Low Serum IgG4 Concentrations Cased by the Prozone Phenomenon in Patients With IgG4-Reated Disease. American College of Rheumatology. 2014;66.213-217.
- 8) 原悠, 新海正晴, 山口展弘, 他. IgG4関連疾患と多中心性Castleman病の鑑別を要しステロイドが奏功した胸膜・リンパ節炎の1例. 日呼吸誌2013;2.544-548.
- 9) 生越貴明, 矢寺和博, 長田周也, 他. IgG4陽性形質 細胞の浸潤を認めたmulticentric Castleman病の1 例. 日呼吸会誌 2011;49,437-442.
- 10) 小野美由紀, 木下美沙, 小原康博, 他. 試薬性能評価における溶血の影響確認の留意点. 生物試料分析2015;38.3.202-207.
- 岡崎和一,池宗真美,柳川雅人,他. IgG4の特徴. 分子消化器病 2015:4.93-97.
- 12) 岡崎和一. 自己免疫性膵炎からみた IgG4 関連疾患. 天理医学紀要.2017;20.1-18.

## レクチンELISA法を用いた血清フコシル化 C4b-binding protein a-chain測定系の構築

Development of a Lectin Antibody ELISA System for Measuring Fucosylated C4b-binding Protein *a* -chain.

曽川一幸<sup>1)</sup> 山中咲乃<sup>1)</sup> 高野重紹<sup>2)</sup> 吉富秀幸<sup>2)</sup> 瀧澤弘降<sup>3)</sup> 野村文夫<sup>4)</sup> 大塚将之<sup>2)</sup>

**Abstract** We previously identified candidates as novel serum biomarkers in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) using serum proteome analysis. Among several candidates, we have focused on C4b-binding protein *a* -chain (C4BPA) as the most promising biomarker for PDAC. To move fucosylated C4BPA toward potential diagnostic use, we developed an enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) that enables to measure serum fucosylated C4BPA levels.

A polyclonal antibody was used to develop a newly sandwich ELISA for fucosylated C4BPA. Serum samples were obtained from 20 patients with PDAC, 20 patients with pancreatitis and 20 healthy controls for the measurement of fucosylated C4BPA by the system of ELISA.

The performance of the ELISA was satisfactory in terms of within-run (2.6-6.7%) and between-day (1.8-3.6%) reproducibility. Serum fucosylated C4BPA levels were significantly greater in PDAC ( $0.48\pm0.33~\mathrm{AU/mL}$ ) than in healthy volunteers ( $0.25\pm0.03~\mathrm{AU/mL}$ ) or pancreatitis ( $0.28\pm0.03~\mathrm{AU/mL}$ ) (p<0.001).

The newly established sandwich ELISA for serum fucosylated C4BPA might be useful with the diagnostic significance in various cancers.

**Key words** fucosylated C4-binding protein a-chain, lectin antibody ELISA, pancreatic ductal adenocarcinoma, serum biomarker

#### 1. はじめに

膵臓癌は様々な悪性腫瘍の中でも予後不良の癌であ

る。その主な理由として早期発見が困難なことから切除 率が低く、有効な補助療法が確立されていない事が挙げ られる。従って、膵臓癌を早期に発見・診断し外科的切

Received Dec. 25, 2019; Accepted Jan. 24, 2020 Kazuyuki SOGAWA<sup>1</sup>, Sakino YAMANAKA<sup>1</sup>, Shigetsugu TAKANO<sup>2</sup>, Hideyuki YOSHITOMI<sup>2</sup>, Hirotaka Takizawa<sup>3</sup>, Fumio NOMURA<sup>4</sup>, Masayuki OHTSUKA<sup>2</sup>

- 1)麻布大学生命·環境科学部生化学研究室 〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺1-17-71
- 2)千葉大学大学院医学研究院臟器制御外科学
- 〒260-8670 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1
- 3)財団法人柏戸記念財団ポートスクエア柏戸クリニック 〒260-0025 千葉県千葉市中央区問屋町1-35
- 4)千葉大学医学部附属病院マススペクトロメトリー検査 診断学
- 〒260-8670 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1
- 1) Department of Biochemistry, School of Life and

Environmental Science, Azabu University, 1–17–71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara-shi, Kanagawa 252–5201, Japan.

- <sup>2)</sup>Department of General Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba 260-8670, Japan.
- <sup>3)</sup>Kashiwado Clinic in Port-Square, Kashiwado Memorial Foundation, 1-35 Tonyachou, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba 260-0025, Japan.
- <sup>4)</sup>Divisions of Clinical Mass Spectrometry and Clinical Genetics, Chiba University Hospital, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba 260-8670, Japan.

Corresponding author (連絡責任者): 曽川一幸

TEL/FAX: 042-769-1924 E-mail: sogawa@azabu-u.ac.jp 除を含む化学療法での集学的治療をいち早く行うことに より治療成績の向上を図ることが急務である。

近年のプロテオミクス技術の進歩に伴い、バイオマーカーを発見、同定するための様々なアプローチが試行されている。そのうち、質量分析装置(MS)を用いたバイオマーカー探索では生体試料中のペプチドやタンパク質を解析するための有力なツールであるMSを用いた血清・血漿プロテオーム解析により多数のマーカー候補が検出され、癌特異的な診断情報の取得が可能となる1.2。

我々は治癒切除を施行された術前・術後膵臓癌患者、 慢性膵炎患者, 健常者血清検体を用い, Tandem Mass Tagを用いたタンデム質量分析法で新たな腫瘍マーカー の探索を行った結果、C4b-binding protein α-chain (C4BPA) を見出した<sup>3)</sup>。C4BPAは明細胞性子宮癌<sup>4)</sup> や非小細胞肺癌5)において、有意に増加していることが 報告されている。このように様々ながんにおいて C4BPAの診断的意義が報告されているが、それぞれ独 自の方法で測定されているため、客観的な比較が困難で ある。マーカー候補の臨床的意義を確立するためには, 大規模なバリデーションによる再現性の確認やハイスル ープット化が求められる。そこで我々は、検査で一般的 に用いられているサンドイッチELISA法を用いた C4BPA 測定系の構築した3)。 健常者40名及び慢性膵炎 患者20名の血清C4BPA値を基に平均±2SDにより、カ ットオフ値は48.6 µg/mLであり、膵臓癌患者52名中13 名(25.0%)で48.6 µg/mL以上であったが、かなり低 い検出であった3)。

フコシル化は、がんや炎症と最も深く関わる糖鎖修飾の1つである。フコシル化蛋白として、肝臓癌ではフコシル化 AFP (AFP-L3)、膵臓癌ではCA19-9とすでに腫瘍マーカーとして使用されている。フコシル化 C4BPA が明細胞性子宮癌で高値を呈することが報告されている。。今回我々は、フコースに特異的に結合する lens culinaris (LCA) レクチンを用いて、レクチン ELISA 法を用いたフコシル化 C4BPA 測定系の構築を行った。

#### 2. 材料および方法

#### 1) 対象

健常者は、財団法人柏戸記念財団ポートスクエア柏戸クリニックにおいて検診を受診された20名(男性10名、女性10名、平均年齢658±6.8歳)、慢性膵炎患者10名(男性5名、女性5名、平均年齢648±28.2歳)および膵臓癌患者10名(男性5名、女性5名、平均年齢64.7±18.4歳)は千葉大学医学部附属病院肝胆膵外科に手術施行された患者を対象とした。膵臓癌患者10名のUnion for International

Cancer Control (UICC) stage は、IB 1名、IIA 4名、IIB 5名である。すべての患者から同意を得た上で行った。

血清は6mL用分離剤入り真空採血管(極東製薬工業)にホルダーを用いた真空採血を行って血液を採取し、血液が凝固したことを確認してから室温3000rpm, 10分間遠心した血清を-80℃に凍結保存し、使用する際に室温で融解した。

本研究は本学倫理審査委員会の承認を得て実施した (麻大学術第0123号)。

#### 2) 方法

#### (1) ウエスタンブロッティングのよる抗体の特異性評価

Recombinant Human C4BPA protein (アブカム社) と 膵臓 癌 患 者 血清 を SDS-PAGE (perfect NT Gel System, DRC社) にて分離した後, PVDF膜 (immobilon Transfer Membranes; MILLIPORE社) と SDS-PAGE を 行ったゲルを 濾紙で挟み,トランスファー装置 (Criterion Blotter; BIO RAD社) にセットし、10V定電圧で18時間行った。PVDF膜をブロッキングバッファー (0.3% スキムミルク in PBS)に浸して1時間振とうさせた。 C4BPA polyclonal antibody (LifeSpan BioSciences社) で PVDF膜を浸し1時間振とうさせ、その後 Rabbit antimouse immunoglobulins/HRP (DAKO社) に PVDF膜を浸し1時間振とうさせた。 化学発光試薬 (Pierce Western Blotting substrate; Thermo Scientific社) に 5分間浸した PVDF膜をディテクター (Light-Capture II; ATTO社) にセットし、バンドの検出を行った。

#### (2) ELISA プレートの作製・測定条件

ELISAプレートの作製は抗体としてC4BPA polyclonal antibodyを $0.5\mu$ g/wellでマイクロタイタープレート(Nunc 社)に感作し、NOF102(NOF CORPORATION社)にてプロッキングを行った。またレクチンはビオチン標識したLCAレクチン(J-CHEMICAL社)を用い、streptavidin-HRP(Southern Biotechology Associates社)で発色させた。

測定は血清検体をPBSにて100倍に希釈した後、感作プレートに添加し、室温で1時間静置した。感作プレートをPBS-Tween bufferで3回洗浄後、レクチンを添加し、室温で1時間静置した。さらに感作プレートをPBS-Tween bufferで3回洗浄後、streptavidin-HRPを添加し、感作プレートをPBS-Tween bufferで3回洗浄後、TMB溶液(Roche Diagnostics社)を添加し、10分間発色反応させ、反応停止液(0.1N 硫酸、和光純薬工業)を添加した。吸光度はプレートリーダー(BioRad社)を用いて450nmで測定を行った。

#### (3) 統計解析

統計解析は全てSPSS version 19.0 statistical package

(SPSS社)を用いて行った。直線性及び相関性は Pearson相関係数にて評価した。2標本検定はMann-Whitney U-testを用いて評価し、p<0.05で有意差があ ると判断した。

#### 3. 成績

#### 1) 抗体の特異性評価

Fig. 1に 示 す よ う に、C4BPA polyclonal 抗 体 は recombinant human C4BPA proteinと膵臓癌患者の血清 C4BPA との反応性が確認された。

#### 2) 基礎性能

同時再現性はn=8で測定を行い、日差再現性は独立した7日間にT=3で測定を行った。測定したサンプルは 0.23、1.39AU/mLの2濃度を用いた。同時再現性および日差再現性はそれぞれ $2.6\sim6.7\%$ 、 $1.8\sim3.6\%$ となった。共存物質の影響は干渉チェック・Aプラス(シスメックス株式会社)用い、溶血ヘモグロビン(500mg/dL)、ビリルビンF(20.7mg/dL)、ビリルビンC(20.4mg/dL)、乳び(1400 FTU)、アスコルビン酸(50mg/dL)、RF(500U/L)まで検討し、その結果、括弧内の濃度まで影響を認めなかった。

# 3) 健常者,慢性膵炎患者,膵臓癌患者における血清フコシル化C4BPAの評価

健常者、慢性膵炎患者、膵臓癌患者で、それぞれ $0.25 \pm 0.03$ AU/mL、 $0.28 \pm 0.03$ AU/mL、 $0.48 \pm 0.33$ AU/mL であり、健常者と慢性膵炎患者との間には有意な違いはみられなかったが、健常者及び慢性膵炎患者に対して膵臓癌患者でp<0.001と有意な違いがみられた(Fig. 2)。 膵臓癌患者において、CA19-9のカットオフ値を37U/mL未満とすると全例陰性であったが、健常者の血清フコシル化C4BPAの平均  $\pm 2$ SD(standard deviation)からカットオフ値を0.31AU/mLとすると、膵臓癌患者の感度は



Fig. 1 Western blotting analysis.

Immunoreactive bands were observed at C4BPA when synthetic and serum C4BPA were incubated with anti-C4BPA polyclonal antibody.

Lanel: recombinant human C4BPA protein. Lane2: serum C4BPA.

70%, 慢性膵炎患者の特異度は87.5%であった。

#### 4. 考察

近年、プロテオミクス解析技術の発展により、次々に新しいバイオマーカーが発見されているが、実際の臨床診断に用いる段階までには至っていない。バイオマーカーを開発する手順は、まず半定量的な方法でコントロール群と疾患群を比較解析してマーカー候補を選定するDiscovery phaseを経て、次に、それらの中から選定されたマーカーを Validation phase に移行させる。MSベースにて発見されたマーカーを ELISA 法にてバリデーションするのが理想的な手順である。

抗体を用いないMSをベースとしたmultiple reaction monitoring(MRM)やselective reaction monitoring(SRM) はターゲットとなるタンパク質を定量、検出のための技術として注目されている $^{70}$ 。しかしフコシル化C4BPAはMRMの検出できる分子量範囲を超えており適用することはできない。

臨床検査におけるMSを用いた測定は、ステロイドホルモン $^{8}$ , ビタミンD $^{9}$ , および甲状腺ホルモン $^{10}$ につ

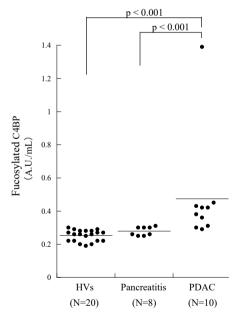


Fig. 2 Serum C4BPA levels, as determined by ELISA, in 20 healthy volunteers, 8 pancreatitis and 10

The levels are significantly greater in the PDAC (0.48  $\pm$  0.33 AU/mL) compared with the healthy volunteers (0.25  $\pm$  0.03 AU/mL) and the pancreatitis (0.28  $\pm$  0.03 AU/mL).

いて可能である。しかしながら、サンプル調製、スループット、自動化、検査室情報システムとのインターフェース、機器間の標準化等の臨床応用に関する課題が残っている<sup>6</sup>。

我々はC4BPA polyclonal抗体とLCAレクチンを用いて、ELISA測定系の構築を試みた。今回の研究でのELISAによる測定結果では、日差再現性、同時再現性等の基礎性能も良好な結果が得られた。

予後不良である膵臓癌の治療成績を向上させ、予後を 大きく改善するには早期発見, 切除手術による早期治療 が有効である。癌の早期発見には、検診などによるスク リーニング検査が必要であるが、膵臓癌はスクリーニン グが最も困難な癌の一つであると考えられている11)。血 液検査では肝胆道系酵素の上昇を認めることが多く、膵 臓癌の特異的なマーカーはCA19-9である<sup>12)</sup>。膵癌全国 調査報告によれば膵臓癌登録例においてCA19-9の上昇 は69.0%、CEAの上昇は18.0%認められているが、進行 癌で上昇しており、早期癌ではほとんど認められていな い12)。血清フコシル化C4BPAレベルは健常者、慢性膵 炎患者, 膵臓癌患者で, それぞれ0.25 ± 0.03AU/mL, 0.28 ± 0.03AU/mL, 0.48 ± 0.33AU/mLであり、健常者と慢 性膵炎患者との間で有意な違いはみられなかったが、健 常者及び慢性膵炎患者と膵臓癌患者との間でp<0.001と 有意な違いがみられた。また、早期膵臓癌患者において、 CA19-9は全症例で正常値であったが、血清thrombin light chainがstage Iで100% (1/1), IIで50% (1/2) 陽性であった。血清フコシル化C4BPA は従来のマーカ ーに相補的な新たな膵臓癌マーカーとして、 臨床応用で きる可能性が示唆された。

#### 5. 結語

血清フコシル化C4BPAは明細胞性子宮癌において、その濃度が変化することが報告されている。しかし、現在に至るまで、血清フコシル化C4BPAのハイスループットな測定法がないため、そのような診断に有用性があるか検証されていなかった。今回我々が構築した血清フコシル化C4BPA測定のための簡便なELISA測定系は、膵臓癌の診断に有用であることが示唆された。

本論文の発表に関して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

#### 文 献

- Hortin GL. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. Clin Chem. 2006;52(7):1223-1237.
- Petricoin EF, Belluco C, Araujo RP, Liotta LA. The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. Nat Rev Cancer. 2006; 6(12):961–967.
- Sogawa K, Takano S, Iida F, et al. Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4bbinding protein α-chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags. Br J Cancer. 2016; 115(8):949–956.
- Mikami M, Tanabe K, Matsuo K, et al. Fully-sialylated alpha-chain of complement 4-binding protein: Diagnostic utility for ovarian clear cell carcinoma. Gynecol Oncol. 2015; 139(3):520-528.
- Liu YS, Luo XY, Li QR, et al. Shotgun and targeted proteomics reveal that pre-surgery serum levels of LRG1, SAA, and C4BP may refine prognosis of resected squamous cell lung cancer. J Mol Cell Biol. 2012;4(5):344-347.
- Tanabe K, Matsuo K, Miyazawa M, et al. UPLC-MS/MS based diagnostics for epithelial ovarian cancer using fully sialylated C4-binding protein. Biomed Chromatogr. 2018;32(5):e4180-e4187.
- Fortin T, Salvador A, Charrier JP, et al. Clinical quantitation of prostate-specific antigen biomarker in the low nanogram/milliliter range by conventional bore liquid chromatography-tandem mass spectrometry (multiple reaction monitoring) coupling and correlation with ELISA tests. Mol Cell Proteomics. 2009;8(5):1006-1015.
- Stanczyk FZ, Clarke NJ. Advantages and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2010, 121(3-5):491-495.
- 9) Farrell CJ, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State-of-the-art vitamin D assays: A comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. Clinical Chemistry. 2012, 58(3):531-542.
- Soldin SJ, Soukhova N, Janicic N, Jonklaas J, Soldin OP. The measurement of free thyroxine by isotope dilution tandem mass spectrometry. Clinica Chimica Acta, 2005, 358(1-2), 113-118.
- Kimura K, Ohto M, Saisho H, et al. Association of gallbladder carcinoma and anomalous pancreaticobiliary ductal union. Gastroenterology. 1985;89(6): 1258–1265.
- 12) 皆川紀剛,山口幸二. 膵癌・胆道癌の腫瘍マーカー. 成人病と生活習慣病. 2011;41:654-660.

### 酵素法でコレステロールとトリグリセライドの和を 染色する全自動リポ蛋白分画法の開発

Development of a Fully Automated Enzymatic Lipoprotein Fractionation Method for Staining Total Cholesterol and Triglycerides

山口奈摘美1) 巖崎逹也2) 飛山理絵3) 戸塚 実4) 松下 誠1)

**Abstract** The lipoprotein fractionation method (Fat red method) by agarose gel electrophoresis using a fat-soluble dye is currently the most commonly employed clinical method because it is simple and does not require a special device. However, this Fat red method is unable to fully automated, has a different reactivity to each lipid, and there is no test corresponding to the total amount. In order to solve these problems, we developed a new fully automatic lipoprotein fractionation method, the CH·TG method, which stains total cholesterol (CH) and triglycerides (TG) using enzymes. Compared with the conventional Fat red method, the separation of LDL and VLDL became clearer by the CH·TG method, and full automation was possible. The correlation with the Fat red method was y=1.04x-9.1, r=0.934 for the HDL fraction, y=1.27x-6.6, r=0.893 for the VLDL fraction, and y=1.26x-3.2, r=0.734 for the LDL fraction. In addition, the VLDL and LDL fractions by the CH·TG method better reflected fluctuations in TG and CH, respectively. Based on these results, the CH·TG method may be a new lipoprotein fractionation method that overcomes the problems with the Fat red method.

Key words lipoprotein fractionation, enzymatic method, cholesterol, triglycerides, full automatic

#### 1. はじめに

近年の脂質に関する様々な研究に伴い、個々の脂質検査法も改良が成されてきた。例えば総コレステロール (TC) やトリグリセライド (TG) の測定は、かつては化学的測定法が用いられていたが $^{1.2}$ )、 $^{1960}$ 年後半から  $^{1970}$ 年代前半にかけて酵素法が開発された $^{3-5}$ )。その後  $^{1990}$ 年代には、HDL-CおよびLDL-Cの直接法 $^{6.7}$ が開発され、これにFriedewaldの式 $^{80}$ を併用した、TC、

Received Dec. 25, 2019; Accepted Jan. 20, 2020 Natsumi YAMAGUCHI $^{1}$ , Tatsuya IWASAKI $^{2}$ , Rie TOBIYAMA $^{3}$ , Minoru TOZUKA $^{4}$ , Makoto MATSUSHITA $^{1}$ 

- 1) 埼玉県立大学大学院 保健医療福祉学研究科 〒343-8540 埼玉県越谷市三野宮820
- 2) 東松山医師会病院臨床検査科
- 〒355-0021 埼玉県東松山市神明町1-15-10
- 3)株式会社ヘレナ研究所
  - 〒336-0061 埼玉県さいたま市浦和区常盤9-21-19
- 4) 長野県立こども病院
  - 〒399-8288 長野県安曇野市豊科3100

HDL-C, LDL-CおよびTGについては、現在脂質検査4項目としてほぼ確立されている。

一方、現在臨床で用いられているリポ蛋白分画検査には、アガロースゲル電気泳動法を用いて脂溶性色素 Fat red 7Bで染色する AG法 <sup>9,10</sup>、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて同様に脂溶性色素 Sudan Black Bで染色する PAG法 <sup>11)</sup>が使用され、中でも前者の AG法は操作が簡便で特殊な装置を必要としないことから、今日の臨床検査で最も普及している。しかし、これら両者の

- <sup>1)</sup> Department of Clinical Chemistry, Saitama Prefectural University, 820, Sannomiya, Koshigaya, Saitama 343– 8540, Japan
- <sup>2)</sup> Department of Laboratory Medicine, Higashimatsuyama Medical Association Hospital, 1-15-10, Shinmeicho, Higashimatsuyama, Saitama 355-0021, Japan
- <sup>3)</sup> Helena Laboratories Co. Ltd. 9–21–19, Tokiwa, Urawa, Saitama, Saitama 336–0061, Japan
- <sup>4</sup> Nagano Children's Hospital, 3100, Toyoshina, Azumino, Nagano 399-8288, Japan

Corresponding author: Natsumi YAMAGUCHI

E-mail: 2081502r@spu.ac.jp

リポ蛋白分画検査の染色は、対象となる脂質の種類によって染色性が異なる脂溶性色素を用いる方法であり、この脂質染色<sup>12)</sup>については、1960年代から現在に至るまで改良がなされていない。

現在普及しているAG法によるリポ蛋白分画検査には、いくつかの問題点が挙げられる。それは、第一に、染色液にFat red 7B溶液を使用し、それを用事調製する必要があるため、全自動化が困難となっていること、第二に、コレステロールエステル(EC)やTGが遊離コレステロール(FC)やリン脂質(PL)に比べ染色性が高く、リポ蛋白を構成する脂質によって反応性が異なること、第三に、これらに伴いリポ蛋白の総量に該当する検査がないため、総量と分画値を対応させた評価が困難となっていること、などである。

そこで今回我々は、これらの問題点を解決するため、リポ蛋白を構成する主要脂質であるCHとTGのみを測定し、両者の分子数の和に比例した発色が得られる酵素法で染色する新たなリポ蛋白分画法、CH·TG法を開発することを目的に検討を行った。

#### 2. 材料および方法

#### 1) 試料

試料はTCが220 mg/dL以上またはTGが150 mg/dL以上であった患者残余血清70例(東松山医師会病院)を用いて下記の測定を行った。

#### 2) 方法

#### (1) 脂質測定

TC, TG, HDL-C, およびPLの測定は, それぞれコレステロールE-テストワコー, LタイプワコーTG·M, LタイプワコーHDL-C·M, およびリン脂質C-テストワコー (いずれも富士フィルム和光純薬工業)を用い, 自動分析機CA-270 plus (古野電気)で測定した。標準物質には, マルチキャリブレーターリピッド (富士フィルム和光純薬工業)を用いた。

#### (2) 電気泳動法

エパライザ2Jr. (ヘレナ研究所)を用いるAG法を以下の4法にて実施した。

#### i) 従来法

リポ蛋白分画としては、Fat red 7Bを用いて染色を行うFat red 法、また、各脂質分画としては、コレトリコンボ(ヘレナ研究所)によるCH分画(CH法)、およびTG分画(TG法)の3法を実施した。なお、測定はすべて試薬の添付文書に従った。

#### ii) CH·TG法

上記コレトリコンボによるCH分画およびTG分

画の両酵素試薬を混合した試薬を調製した。具体的な調製方法は、まず、CH分画用の酵素剤をその溶解液1 mLで溶解したCH試薬を調整した。次に、このCH試薬を用いてTG分画用の酵素剤を溶解し、これをCH・TG法の染色試薬とした。また、CH・TG法のエパライザ2Jr.による測定は、CH分画と同様の条件で実施した。なお、上記CH・TG法の染色試薬の調製方法を設定するための検討試薬として、CH分画用の酵素剤をTG分画用溶解液1 mLで溶解したCH法試薬(TG溶解液)、TG分画用の酵素剤をCH分画用溶解液1 mLで溶解したTG法試薬(CH溶解液)、およびTG分画用溶解液でCHとTGの酵素剤を溶解したCH・TG法試薬(TG溶解液)をそれぞれ調製した。

#### iii) CH·TG法の染色原理

本 $CH \cdot TG$ 法は、CHおよびTGの1分子からそれぞれ1分子のホルマザンが生成する染色原理となる (Fig 1)。

なお本研究は本学(承認番号30513) および東松 山医師会病院(審査番号18-3) の倫理委員会の承 認を得て実施した。

#### 3. 結果

#### 1) CH·TG試薬の妥当性

TGが150 mg/dL以上であった試料を対象に、CH·TG 法、CH法、TG法、CH·TG法(TG溶解液)、CH法(TG 溶解液)、およびTG法(CH溶解液)を実施した。その 結果、TG分画となるTG法とTG法(CH溶解液)の両

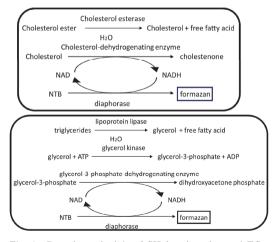


Fig. 1 Reaction principle of CH fractionation and TG fractionation by enzymatic method

者の各リポ蛋白中のTG分画(%)はほぼ一致したが、CH分画となるCH法とCH法(TG溶解液)では、染色性が大きく異なり、後者の試薬ではほとんど染色されなかった。また、同様にリポ蛋白分画となるCH・TG法とCH・TG法(TG溶解液)についても後者の試薬では染色性がかなり低いものであった。これらの結果より、CH・TG法の染色液の調製にはCH分画用溶解液を使用することとした。なお、酵素法の染色原理を用いるCH・TG法は、Fat red法と異なりエパライザ2Jr(ヘレナ研究所)を用いて全自動測定が可能であった。

#### 2) CH·TG法, Fat red 法, CH分画, およびTG分画に よるデンシトメトリパターンの比較

測定した患者血清70例の内、TCが179 mg/dL、TGが250 mg/dLと測定された1例について、 $CH\cdot TG$ 法、Fat red 法、CH分画、およびTG分画を行い、各デンシトメトリパターンを示した(Fig 2)。まず $CH\cdot TG$ 法によるデンシトメトリパターンは、Fat red法によるそれと類似した波形が得られ、一見してCH分画とTG分画の両者

を合わせたような波形が得られた。また、酵素法で染色するCH·TG法と脂溶性色素で染色するFat red 法の波形を比較したところ、前者は後者に比べLDLおよびVLDLの各分画のピークの幅が狭くなり、結果として各リポ蛋白の境界がより明瞭となることが確認された。このような傾向は、特にVLDL分画が高値となる他のTG高値血清群で同様に認められた。また、LDLやVLDL分画のピークが狭くなる波形は、酵素法で染色するCH分画やTG分画においても同様な傾向であった。

#### 3) Fat red 法と CH·TG 法の相関

患者血清70例の測定結果について、Fat red法と CH·TG法の各分画の相関関係を示した(Fig 3)。横軸を Fat red法、縦軸を CH·TG法の分画値とし、それぞれの回帰直線と各グラフに引いたy=xの直線を比較すると、まずHDL分画は、y=1.04x-9.1、r=0.934となり、検討した70例すべてでFat red法が高値となった。次に VLDL分画は、y=1.27x-6.6、r=0.893となり、分画値が高いほどCH·TG法が高値に、分画値が低いほどFat red

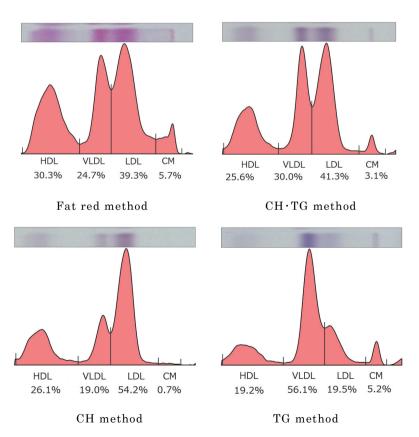


Fig. 2 Comparison of 4 methods of lipoprotein fractionation

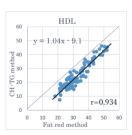
法が高値となった。またVLDLが30%付近を境に、分画値の差に逆転現象が認められた。さらにLDL分画は、y=1.26x-3.2、r=0.734となり、VLDLと同様に分画値が高いほどCH·TG法が高値に、また分画値が低い場合には逆転現象が認められた。

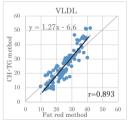
#### 4) Fat red 法と CH·TG 法の各分画値の差の原因

Fat red法とCH·TG法で認められた各分画の差の原因を解析するため、両方法におけるHDL、LDL、およびVLDLの各分画の差(CH·TG法-Fat red法)と、総脂質(TL=TC+TG+PL)に対する各脂質(TC、TG、PL)の割合との相関関係を検討した(Table 1、Fig 4)。その結果、VLDL分画の差はTG/TL比(r=0.632)、またLDL分画の差はTC/TL比(r=0.633)とそれぞれ高い相関関係が認められた。なお、HDL分画の差はTL中のどの脂質の割合とも高い相関は認められなかった。

#### 5) 高CH群, 高TG群におけるFat red法とCH·TG法の 比較

上記結果を踏まえ、検討した70例を高CH群 (TC値 > TG値) となる31例および高TG群 (TG値> TC値) となる39例の2グループに分け、両方法における各リポ蛋白分画の平均値  $\pm$  SDを比較した (**Table 2**, **Fig 5**)。その結果、平均値で比較した場合、HDL分画は両群共に、Fat red法がCH·TG法に比べ7-10%高値 (p<0.001)、VLDL分画ではCH·TG法が高TG群で5.0%高値 (p<0.05)、逆に高CH群で1.5%低値 (p=0.19)、またLDL分画ではCH·TG法が高CH群で10.5%高値 (p<0.001)となった。





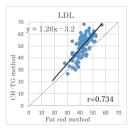


Fig. 3 Correlation between each fractionation of Fat red method and CH·TG method

#### 4. 考察

食生活の変化や飲酒、喫煙、および運動不足により、 脂質異常症をはじめとする生活習慣病が進行していることは、近年の様々な研究により明らかにされている「3」。 1974年にTCの酵素法が開発された「3」のを契機に、1990年代にはHDL-CおよびLDL-Cの直接法が開発され<sup>6,7</sup>,これらの検査値から定義づけされる脂質異常症の考え方も完全に定着している。そして、これらの検査に加え、リポ蛋白分画検査は脂質の代謝異常に基づく高脂血症の分類「4」や病態把握、治療の経過観察に有用な検査となっており、日本動脈硬化学会による動脈硬化性疾患予防ガイドライン「5」にも診断基準として記載されている。

しかし、リポ蛋白分画については、HDL-Cおよび LDL-Cの直接法が主流となった現代においても、1960 年代に開発された脂溶性色素で染色する検査法<sup>12)</sup>が中心となっている。現在使用されているFat red 7Bや Sudan Black Bなどの脂溶性色素は、親油性の高いTGやECがFCやPLに比べより強く染色されるため、増減する脂質の種類によって分画値が異なることになる。特に、自動分析法のTC、HDL-C、およびLDL-C検査ではECはすべてFCに換算された値(総FC値に相当)として測定し、臨床評価しているのに対して、リポ蛋白分

Table 1 Correlation between percentage of lipids in total lipoprotein (TL) and difference between CH⋅TG method and Fat red method for each lipoprotein fractionation

	TC/TL*	TG/TL*	PL/TL*
HDL(CH·TG method-Fat red method)	-0.260	0.167	-0.029
VLDL(CH·TG method-Fat red method)	-0.626	0.622	-0.516
LDL(CH·TG method-Fat red method)	0.633	-0.583	0.428
₩TL=TC+TG+PL			

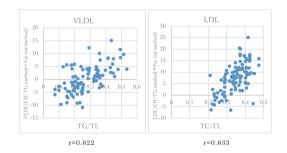


Fig. 4 Correlation between percentage of lipids in total lipoprotein (TL) and difference between CH·TG method and Fat red method for each lipoprotein fractionation

\*\*TL = TC+TG+PL

Table 2 Comparison of mean fractionation value in high CH group and high TG group

Sample	Dyeing method	HDL (%)	VLDL (%)	LDL (%)
classification		$average \pm SD$	$average \pm SD$	$average \pm SD$
High CH group	Fat red method	$33.2 \pm 6.92$	$23.6 \pm 6.92$	$43.2 \pm 5.10$
	CH·TG method	$24.2 \pm 7.60$	$22.1 \pm 7.47$	$53.7 \pm 7.62$
High TG group	Fat red method	$28.4 \pm 5.78$	$32.0\pm7.91$	$39.4 \pm 6.02$
	CH·TG method	$21.1 \pm 7.12$	$37.0 \pm 10.66$	$41.9 \pm 9.21$

画では、ECはEC、またFCはFCとして染色しているため、リポ蛋白分画検査とTC、HDL-C、およびLDL-C検査には整合性が認められない。また、現在普及しているFat red 法は染色液を用時調製する必要があるため、蛋白分画や酵素のアイソザイム検査とは異なり、完全自動化が困難な電気泳動法となっている。

そこで今回、私たちはこれらのリポ蛋白分画の問題点 を改善した新たなリポ蛋白分画法の開発を目的とし、次 の3点を考慮することとした。それは、①脂質の種類に 関係なく、CHやTGなど各脂質の分子数に比例した発 色とすること、②全自動化を可能とすること、③PLは 測定しない染色とすること、である。まず、①について は, 脂溶性色素は染色に脂質間差があることから, 自動 分析法で測定されるTC, HDL-C, LDL-CおよびTGと の整合性を確保するためである。次に、②については、 現在の脂溶性色素を用いた染色方法では試薬を用事調製 する必要があることやアルコールでの脱色処理が必要で あるために、全自動の装置に載せることが難しい。した がって酵素法の試薬を用いることが必要であると考え た。さらに、③については、脂質異常症の診断は HDL-C, LDL-CおよびTGの3つで定義づけされ、PL は用いられていないこと15),およびPLは各リポ蛋白中 にほぼ均等に存在し、しかも TCと並行して増減するこ とから, その変動がリポ蛋白分画に反映されにくいこと, を考慮したためである。このように、上述した3点を満 たす新たなリポ蛋白分画法として、酵素法でCHとTG の和を測定する方法を本検討の基本とした。

一方、酵素法で脂質を染色する電気泳動法として、CH分画およびTG分画試薬が開発され(共にヘレナ研究所)、エパライザ2 Jrに適応され全自動化されている。私たちはこれらのCH分画およびTG分画に着目し、両試薬を混合した試薬を調製することで、上述した3点を満たすリポ蛋白分画法の試薬になり得るものと考えた。その結果、CH分画用溶解液でCH酵素剤とTG酵素剤の両者を溶解した試薬(CH・TG法)を調製することにより、CHとTGの和を染色することが可能であった。なお、TG溶解液にはコレステロールエステラーゼの賦活成分が含まれていないため、CH・TG法の溶解液としては好

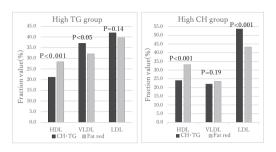


Fig. 5 Comparison of average fractionation values in high CH and high TG group

ましくないと考えられた。また、今回のCH・TG法を自動電気泳動装置であるエパライザ2 Jrを用いる AG法に応用することとした理由は、AG法では蛋白分画や酵素のアイソザイム検査を含めて、電気泳動後に染色することを基本としているためである。リポ蛋白分画は、AG法に比べより分離能の高いPAG法も普及しているが、このPAG法はSudan Black Bで前染色した後、各リポ蛋白を電気泳動で分離することで自動化を可能としている。そのため、PAG法では自動化するために脂溶性色素を用いることが不可欠であり、仮に酵素法で染色する方法を応用する場合には、泳動後にゲル管からゲルを取り出し、その後染色する必要があり<sup>16)</sup>、酵素法による自動化は困難となる。私たちはこの点を考慮してAG法にCH・TG法を応用することとした。

脂質異常症患者検体70例を対象に、CH·TG法と従来 のFat red法によるリポ蛋白分画を行い比較検討したと ころ、CH·TG法はFat red法とは異なり、エパライザ 2Jrを用いて全自動化が可能であった。また、CH·TG法 による各リポ蛋白の分画パターンは、Fat red法による それと類似し、しかもLDLとVLDL分画のピーク幅が 狭く、Fat red法に比べ両者の分離がより明瞭となった (Fig 2)。これは、酵素法を利用したホルマザン系染色 が脂溶性色素を用いる方法に比べより不溶性が高い染色 法となること、およびCH·TG法がPLを染色しない方 法であることに起因しているものと推測される。PLは リポ蛋白を構成する代表的な脂質であるが、PLの増減 はTCの増減とほぼ並行し、その量はVLDLよりもLDL 中に多く含まれる。そのため、CHとTGを染色する CH·TG法は、すべての脂質を染色するFat red法に比 べ、LDLとVLDLの境界をより明瞭にすることが可能 となると考えることができる。

また、CH·TG法(y)とFat red法(x)による各り ポ蛋白分画の相関関係を調べたところ、両者の相関関係 は良好であったが、CH·TG法では、全ての例でHDL分 画が低値、逆にVLDLおよびLDL分画が高値となった (Fig 3)。これは、HDL粒子は他のリポ蛋白と比較し てPLの含有割合が多く、CH·TG法がPLを染色してい ないことに起因するものと考えられた。また、回帰式の 傾きは各リポ蛋白で異なり、HDL分画ではほぼ1.0であ ったのに対して、VLDLやLDL分画におけるそれらは、 それぞれ1.26、1.27と高値となった。そのため、特に、 VLDL分画では分画値30%付近を境に両者のVLDL分 画に逆転現象が認められ、高TG群ではCH·TG法が有 意に高値、また低TG群では逆に低値となった(Table 2, Fig 5)。そして、CH·TG法とFat red法における両者の VLDL分画の差は、TG/TL比が高値になる例ほど CH·TG法VLDL分画が高値、逆にTG/TL比が低値に なるほどFar red法によるVLDL分画が高値となった。 このような傾向は、LDL分画とCH/TL比についても同 様であった。これらの結果から、CH·TG法はFat red 法に比べ、脂質異常症の診断基準となるCHやTGの増 減をより反映しやすいリポ蛋白分画法であると結論づけ られた。

またCH・TG法は、酵素法によりCHとTGの分子数の和に比例した染色となることから、分画している脂質が明確となるメリットも有している。それは、ECおよびFCはすべてFC(分子量387)として測定しているため、仮にTGの分子量を886(トリオレインの分子量)と考えれば、CH・TG法では、TC+TG/2.29量(2.29は886/387)を、それぞれ、HDL、LDL、VLDLなどの各リポ蛋白に分画していることになる。したがって、Fatred法に比べリポ蛋白として分画している総量を明確にしていることになり、それによって、TC、HDL-C、LDL-C、TGなどの各脂質測定値とFriedewaldの式<sup>8)</sup>とを組み合わせることで、各リポ蛋白中のTG量を算出することも可能となる<sup>17)</sup>と考えられる。

#### 5. 結論

今回、従来の脂溶性色素を用いるリポ蛋白分画法の問題点を改善するため、酵素法によりCHとTGの和を染色する新たなリポ蛋白分画法を開発し、Fat red法との比較を行った。その結果、新たに開発したCH·TG法は従来のFat red法に比べ、測定している脂質が明確となる、LDLおよびVLDL分画の境界が明瞭となる、および脂質異常症の診断基準であるCHおよびTGの増減をより反映しやすい、などのメリットを有する新たな全自動リポ蛋白分画法であると結論付けられた。

本論文の一部は日本臨床検査自動化学会第50回大会 (2018年10月神戸) 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

- 川出真坂.血中脂質定量法のあゆみ.Medical Technology 1980;8(12):989-993
- Abell LL, Levy BB, Broddie BB, et al. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. J Biol Chem 1952; 195(1):357–366
- Richmond W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from Nocardia sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. Clim Chem 1973;19(12):1350– 1356
- Allain CC, Poon LS, Chan CS, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem 1974;20(4):470-475
- Eggstein M, and Kreutz FH. A new determination of the neutral fats in blood serum and tissue. I. Principles, procedure, and discussion of the method. Klin Wschr 1966;44(5):262-267
- Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated a -cyclodextrin. Clin Chem 1995;41(5): 717-723
- Sugiuchi H, Irie T, Uji Y, et al. Homogeneous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock copolymer and α-cyclodextrin sulfate. Clin Chem 1998;44(3):522-531
- 8) William TF, Robert IL, and Donald SF. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972; 18(6): 499–502
- Noble RP. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. J Lipid Res 1968;9(6): 693-700
- Kalab M, and Martin WG. Electrophoresis of pig serum lipoproteins in agarose gel. Anal Biochem 1968;24(2):218-225
- Narayan KA, Creinin HL, and Kummerow FA.
   Disc electrophoresis of rat plasma lipoproteins. J
   Lipid Res 1966;7(1):150-157
- 12) 熊坂一成. リポ蛋白分画法. 1979;7(13):1322-1330
- 13) 北川豊子、堤亜樹子、香川順ほか、生活習慣の脂質 検査値に及ぼす影響。東女医大誌 2001;71(11·12): 806-822
- 14) 内藤周幸. 高脂(質)血症および高リポ蛋白血症の概念と分類—Fredrickson分類とWHO分類を中心に一.

- 日本臨床 1975;33(11):3139-3146
- 15) 日本動脈硬化学会. 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2017 年度版 2017
- 16) 浦田武義. 電気泳動法によるリポ蛋白分画法. 臨床
- 検査 1985;29(11):1344-1532
- 17) 山口奈摘美, 田中満里奈, 巖崎達矢ほか. 酵素法でコレステロールとトリグリセライドの和を染色する全自動リボ蛋白分画の開発. 臨床化学 2019;48(supp.1):189

### 血清肝線維化マーカーに及ぼす腎機能の影響に関する検討

Effect of Renal Function on Serum Liver Fibrosis Markers.

黑沢貴之 矢島智志 山﨑悦子

**Abstract** We have examined the effects that renal function alters the value of serum liver fibrosis markers. The subjects were adult patients within reference range at our hospital. We compared four serum liver fibrosis markers by chronic kidney disease (CKD) stages G1-G5. Autotaxin has no effect on renal function. On the other hand, type IV collagen 7S had a minor influence, and Mac2 binding protein glycosylation isomers (M2BPGi) and hyaluronic acid had a relatively large influence on renal function. When we test for liver fibrosis markers, we concluded that it is important to recognize the effect of the renal dysfunction.

Key words liver fibrosis marker, renal function, autotaxin

#### 1. はじめに

慢性肝疾患の治療目標は肝硬変への進展や肝癌の発症 を回避することであり、肝線維化はこれら慢性肝疾患の 終末病態への進行と深く関係していることが示されてい る1)。慢性肝疾患患者の肝線維化状態を把握することは、 治療介入時期や方法、肝癌検査の頻度を決める上で欠か せない検査である。肝線維化の診断は組織学的に評価す る肝生検が現在でもゴールドスタンダードとされてい る2が、侵襲性が大きく、出血などの重篤な合併症を起 こす可能性がある。そのため、非侵襲的な検査であるフ ィブロスキャン等の超音波エラストグラフィー、FIB-4 インデックスのように血液生化学的検査データである AST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ). ALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ) 3). 血小板 数を用いたスコアリングシステムや血清肝線維化マーカ ーであるヒアルロン酸、Ⅳ型コラーゲン・7S、Mac-2 結合蛋白糖鎖修飾異性体 (M2BPGi) 等が用いられてい

る4)。血清マーカーは目的疾患以外の併存疾患や,生理的要因の影響を受けることが避けられないため,それらの影響を考慮しなければならない。特に腎機能は血清マーカーに影響を及ぼすことが知られており,IV型コラーゲン・7Sは腎機能低下で上昇すると報告されている5)。2018年6月,新たな血清肝線維化マーカーとしてオートタキシン(ATX)が保険収載された。今回われわれは新規マーカーであるATX及びその他の肝線維化マーカーにおける腎機能の影響を検証したので報告する。

#### 2. 対象・方法

対象はASTならびにALTが当院基準値上限未満 (AST < 30U/L, ALT < 42U/L男 性, ALT < 23U/L 女性)の18歳以上男女180人とした。本対象者からHBs 抗原陽性、HCV抗体陽性、血小板15万以下、FIB-4インデックス2.67以上のいずれかに該当した5人を除外して、175人を評価対象とした(Fig. 1)。ATX、M2BPGi、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン・7S測定はそれぞれEテスト「TOSOH」II(オートタキシン)(東ソー株式会社)、HISCL M2BPGi試薬(シスメックス株式会社)、エルピアエースHA(株式会社LSIメディエンス)、IV型コラーゲン・7Sキット(セティ・メディカルラボ株式会社)を使用した。

推算糸球体濾過量eGFR (ml/min/1.73m²) は194×血清クレアチニン $^{-1.094}$ ×年齢 $^{-0.287}$ (女性の場合は×0.739) より算出し、慢性腎臓病 (CKD) ステージはG1, G2, G3, G4, G5それぞれeGFR $\geq$ 90, 90>eGFR $\geq$ 60, 60>eGFR $\geq$ 30, 30>eGFR $\geq$ 15, 15>eGFRにより分類

Received Jun. 28, 2019; Accepted Jan. 30, 2020 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

Corresponding author: Etsuko YAMAZAKI

TEL: 045-787-2511 (代)

E-mail: kuro32@vokohama-cu.ac.jp

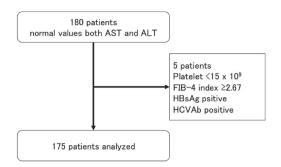


Fig. 1 Flow chart showing the inclusion of the patients without liver failure in this study.

Table 1 Baseline clinical characteristics of 175 patients

·	Number	Median (IQR)
Sex (male/female)	87/88	
CKD stage		
(G1/G2/G3/G4/G5)	59/59/38/8/11	
Age		57 (43 - 70)
ALT (IU/L)		12.0 (10.0 - 14.8)
AST (IU/L)		17.0 (14.3 - 19.0)
BMI (Body Mass Index)*		21.3 (18. 9 - 23.9)
LDH (IU/L)		160 (141 - 176)
Creatinine (mg/dL)		0.77 (0.61 - 1.08)
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )		72.7 (50.6 - 95.0)
CRP* (mg/dL)		0.10 (0.04 - 0.48)
WBC (x10 <sup>3</sup> / μ L)		5.7 (4.6 - 7.6)
Platelet (x10³/μL)		251 (211 - 314)
FIB-4 index		0.95 (0.68 - 1.39)
Type IV collagen 7S (μ		
g/L)		3.9 (3.4 - 4.8)
Hyaluronic acid(μg/L)		31.0 (18.0 - 68.8)
M2BPGi (C.O.I)		0.66 (0.42 - 0.97)
ATX (mg/L)		0.70 (0.61 - 0.82)

IQR: interquartile range, \* BMI(n=140), CRP (n=148)

した。なお、本試験は横浜市立大学附属病院倫理委員会 承認のもと実施している。

#### 3. 結果

評価対象者は男性87例、女性88例で、CKDステージ別では $G1\sim G5$ においてそれぞれ59例、59例、38例、8例、11例であった。年齢の中央値は57歳であり、それぞれの項目の詳細は $Table\ 1$ に示す。

eGFRに対する関連項目の相関性をスピアマン順位相関により検証した(Table 2)。肝線維化を反映する項目では血小板数,FIB-4インデックス,ヒアルロン酸ならびにM2BPGiで有意差を認め(p < 0.05),IV型コラーゲン・7SならびにATXでは有意な相関性は認められなかった。さらに腎機能をCKDステージ別に分類した際の各肝線維化マーカーの濃度分布を箱ひげ図で示す(Fig. 2)。CKDステージと各 肝線 維 化マーカーの関連性を

**Table 2** Correlation coefficients between eGFR and other clinical parameters using Spearman's test.

	rho	P
Age	-0.329	< 0.001
ALT	0.147	0.052
AST	0.070	0.357
BMI	-0.297	< 0.001
LDH	-0.320	< 0.001
Creatinine	-0.882	< 0.001
CRP	0.023	0.779
WBC	-0.119	0.117
Platelet	0.154	0.042
FIB-4 index	-0.352	< 0.001
Type IV collagen 7S	0.015	0.843
Hyaluronic acid	-0.251	< 0.001
M2BPGi	-0.179	0.018
ATX	-0.026	0.729

**Table 3** Comparison between eGFR  $\geq$  60 and 60 > eGFR groups

	eGFR≧ 60	60 > eGFR	
	(n = 118)	(n = 57)	P *
	Median (IQR)	Median (IQR)	
Age	49 (40 - 68)	65 (55 - 75)	< 0.00
ALT	12.5 (10 - 15)	12 (9 - 14)	0.288
AST	17 (15 - 19)	16 (14 - 18)	0.281
BMI**	20 (18 - 23)	23 (20 - 24)	0.002
LDH	152 (138 - 172)	168 (158 - 181)	< 0.00
Creatinine	0.65 (0.55 - 0.77)	1.21 (1.08 - 2.13)	< 0.00
eGFR	89.9 (72.2 - 99.2)	41.9 (24.7 - 50.3)	< 0.00
CRP**	0.10 (0.04 = 0.43)	0.17 (0.05 - 0.72)	0. 288
WBC	5.5 (4.2 - 6.9)	6.7 (5.2 - 8.1)	0.005
Platelet	259 (213 - 320)	229 (203 - 281)	0.053
FIB-4 index	0.91 (0.64 - 1.18)	1.21 (0.88 - 1.71)	< 0.00
Type IV collagen 7S	4.0 (3.4 - 4.8)	3.9 (3.5 - 4.6)	0.909
Hyaluronic acid	28 (13 - 57)	40 (25 - 100)	0.003
M2BPGi	0.58 (0.40 - 0.91)	0.76 (0.59 - 1.06)	0.011
ATX	0.69 (0.59 = 0.84)	0.71 (0.63 - 0.78)	0. 788

\*: Mann-Whitney U-test, \*\*: BMI (n=86/n=54), CRP (n=102/n=46)

Jonckheere-Terpstra Testにて検証した結果、M2BPGi, ヒアルロン酸, FIB-4インデックスにおいて有意差を認め、 腎機能の低下の影響を示唆する結果であった。

さらに腎機能の分類をeGFR≥60の正常群とeGFR<60の腎機能低下群の2群に分け、各マーカーの2群間をMann-Whitney検定を用いて比較した。その結果、M2BPGi、ヒアルロン酸、FIB-4インデックスにおいて有意差を認め、腎機能の低下群で高値を示すことが明らかであった(Table 3)。腎機能低下により濃度上昇が認められた肝線維化マーカーM2BPGi、ヒアルロン酸、FIB-4インデックスにおいてeGFRの計算構成因子である血清クレアチニンと年齢いずれの因子に起因する濃度上昇であるか検証するため多変量解析を行った。なお、FIB-4

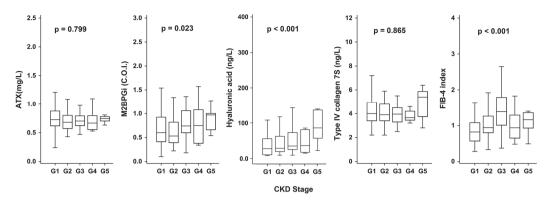


Fig. 2 Correlation between serum fibrosis marker and CKD stage. The top and bottom of each box represent the first and third quartiles, respectively. The limes across the boxes indicate median values. P-values represent the significance by Jonckheere-Terpstra trend test.

Table 4 Multiple regression analysis

	Multiple re	Multiple regression		
	Hyaluronic acid			
Age	< 0.001	< 0.001		
Creatinine	< 0.001	0.604		

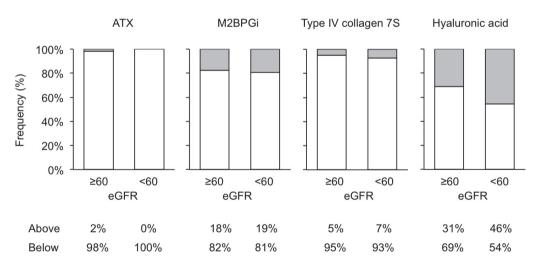


Fig. 3 Frequency of patients above or below cuff-off value of each fibrosis marker.

インデックスはその計算構成因子に年齢を含むため解析対象から除外した。重回帰解析の結果、ヒアルロン酸のみが年齢、血清クレアチニンともに有意差を認めた (Table 4)。

さらに腎機能正常群と低下群の2群での、ATX、 M2BPGi. ヒアルロン酸. IV型コラーゲン・7S測定値が 各マーカーのカットオフ値を超える偽陽性を示す頻度を 検証した。各マーカーのカットオフ値は検査薬添付資料 を参考にATXは男性0.91mg/L, 女性1.27mg/L, M2BPGi は1.0 C.O.I, ヒアルロン酸は50μg/L, IV型コ ラーゲン・7Sは6μg/Lとした。ATXではカットオフ値 を超える偽陽性患者は約1%(2例/175例)と腎機能に かかわらず肝疾患を有さない患者群で偽陽性を示すこと が稀であることが確認された。M2BPGiにおいては18% (32例/175例), ヒアルロン酸においては36% (63例/ 175例)、IV型コラーゲン・7Sでは6%(10例/175例) であった (Fig. 3)。ヒアルロン酸では腎機能低下に伴い 偽陽性頻度が増えること、M2BPGiならびにⅣ型コラー ゲン・7Sでは偽陽性頻度が腎機能にかかわらないことが 示唆された。

#### 4. 考察

腎機能の影響により各血清線維化マーカーの変動を検 証した結果、ATXは腎機能の影響を受けないこと、IV 型コラーゲン・7Sが比較的影響を受けないことが確認 された。ATXは、産生5分後には、その約60%が肝臓 に取り込まれ分解された後、24時間後には約70%が尿 中に排泄されることが知られている<sup>6)</sup>。ATXが腎機能 能影響を受けない理由としては肝臓で分解された後は、 酵素活性が消失することに加え2抗体サンドイッチ測定 を原理としたオートタキシン測定試薬で分解産物を測り こまれないことによるものと推察される70。また、Ⅳ型 コラーゲン・7Sに関しては腎機能の影響を受けること が既報で報告されているが、今回我々が対象とした母集 団では軽微な影響であった。一方、M2BPGiとヒアルロ ン酸はeGFR低下に伴い濃度上昇が認められ、M2BPGi は腎機能より年齢に依存した濃度上昇、ヒアルロン酸は 年齢ならびに腎機能両者により濃度上昇することが示唆 された。肝疾患を有さない患者群において、M2BPGiな

らびにヒアルロン酸は年齢や腎機能の影響を受ける事が 示唆された。

#### 5. 結語

肝線維化診断時には様々な要因を考慮した上でマーカー選択が必要であることが示唆された。今回の評価は175 例と少ない母集団での評価だが、腎機能正常キャリアや腎不全によりALTが正常な患者を含んでいる可能性がある。また、同一患者における透析前後では、各血清線維化マーカーの測定値変動が予想され、今後さらなる検証が必要と考える。

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

- Ge PS, Runyon BA. Treatment of Patients with Cirrhosis. N Engl J Med 2016;375:767-777.
- Bravo AA, Sheth SG. Chopra S. Liver biopsy. N Engl J Med 2001;344:495-500.
- Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. Hepatology 2006;43, 1317–1325.
- 4) Umemura T, Joshita S, Sekiguchi T, et al. Serum Wisteria floribunda Agglutinin-Positive Mac-2-Binding Protein Level Predicts Liver Fibrosis and Prognosis in Primary Biliary Cirrhosis. Am J Gastroenterol 2015;110:857-864.
- Inomata S, Itoh M, Sata T. Difference of serum levels of type IV collagen 7 between early or overt nephropathy and nondiabetic renal disease in diabetic patients with micro-macroalbuminia. Nephron 1996;73(4):601-605.
- 6) Jansen S, Andries M, Vekemans K, et al. Rapid clearance of the circulating metastatic factor autotaxin by the scavenger receptors of liver sinusoidal endothelial cells. Cancer Lett 2009;284: 216-221.
- Ikeda H, Kobayashi M, Kumada H, et.al. Performance of autotaxin as a serum marker for liver fibrosis. Ann Clin Biochem 2018;55:469-477.

# 抗パーキンソン病薬レボドパ・カルビドパ配合剤による ALT 値への影響と対策

Influence to ALT Value by the Levodopa Carbidopa of Parkinson's Disease Drugs and the Countermeasures

林 智弘 倉津幸恵 村上由美 西川昌伸

**Abstract** There have been reports of cases in which the ALT value increases in the serum of patients taking levodopa and carbidopa, Parkinson's disease drugs. As a result of interference tests of the components of this drug, it was revealed in vitro that the carbidopa inhibits the ALT activity to a low value and then increases over time. Furthermore, it was confirmed that the ALT value in the serum group of patients taking this drug was significantly increased even after 24 hours.

**Key words** levodopa carbidopa, alanine aminotransferase, influence of drugs

#### 1. はじめに

今日に至るまで、臨床検査値に影響を及ぼす薬剤の影響は数多く報告されている<sup>1)2)</sup>。薬剤が引き起こす異常値の発生には、薬物および代謝産物が分析に与える影響と、薬理作用により生物学的変化を引き起こす影響に分けられる<sup>3)</sup>。我々は医師の誤った判断を防ぐためにも、薬剤が引き起こす影響を把握し適切に対応する必要がある。

当院では、抗パーキンソン病薬であるレボドパ・カルビドパ配合剤を内服している患者血清において、ALT値が経時的に上昇する例を経験し検討を行ってきた $^4$ )。 さらに、他施設においても抗パーキンソン病薬による同様の報告がなされている $^5$ )。今回、改めて本薬剤がALT値活性に影響を与える検討を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,外 来患者およびドック健診センターの日常検査後の残余血清

Received Dec. 26, 2019; Accepted Jan. 22, 2020 Tomohiro HAYASHI, Sachie KURATSU, Yumi MURAKAMI, Nishikawa MASANOBU

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 および管理試料を用いた。なお本研究は、松下記念病院倫理委員会の承認を得て実施した(番号:18024)。

#### 2) 測定機器および試薬

測定機器にはLABOSPECT 008 a とLABOSPECT 006 (日立ハイテクノロジーズ社) を用い、ALT測定試薬には、「Lタイプワコー ALT・J2」(富士フィルム和光純薬株式会社)を使用した。

#### 3) 材料

レボドパ添加試験にはL-ドーパ(ナカライテスク株式会社)を、カルビドパ添加試験にはカルビドパ無水物(シグマアルドリッチジャパン合同会社)を、レボドパ・カルビドパ配合剤添加試験には当院で使用しているカルコーパ<sup>®</sup>配合錠L100:レボドパ100mg、カルビドパ無水物10mg含有(共和薬品工業株式会社)を用いた。ALTのアポ型をホロ型にする補酵素であるピリドキサルリン酸(以下、PALP)の添加試験には、ピリドキサルリン酸(富士フィルム和光純薬株式会社)を用いた。

#### (1) レボドパ溶解液

レボドパ添加試験では、次の試薬を調製し検討に用い

#### 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

t - -

- ①レボドパ溶解液 (52.6mg/dL): L-ドーパ52.6mg を秤取し蒸留水100mLで溶解して調製した。
- ②レボドパ溶解液(①溶解液×1/10濃度):①レボドパ溶解液を蒸留水で10倍希釈し調製した。
- ③レボドパ溶解液(①溶解液×1/100濃度):②レボドパ溶解液を蒸留水で10倍希釈し調製した。
- ④レボドパ溶解液 (①溶解液×1/1000濃度):③レボドパ溶解液を蒸留水で10倍希釈し調製した。

#### (2) カルビドパ溶解液

カルビドバ添加による試験では、次の試薬を調製し検 討に用いた。

①カルビドパ溶解液(5.68mg/dL): カルビドパ無水物 5.68mg秤取し蒸留水100mLで溶解して調製した。さらに、レボドパ溶解液と同様、②カルビドパ溶解液(①溶解液×1/100濃度)、③カルビドパ溶解液(①溶解液×1/100濃度)を調製した。

#### (3) レボドパ・カルビドパ溶解液

レボドパ・カルビドパ配合剤添加による試験では,次の試薬を調製し検討に用いた。

①レボドパ・カルビドパ配合剤溶解液(100mg/L): カルコーパ<sup>®</sup>配合錠L100を1錠粉砕した後,100mg秤取し蒸留水1000mLに入れ,65℃10分加温しよく混和後,37℃で1日スターラーにて攪拌溶解してレボドパ・カルビドパ配合剤溶解液(100mg/L)を作製した。さらに、レボドパ溶解液と同様、②レボドパ・カルビドパ配合剤溶解液(①溶解液×1/10濃度)、③レボドパ・カルビドパ配合剤溶解液(①溶解液×1/10濃度)、④レボドパ・カルビドパ配合剤溶解液(①溶解液×1/100濃度)を調製した。

#### (4) PALP溶解液

PALP添加試験では、①PALP溶解液 (0.5 mmol/L)、 ②PALP溶解液 (1.0 mmol/L)、 ③PALP溶解液 (10 mmol/L) を各100mL調製し検討に用いた。

#### 4) 統計学的手法

レボドパ・カルビドパ配合剤内服検体の解析における 初検値と24時間後値の比較にはWilcoxonの符号順位検 定も用いて評価した。有意水準は5%未満とした。解析 ソフトにはStatflex ver.7(アークテック株式会社)を 用いた。

#### 3. 検討内容

1) In vitro下での各成分添加によるALT値の経時変動 レボドパ・カルビドパ配合剤の主成分であるレボドパ・ カルビドパ、およびレボドパ・カルビドパ配合剤の各溶解液を管理試料であるQAPトロール  $\Pi$  (シスメックス社), 当検査科職員の薬剤未内服の健常成人ボランティア1名の血清(以下、ボランティア血清)に1:1(250 $\mu$ L:250 $\mu$ L)の割合でそれぞれ添加して試料を作製した。 また、生理食塩水を同量添加した試料を対照とした。 各成分を添加後30分、8時間、24時間、48時間でALT値を測定した(n=2)。試料は測定まで密栓状態で室温(24  $\pm$  2°C)下にて保存した。薬剤の影響の評価は、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を参考に $^6$ 、各測定値が対照試料値 $^\pm$  CVa%(ALT:5%)を超えた場合を影響ありとした。なお、ALT値の他にAST、LD、総蛋白値も測定した。

#### 2) PALP添加試験

レボドパ、カルビドパ、およびレボドパ・カルビドパ 配合剤の各②溶解液  $1000~\mu$  Lをそれぞれボランティア血清  $1000~\mu$  Lに添加後、30分室温にてインキュベーションし、3種類の薬剤添加血清(以下、3薬剤添加試料)を作製した。また、生理食塩水を各薬剤溶解液と同量添加した試料(以下、3薬剤対照試料)を対照とした。さらに、3薬剤添加試料および3薬剤対照試料200 $\mu$ Lに3濃度のPALP溶解液を $50~\mu$ L直接添加し、 $20~\rho$ 間 37℃で加温後にALT値を測定した(n=2)。なお、PALP溶解液の代わりに、生理食塩水を同量添加したものをPALP未添加の対照とした。

#### 3) 保存条件の違いによる ALT 値の経時変動

PALP添加試験と同様に作製した3薬剤添加試料と3薬剤対照試料を,透明のポリスピッツ(光曝露状態)および遮光のポリスピッツ(遮光状態)にて室温・環境光下にて保存した。各成分を添加後30分,8時間,24時間,48時間で250μLずつ用いてALT値を測定した(n=2)。

#### 4) カルコーパ®配合錠内服検体の解析

2019年8月から2019年11月までに当院を受診した外来・入院患者において、カルコーパ®配合錠L100が処方され、十分に残余血清が確保できた患者血清29例を用いた(男性12例、女性17例、61-88歳)。

#### ① 経時変動の検討

カルコーパ配合錠®内服患者血清を $500 \mu$ Lサンプルカップにとり、採血直後(初回値)と24時間後にALT値を測定した。対照として当院職員およびドック健診センターを受診した健常者血清のALT値も測定した(n=2)。なお、ALT値の他にAST、LD、総蛋白値も測定した。各検体に対して初回値を基点とし、24時間後値の変動割合%が $\pm$ CVA%(ALT:5%)以上を変動ありとした。

T 1 1 4	01	-	. • .			
Table 1	Characteristics	O†	natients	1n	recovery	test

No	Sex	Initial ALT value (U/L)	ALT value after 24 hours (U/L)	Prescribed dose of carcopa tablet L100
Patient 1	M	49.2	112.8	6 Tabs a day, in three times a day
Patient 2	F	19.3	31.7	1.5 Tabs a day, in three times a day

	ALT value of QAP II (U/L)						
	30m 8h 24h 48h						
<b>1</b> solution	47.3	32.4	19.3	13.4			
2 solution	47.2	43.0	35.2	28.1			
3 solution	47.2	44.2	41.3	36.4			
4 solution	47.6	44.4	41.4	36.5			
Control	46.9	44.1	41.2	36.4			

	ALT value of volunteer serum (U/L)			
	30m	8h	24h	48h
1solution	30.2	28.0	24.1	22.3
2 solution	30.1	29.4	29.0	25.0
3 solution	30.3	29.7	29.5	26.3
4 solution	30.2	29.6	29.3	27.3
Control	30.3	29.4	29.2	27.4

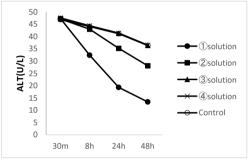


Fig. 1a Change of ALT values of QAP  ${\rm II}$ .

35
30
125
25
25
25
30
20
30tion
30tion
Control
30m
8h
24h
48h

Fig. 1b Change of ALT values of volunteer serum.

Fig. 1 Change of ALT values of levodopa addition.

	ALT value of QAP II (U/L)				
	30m	8h	24h	48h	
<b>1</b> solution	5.6	5.2	30.0	31.0	
2 solution	8.4	9.2	29.1	37.5	
3 solution	34.6	28.4	39.5	36.3	
4 solution	48.4	46.2	41.4	39.3	
Control	48.6	46.3	41.0	39.1	

	ALT value of volunteer serum (U/L)			
	30m	8h	24h	48h
<b>1</b> solution	1.9	3.1	5.0	21.0
2 solution	4.2	7.2	15.1	23.2
3solution	18.2	17.2	27.3	26.4
4 solution	30.1	29.8	29.0	27.2
Control	30.8	29.4	29.2	27.1

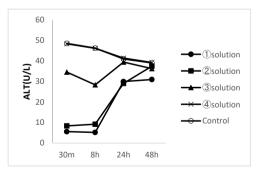


Fig. 2a Change of ALT values of QAP  ${\rm II}$  .

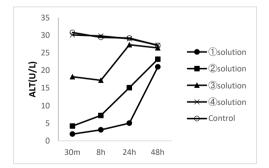


Fig. 2b Change of ALT values of volunteer serum.

Fig. 2 Change of ALT values of carbidopa addition.

#### ② 添加回収試験

経時変動の検討に使用したカルコーパ®配合錠内服患者2名の患者血清を使用して(**Table 1**), 患者血清とボランティア血清を等量混和し30分後, 90分後にALT値を測定し回収率を求めた。回収率(%)は, 回収値/理論値×100として計算した<sup>7</sup>。

#### 4. 結果

#### 1) In vitro下での各成分添加によるALT値の経時変動

レボドパ添加試料では、30分後ではいずれの濃度も影響は認めなかった。30分後以降は、いずれの濃度も対照試料と同様に経時的にALT値の低下が認められた。特に①、②溶解液添加試料において、QAPトロールⅡ、ボランティア血清いずれも対照試料より大きく低下し、レボドパ添加濃度に依存した低下を示した(Fig. 1)。カルビドパ添加試料では、QAPトロールⅡ、ボランティア血清いずれも対照と比して、添加後30分において③溶解液添加濃度まで添加濃度依存的に低値の影響を認めた。低値に影響を認めた試料は、30分後以降経時的に上昇を認め、48時間後では対照試料と同等程度の値となった(Fig. 2)。レボドパ・カルビドパ配合剤添加試料の変動は、カルビドパ添加試料と同様の傾向を示した(Fig. 3)。また、同時に測定したAST、LD、総蛋白値は薬剤の影響を認めなかった。

#### 2) PALP添加試験

①,②,③PALP溶解液(終濃度:0.1,0.2,2 mmol/L)を3薬剤添加試料および3薬剤対照試料に添加した結果をTable 2に示した。対照も含めPALP溶解液各濃度でALT値の上昇を認めた。特にカルビドパおよびレボドパ・カルビドパ配合剤試料における③PALP溶液(終濃度:2 mmol/L)での上昇率は対照と比して大きかった。

#### 3) 保存条件の違いによるALT値の経時変動

レボドパ添加試料の変動は、対照試料と同様、光曝露および遮光保存下で変動に差は認めなかった。一方、カルビドパ添加試料とレボドパ・カルビドパ配合剤添加試料では、光曝露状態下と遮光状態下で明らかな差を認めた。光曝露状態下の方が、添加8時間値以降、対照試料値程度まで速やかに上昇し回復した(Fig. 4)。

#### 4) カルコーパ®配合錠内服検体の解析

#### ① 経時変動の検討

カルコーパ<sup>®</sup>配合錠内服群は、対照の低下傾向とは異なり、24時間後にALT値が有意に上昇する結果となり (Fig. 5)、27/29 例で5%以上の上昇を認めた。最も上昇したもので初回値:49.2 U/L、24時間後値:112.8 U/Lであった。また、同時に測定したAST、LD、総蛋白

値では、カルコーパ®配合錠内服群と対照の変動との差は認めなかった。

#### ② 添加回収試験

各30分後,90分後のALT値の回収率(%)は,96.1 ~98.1%であった(**Table 3**)。

#### 5. 考察

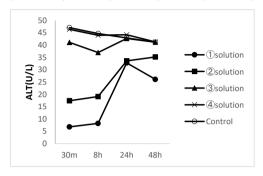
In vitroの検討においてカルビドパがALT値を阻害し低値の影響を与え、その後経時的に上昇するという報告がされている<sup>4/5)</sup>。今回の検討においても、カルビドパ単独およびレボドパ・カルビドパ配合剤の添加濃度が高いほどALT値のみ低値の影響を受け、その後活性値は経時的に上昇し回復することが明らかとなった。さらに今回、レボドパ添加濃度が高いほどALT値の経時的な低下の程度は大きかったことより、レボドパ・カルビドパ配合剤添加の経時変動では、添加濃度によりレボドパとカルビドパの両者の影響を受けると考えられた。また、今回用いたレボドパ・カルビドパ配合剤は後発品の1種であるカルコーパ®配合錠であるが、他のカルビドパを含むレボドパ製剤でも同様の影響を認めたと報告されている<sup>5)</sup>。なお、いずれの添加血清においてもALTの反応過程および吸収スペクトルは、健常血清と比較して異常はみられなかった。

実際、パーキンソン病の治療として、カルビドパはカルビドパ単独で用いられるものではなく、レボドパ・カルビドパ配合剤(レボドパ10:カルビドパ1含比)として脳内のドパミン補充薬として汎用されている®。その役割は、末梢性レボドパ脱炭酸酵素阻害剤として、投与されたレボドパが脳内移行前に末梢で代謝されるのを抑制するものである®。また、レボドパ・カルビドパ配合剤の種類は、先発品、後発品も含めて多数存在し、投与量は患者の症状等により様々であるが、各種レボドパ・カルビドパ配合剤のインタビューフォームに表記されている標準投与量および薬物動態情報からも101111121、今回の添加試験で影響を認めた添加濃度は、投与量や代謝状態によるが臨床上考えられる濃度である。

さらに、通常、ALT値の経時変動は低下傾向を示すが<sup>13)</sup>、カルコーパ®配合錠内服検体の経時変動の結果において、24時間後値は初回値に対して有意に上昇し、その変動はin vitroの検討と同様の変動を示したことから、カルビドパの影響により低値の影響の阻害を受け、その後活性値が上昇すると考えられた。しかし、今回の添加回収試験では、カルコーパ®配合錠内服血清が、他の患者血清のALT値を阻害する影響は確認できなかった。これは、内服患者血清中には既にALTを阻害する能力が無い、あるいは影響を与えるための血清中の薬剤成分濃度、インキュ

	AL'	ALT value of QAP II (U/L)			
	30m	8h	24h	48h	
1solution	6.8	8.2	32.8	26.1	
2 solution	17.4	19.1	33.6	35.2	
3solution	41.1	37.0	42.7	41.2	
4 solution	46.4	44.0	44.2	41.3	
Control	47.1	44.7	42.9	41.2	

	ALT value of volunteer serum (U/L)			
	30m	8h	24h	48h
<b>1</b> solution	2.9	3.2	12.2	16.8
2 solution	3.1	5.3	12.9	22.7
3solution	8.8	13.1	23.8	24.8
4 solution	25.1	24.4	27.4	26.7
Control	29.1	28.4	27.9	27.1



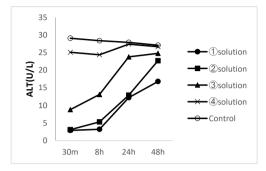


Fig. 3a Change of ALT values of QAP  $\rm II$  .

Fig. 3b Change of ALT values of volunteer serum.

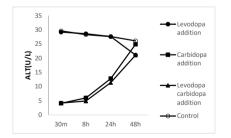
Fig. 3 Change of ALT values of levodopa carbidopa addition.

Table 2 Change of ALT values by PALP addition.

	Saline addition	①PALP addition	②PALP addition	③PALP addition
Levodopa addition	20.8	22.5	22.9	29.4
Carbidopa addition	3.3	7.7	8.3	18.9
Levodopa carbidopa addition	2.5	4.3	5.6	19.7
Control	20.2	21.9	22.8	30.7

	ALT value in light exposure(U/L)			re(U/L)
	30m 8h 24h			
Levodopa addition	29.2	28.6	27.6	21.1
Carbidopa addition	4.1	6.0	12.8	24.9
Levodopa carbidopa additio	4.2	4.9	11.4	21.1
Control	29.6	28.3	27.6	26.1

	ALT value in shading(U/L)			U/L)
	30m	8h	24h	48h
Levodopa addition	29.9	28.9	26.7	21.0
Carbidopa addition	4.6	5.8	8.3	14.9
Levodopa carbidopa addition	4.3	4.7	10.4	13.7
Control	30.2	28.9	28.1	26.0



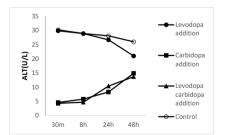


Fig. 4a Change of ALT values in light exposure.

Fig. 4b Change of ALT values in shading.

Fig. 4 Change of ALT values by light conditions.

ベーション時間が不足していた可能性も考えられる。なお、ALT は主に肝臓に存在し、他の臓器や組織に含まれる量は少ないため、肝細胞が傷害されるとその傷害の程度に応じて血中に流出する逸脱酵素であり<sup>14)</sup>、ウイルス性肝炎の治療指標などにも用いられている<sup>15)16)</sup>。今回の検討対象のカルコーパ<sup>®</sup>配合錠の内服患者では、内服前に比べてALT値の初検値は低値となりAST/ALT比が高くなる傾向にあった。また、初検値よりもプラトーに達した値の方が、より個体内変動および病態変動と合致していた。したがって、初検値で報告すると肝傷害を過小評価することが示唆された。

D-ペニシラミン, エタノール, イソニアジドなどの薬 剤が投与されると、ビタミンB6が低下し、その結果、 ALTの補酵素であるPALPが欠乏しALT値が低下するこ とが明らかとなっている<sup>17)18)</sup>。カルビドパのALT値の影 響については、生体内においてカルビドパがPALPと結合 して複合体を形成し、その結果、生体内のPALP濃度が 低下し、PALPを要する酵素反応にも影響を与える可能性 があると報告されている<sup>19)</sup>。したがって、カルビドパ添加 血清にPALPを添加して測定することにより、カルビドパ の影響が軽減・回避されるのではないか検証した。今回. IFCC法のALT測定系のPALP 0.1mmol/Lの終濃度を参 考に<sup>20)</sup>、終濃度0.1、0.2、2mmol/LになるようにPALPを 各試料に直接添加して行った。その結果、特にカルビドパ およびレボドパ・カルビドパ配合剤試料においてPALP添 加2mmol/Lでの上昇率が対照と比して最も大きかったこ とより、カルビドパがPALPに関与してALTをアポ型の 不活性状態にしている可能性が高いと考えられた。しかし、 対照もPALP濃度依存的に上昇を示したことよりPALP添 加値は、ISCC法としての報告値としては適していないと 考えられた。また、補酵素として同じくPALPを要する AST がカルビドパの影響を受けなかったことは、PALPに 対する親和性の差 (ALT > AST) が影響していると考え られた<sup>21)</sup>。

イソニアジドによるALT値の影響では、遮光状態よりも光曝露状態の方がより速やかに上昇すると報告されているが<sup>22)</sup>、今回の検討でも同様の傾向が確認された。なお、今回の検討での光曝露状態は、試料を机上に放置し環境光曝露条件下で行ったが、追加検討として、より照度の高い蛍光灯直下でも行ったところ、環境光よりもより上昇傾向が確認できたことから、照度が大きい状態で曝露した方がカルビドパ成分の阻害の影響は速やかに回避できることが示唆された。

今回の検討結果より、当院での現状の対策は、当院で 処方されたレボドパ・カルビドパ配合剤(カルコーパ<sup>®</sup>配 合錠)内服患者情報を電子カルテから抽出して、臨床検査システムの患者属性に薬剤情報を登録する。この属性登録で「特殊薬剤扱い」運用が可能となり、ALT値に自動的に「薬剤再検中(P)」のコメントが付加され、結果は仮報告扱いとなるようにしている(Fig. 6)。さらに、光に曝露した状態で血清を一定時間放置後に再測定し、ALT値の上昇が確認できなくなった時点で確定報告している。特にALT値が著しく上昇する例では臨床医に直接連絡し注意喚起している。

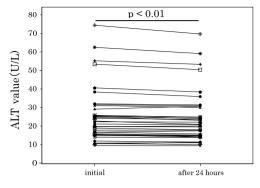
#### 6. 結語

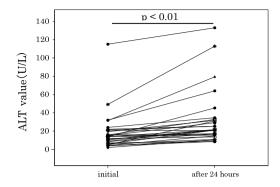
レボドパ・カルビドパ配合剤内服患者検体において ALT値が経時上昇する要因は、詳細な機序は不明だが、主成分であるカルビドパが ALT活性を一時的に阻害し、個体内変動および病態変動と合致しない偽低値の影響を 及ぼすことが明らかとなった。さらにこの阻害は、血清を光に曝露した状態で放置することでより速く解消され、活性値は回復することが確認できた。したがって、レボドパ・カルビドパ配合剤内服患者では、より正確な検査値の報告のために、ALT値をプラトー値まで達するのを確認してから報告しなければならないと考えられる。ただ、時間をおいて測定する対策では、ALT値の安定性の影響およびレボドパの経時的な負の影響を受け、さらには迅速性にも欠けるため、より効果的な偽低値の影響を回避する方法を模索する必要がある。

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) 小野猛. 臨床検査値に及ぼす薬剤の影響と医薬品の 副作用. 医療 1975;29(10):993-1001.
- D. S. Young, D. W. Thomas, R. B. Friedman et al. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Clin Chem. 1972;18(10):1041-1303.
- 山本慶和. 日常検査における自動分析異常値への対応の仕方. 日本臨床検査自動化学会誌 2010;35 (suppl-1):11-16.
- 4) 熊田至, 中島康仁, 平松利枝子ほか. INHおよび抗パーキンソン病薬剤による血清 GPT の採血後経時上昇現象. 臨床病理 1988;36(補冊):155.
- 佐藤元哉, 狩野春艶, 乾瑞起ほか. レボドパ製剤によるALTの偽低値とその対策. 臨床化学 2019;48 (suppl-1):254.
- 6)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





**Fig. 5a** Change of ALT values of control (n=36).

Fig. 5b Change of ALT values of patients taking carcopa tablet (n=29).

Fig. 5 Change of ALT values before and after 24hours.

Table 3 Recovery test.

Sar	nple	Measured time	Recovery rate (%)	
Doti	ent 1	30min	97.2	
ratio	ent i	90min	98.1	
Doti	Patient 2 30min		96.1	
ratio	ent 2	90min	97.0	

測定の許容誤差限界. 臨床化学 2006:35:144-153.

- 7) 白田亨, 阿部知世, 佐藤直仁. シクロホスファミド 投与後の血清コリンエステラーゼ活性低下原因の検 討. 医学検査 2012;61(1):3-8.
- 8) 日本神経学会(監)、パーキンソン病診療ガイドライン作成委員会(編)、パーキンソン病診療ガイドライン2018. 医学書院:東京、25-33.
- 9) 近藤智善. パーキンソン病の薬物療法の実際. Medical Practice 2013;30(1):119-123.
- 10) カルコーパ®錠L100/L250インタビューフォーム 2018年10月改訂第9版. 共和薬品工業株式会社.
- 11) ドパコール®配合錠L50/L100インタビューフォーム2019年1月改訂第9版. ダイト株式会社.
- 12) パーキストン®配合錠L100/L250インタビューフォ ーム2019年1月改訂第11版. 小林化工式会社.
- 13) 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会(編). 臨床検査のガイドライン JSLM2015. 日本臨床検査 医学会:東京, 25-30.
- 14) 佐藤和典, 松岡弘芳, 正木忠彦ほか. 肝細胞壊死を 評価する検査: AST・ALT. 消化器外科ナーシング 2013; 18(10): 927-931.
- 15) 日本肝臓学会 肝炎診療ガイドライン作成委員会編.



Fig. 6 Alert system of patients taking carcopa tablet.

B型肝炎治療ガイドライン(第3.1版). 2019;1-15.

- 16) 日本肝臓学会 肝炎診療ガイドライン作成委員会編. C型肝炎治療ガイドライン(第7版). 2019;1-9.
- 17) 上野剛, 三井田孝. ものしり臨床検査技師への道 -生化学検査編 3. トランスアミナーゼとビタミンパ ワー. Medical Technology 2015:43(6):627-635.
- 18) 浦山修,中山年正,入野勤ほか. 臨床検査学講座第 3版 臨床化学検査学. 医歯薬出版株式会社;東京, 225-228.
- 19) Luisa Airoldi, Caral J. Watkins, Jane F. Wiggins et al. Effects of pyridoxine on the depletion of tissue pyridoxal phosphate by carbidopa. Metabolism. 1978;27(7):771-779.
- 20) 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. 日本消化器病学会雑誌 1994;91(2):154-161.
- 21) 米田孝司. AST(GOT), ALT(GPT). 臨床病理レビュー 2001;116:72-80.
- 22) 熊田至, 中島康仁, 平松利枝子ほか. 採血後保存状態により経時上昇を示す血清 GPT の例. 臨床病理 1987;35(補冊):118.

原著

## 免疫グロブリン高値検体におけるキャピラリー電気泳動法と BCP改良法のアルブミン値乖離に関する検討

Investigation of Discordance between Capillary Electrophoresis Albumin and Modified BCP Albumin in High Immunoglobulin Concentration

山村彩佳 佐々木宏典 今井佳美

**Abstract** We found a sample with high globulin concentration that showed a discrepancy in albumin concentration by two methods, capillary electrophoresis (CE) method and modified bromcresol purple (BCP) method.

We investigated the effect of immunoglobulin on discordance. In samples of exceeding the reference range of IgG or IgM, albumin discordance was observed. The discordance depended on a concentration of immunoglobulin, and high performance liquid chromatography bromcresol green (HPLC-BCG) albumin concentration, which is designated comparison method of human serum albumin for evaluation of routine methods, was similar to modified BCP albumin concentration. It suggests that a CE albumin concentration might show a false elevation. We need to remember that there is a possibility of a false elevation of CE albumin concentration in case we handle a sample with high concentrations of immunoglobulin.

Key words capillary electrophoresis, modified bromocresol purple method, albumin, immunoglobulin.

#### 1. はじめに

血清蛋白分画は、血清蛋白異常症のスクリーニング検査として知られており、Monoclonal蛋白(M蛋白)や特定の蛋白欠損(低下)症の検出に役立っている<sup>1,2)</sup>。血清蛋白分画の検査方法としては、セルロースアセテート膜電気泳動法を用いての分析が主流であったが、近年、キャピラリー電気泳動法を導入する施設が増えてきている<sup>3,4)</sup>。その背景として、キャピラリー電気泳動法は微量サンプルにて短時間での分析ができ、分解能やM蛋白の検出感度が高いことが挙げられる<sup>3,5)</sup>。当院の血清

Received Feb. 5, 2020; Accepted Jun. 10, 2020 Ayaka YAMAMURA, Hironori SASAKI, Yoshimi IMAI

山口県立総合医療センター 中央検査部 〒747-8511 山口県防府市大崎10077番地

Division of Central Laboratory Medicine, Yamaguchi Prefectural Grand Medical Center, 77 Ohsaki, Hofu, Yamaguchi 747–8511

Corresponding author: Ayaka YAMAMURA

TEL: 0835-22-4411 E-mail: byouri@ymghp.jp 蛋白分画測定機器も、2012年にセルロースアセテート 膜電気泳動法からキャピラリー電気泳動法へ変更した。 また、血清総蛋白量に各分画の割合を乗じた算出値が異 常反応の解析やM蛋白量推定に有用である<sup>6-8)</sup>ことか ら、当院では割合とともに算出値も報告している。今回、 キャピラリー電気泳動法の算出アルブミン値がBCP (bromcresol purple) 改良法のアルブミン値と乖離す る多発性骨髄腫検体に遭遇し, 算出値を報告していたこ とにより乖離現象を発見することができた。過去に、M 蛋白量の多い検体においてアガロースゲル電気泳動法か らの算出アルブミン値がBCG (bromcresol green) 法 のアルブミン値と乖離することは報告されているが9). キャピラリー電気泳動法とBCP改良法についての報告 はない。そこで今回われわれは、乖離検体のIgGが7390 mg/dLと高値であったことから、免疫グロブリン濃度 がキャピラリー電気泳動法の算出アルブミン値とBCP 改良法のアルブミン値に与える影響を後方視的に検討し たので報告する。

#### 2. 測定機器および試薬

血清蛋白分画測定機器は、全自動キャピラリー電気泳動装置「Minicap」で、試薬はMinicap専用試薬「ミニキ

ャップ プロテイン6 Maxiキット」を用いた。(装置, 試薬ともにフィンガルリンク(株))

生化学自動分析装置は、「JCA-BM6070 自動分析装置 BioMajestyTM」(日本電子(株))で、総蛋白測定試薬は「アクアオートカイノス TP- II 試薬」、アルブミン測定試薬は「アクアオートカイノス ALB 試薬」(いずれも(株)カイノス)、IgG 測定試薬は「N- TY で、 TY の、 TY

HPLC-BCG法の測定は、(株) カイノスに依頼した。 分析装置は、「島津高速液体クロマトグラフ LC-20AT システム (HPLC) | ((株) 島津製作所) を用いた。

#### 3. 対象および方法

当院で、2014年6月から2019年1月の期間に、総蛋白、アルブミン、免疫グロブリン、蛋白分画の測定依頼があった患者(同一患者を含む)の残余血清検体を用いた(IgG:n=962、IgA:n=935、IgM:n=896)。

本研究は、山口県立総合医療センター倫理委員会の承認を得て行った。

なお、乖離に対する検定はSpearmanの順位相関係数を用い、有意水準p<0.01を統計学的に有意と判断した。統計解析にはStat Flex V6.0((株) アーテック)を用いた。

## 1) 各免疫グロブリンの濃度がアルブミン値乖離に及ぼ す影響

キャピラリー電気泳動法 (capillary electrophoresis: CE) の算出アルブミン値 (以下CE ALB) と, BCP改良法のアルブミン値 (以下BCP改 ALB) について, CE ALBとBCP改 ALBの 比 (BCP改 ALB) について, CE ALBとBCP改 ALBの 比 (BCP改 ALB/CE ALB) を求め、IgG、IgA、IgM濃度との相関係数および回帰式を求めた。また、IgAとIgMについては、BCP改 ALB/CE ALB</br>
/ CE ALB</br>
/ E ALB</br>
/ CE ALB</br>
/ E ALB</br>
/ CE ALB</br>
/ CE ALB</br>
/ CE ALB</br>
/ CE ALB</br>
/ E ALB</br>
/ CE ALB</

# 2) CE ALB, BCP改ALB乖離検体におけるHPLC ALB の測定

CE ALBとBCP改ALBが乖離したIgG高値検体のうち5検体(IgG濃度: 4265 mg/dL~7390 mg/dL) について、HPLC-BCG法のアルブミン値(以下HPLC

ALB) 測定を(株) カイノスに依頼した。CE ALBとBCP改ALB乖離の基準は、BCP改ALB/CE ALB<0.8とした。HPLC ALBをCE ALBおよびBCP改ALBと比較した。

#### 3) M蛋白がアルブミン値乖離に及ぼす影響

各免疫グロブリン濃度が基準範囲を超えた検体について、骨髄腫検体(IgG: n=279, IgA: n=48, IgM: n=69)と非骨髄腫検体(IgG: n=43, IgA: n=30, IgM: n=17)に分類し、それぞれについてIgG, IgA, IgM 濃度とBCP 改 ALB / CE ALB の相関係数および回帰式を求めた。なお、多発性骨髄腫または原発性マクログロブリン血症と臨床診断された患者の検体を骨髄腫検体とした。

#### 4) 乖離検体の血清希釈によるBCP改ALB/CE ALBの 変化

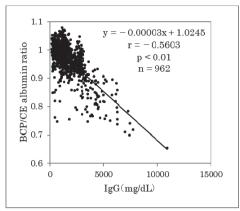
CE ALBとBCP改 ALBが乖離した検体(n=3)をそれぞれ血清にて5段階希釈し、BCP改 ALB/CE ALBを求めた。各希釈段階におけるBCP改 ALB/CE ALBの理論値に対する偏差率にて直線性の評価を行った。なお、希釈用血清には、乖離検体とBCP改 ALB濃度が同等かつ乖離検体より IgG+IgA+IgMの濃度が低い検体を用いた。IgG+IgA+IgMの濃度は、希釈検体そのままの測定値を用いた。また、希釈用血清は、他の検査項目に著しい異常値がないことを確認した。

#### 4. 結果

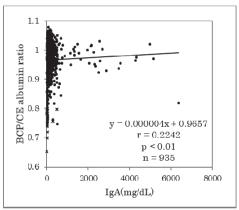
# 1) 各免疫グロブリン濃度がアルブミン値乖離に及ぼす 影響

各免疫グロブリン濃度と BCP 改 ALB/CE ALB の 相関性は、IgG: y=-0.00003x+1.0245, r=-0.5603 (p < 0.01), IgA: y=0.000004x+0.9657, r=0.2242 (p < 0.01), IgM: y=-0.000006x+0.9668, r=-0.1817 (p > 0.01) となった。

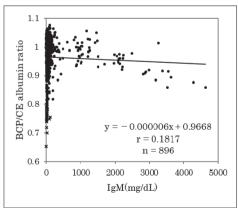
IgAについて、BCP改ALB/CE ALB<0.8となった 検体のうち23検体がIgA基準範囲未満であり、全検体 でIgGが基準範囲を超えていた。IgMについて、BCP改 ALB/CE ALB<0.8となった検体のうち27検体がIgM 基準範囲未満であり、全検体でIgGが基準範囲を超えて いた。それらの検体は、Fig.1にて×で示す(Fig.1)。



a. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgG.

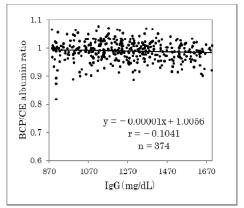


b. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgA.

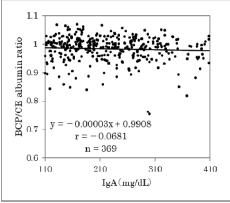


c. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgM.

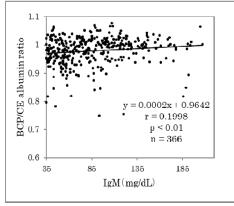
Fig. 1 Correlation between modified BCP ALB/CE ALB and immunoglobulin concentrarion.



a. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgG. (within the reference range)

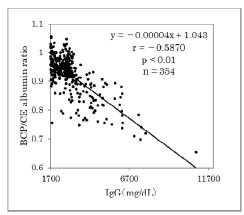


b. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgA. (within the reference range)

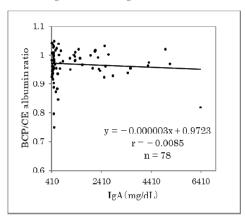


c. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgM. (within the reference range)

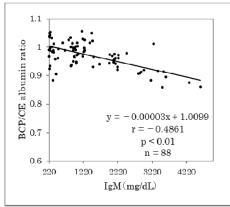
Fig. 2 Correlation betweenmodified BCP ALB/CE ALB and immunoglobulin concentrarion within the reference range.



a. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgG.
 (exceeding the reference range)



 b. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgA. (exceeding the reference range)



c. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgM. (exceeding the reference range)

Fig. 3 Correlation between modified BCP ALB/CE ALB and immunoglobulin concentrarion exceeding the reference range.

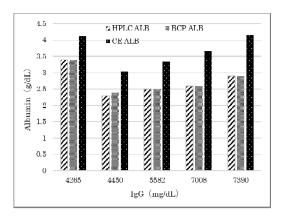


Fig. 4 Comparison of BCG-HPLC, modified BCP and capillary electrophoresis albumin concentration.

-0.0085 (p > 0.01), IgM: y= -0.00003x+1.0099, r= -0.4861 (p < 0.01) となった (Fig. 2, 3)。

#### 2) CE ALB, BCP改ALB乖離検体におけるHPLC ALB の測定

CE ALBとHPLC ALBの差は、0.72~1.25 g/dLとなった。一方、BCP改ALBとHPLC ALBの差は、0~0.1 g/dLとなった(**Fig. 4**)。

#### 3) M蛋白がアルブミン値乖離に及ぼす影響

骨髄腫検体では、IgG:y=-0.00004x+1.0399, r=-0.5808 (p<0.01), IgA:y=-0.000006x+0.981, r=-0.1091(p>0.01), IgM:y=-0.00003x+1.0148, r=-0.5178(p<0.01), 非骨髄腫検体では、IgG:y=-0.00003x+1.0341, r=-0.4579 (p<0.01), IgA:y=-0.00002x+0.9739, r=-0.0590(p>0.01), IgM:y=-0.00001x+0.9939, r=-0.0049(p>0.01) となった (**Fig. 5, 6**)。

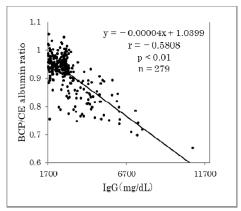
#### 4) 乖離検体の血清希釈によるBCP改ALB/CE ALBの 変化

5段階希釈におけるBCP改ALB/CEALBの値は、3 検体とも各希釈段階において理論値に対して±5%以内 となった(Fig. 7)。

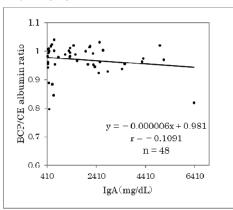
#### 5. 考察

本検討では、免疫グロブリンが、CE ALBとBCP改 ALBの乖離に及ぼす影響を調べた。

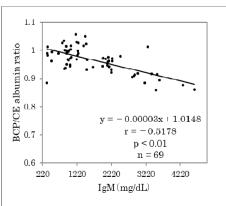
全対象検体を用いた検討より、IgGとBCP改ALB/CE ALBの間に有意な負の相関が認められた。このことから、最初に遭遇した1症例に限らず、IgGが高くなるにつれ、BCP改ALB/CE ALBは低下傾向となることが示された。全対象検体を用いた検討にて、IgAおよびIgMでは、BCP改ALB/CE ALBとの間に有意な負の



a. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgG. (myeloma group)

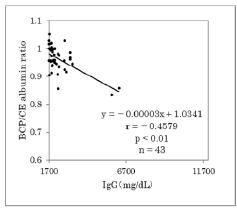


 b. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgA. (myeloma group)

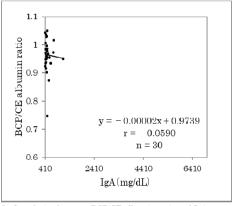


c. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgM. (myeloma group)

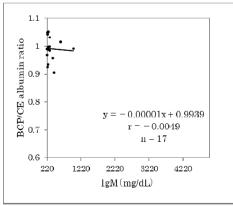
Fig. 5 Correlation between modified BCP ALB/CE ALB and immunoglobulin concentrarion exceeding the reference range. (Myeloma group)



a. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgG. (non-myeloma group)

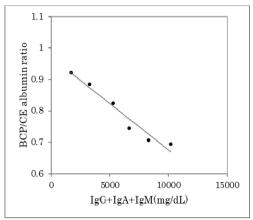


b. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgA. (non-myeloma group)

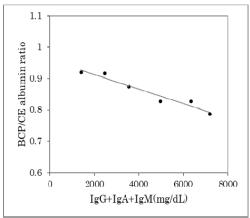


c. Correlation between BCP/CE albumin ratio and IgM. (non-myeloma group)

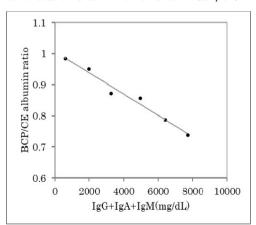
Fig. 6 Correlation between modified BCP ALB/CE ALB and immunoglobulin concentrarion exceeding the reference range. (Non-myeloma group)



a. Delute abnormal serum with normal serum. (sample A)



b. Delute abnormal serum with normal serum. (sample B)



c. Delute abnormal serum with normal serum. (sample C)

Fig. 7 Delute abnormal serum with normal serum.

相関を認めなかった。これについては、BCP改ALB/ CE ALBが0.8未満となった検体のうちIgAやIgMが異 常低値の検体は、全例でIgGが異常高値であり、結果と して相関が認められなかったと推測した。そこで、免疫 グロブリンの濃度域を分けて検討した結果, IgG, IgA およびIgMが基準範囲内の検体においては、免疫グロ ブリン濃度依存性のアルブミン値乖離は認められず. CE ALBおよびBCP改ALBいずれも免疫グロブリンの 影響を受けていないことが分かった。一方、IgGとIgM が基準範囲を超えた検体においては、免疫グロブリン濃 度依存性のアルブミン値乖離が認められ, CE ALB 偽高 値あるいはBCP改ALB偽低値の2つの可能性が考えら れた。CE ALBとBCP改ALBが乖離した検体において、 どちらが偽高値あるいは偽低値となっているのかを調べ るため、HPLC-BCG法にてアルブミンを測定した。ア ルブミンの日常検査法を評価する比較対照法として, 従 来用いられてきた免疫学的測定法に代わり HPLC-BCG 法が村本らにより提唱されており10,これに基づいて本 検討ではHPLC-BCG法の測定結果を基準に評価を行っ た。比較した結果、HPLC ALBは、BCP改ALBに近似 した。このことから、CE ALBが偽高値となっているこ と考えられた。IgAについては、基準範囲を超えた検体 においてもIgGやIgMのような濃度依存性のアルブミン 値乖離は認められなかった。今回、IgA において乖離が 認められなかった原因は明らかではないが、BCG法の アルブミン値とアガロースゲル電気泳動法のアルブミン 値乖離においても、IgG高値検体と比較してIgA高値検 体では乖離の程度が弱いと報告されており9, IgAは電 気泳動法の測定方法に依らず、アルブミン値乖離に影響 を与えにくいことが示唆された。

M蛋白などの血清異常蛋白質が非特異反応により検査値に影響を及ぼすことについてはいくつかの報告があり<sup>11-13</sup>, 今回アルブミン値が乖離した原因もM蛋白が関係する非特異反応によるものと推測した。しかし、対象検体を骨髄腫群と非骨髄腫群に分けて行った検討では、IgGについては骨髄腫群と非骨髄腫群のいずれにおいてもアルブミン値の乖離が認められた。このことから、IgGの質的異常、つまりモノクローナルであるかどうかではなく、IgGの量的過剰がアルブミン値乖離の主因であることが示唆された。しかし、本検討では、特にIgMおよびIgA高濃度域の非骨髄腫検体数が少なかったため、結果からアルブミン値乖離とM蛋白の関連について明確に言及することはできない。今後、免疫グロブリン高濃度域の非骨髄腫検体数を増やして解析することで、骨髄腫検体との詳細な比較が可能になると考えてい

る。

免疫グロブリンがアルブミン値乖離の原因となっていることを確認するために行った乖離検体の血清希釈では、いずれの検体も希釈に伴ってBCP改ALB/CE ALBは1に近づき、直線性は保たれた。同一検体の希釈で、免疫グロブリン濃度の低下に伴いアルブミン値の乖離が認められなくなったことから、アルブミン値の乖離が高濃度の免疫グロブリンによって引き起こされていることが示された。

IgGおよびIgM高値検体においてCE ALBが偽高値となった原因として、高濃度の免疫グロブリンがキャピラリー電気泳動法の測定に影響を及ぼしている可能性や、ビウレット法による総蛋白測定が偽高値となっている可能性がある。

ChristineらによるBCG法とアガロースゲル電気泳動法のアルブミン値乖離の検討では、原因として電気泳動法で用いる染色液の染色性に言及している<sup>9</sup>が、我々の検討では染色液を用いないキャピラリー電気泳動法においてもアルブミン値乖離が確認されたため、染色液以外に原因があることが示唆された。

近年、個々の蛋白を単独で測定することが可能となったことから、血清蛋白分画では、各分画の割合のみを結果として報告している施設が多い。しかし、血清蛋白分画から算出されたッグロブリン量と免疫グロブリン定量値の乖離が契機となり異常蛋白が見出される<sup>13)</sup>ことや、自動分析装置において異常反応が回避できなかった場合に血清蛋白分画算出値を報告できる利点もある<sup>12)</sup>。さらに、IMWG(International Myeloma Working Group)診断基準<sup>8)</sup>においては、総蛋白にM蛋白分画の割合を乗じた値がM蛋白定量値として定義されていることから、血清蛋白分画算出値を求めることは、今もなお重要であるといえる。

## 6. 結論

本検討では、IgGおよびIgMが基準範囲を超えた検体において、免疫グロブリン濃度依存性にキャピラリー電気泳動法とBCP改良法のアルブミン値が乖離することを示した。免疫グロブリン高値検体は、キャピラリー電気泳動法のアルブミン値が偽高値となる可能性があることに注意し、日常検査を行う必要がある。

本論文の一部は、日本臨床検査自動化学会第49回大会(2017年9月横浜)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

- 高久史麿,黒川清,春日雅人,北村聖.臨床検査データブック2015-2016,第1版,株式会社医学書院;東京、2015:97-98
- 2) 藤田清貴. 異常蛋白質 基礎から発見・解析法まで, 第1版, 医歯薬出版株式会社株式会社; 東京, 2010:13
- 3) 松本信也,山中基子,小野美由紀ほか,全自動キャ ピラリー電気泳動装置「Minicap」の蛋白分画にお ける性能評価.日本臨床検査自動化学会会誌 2016:41:63-69.
- 4) 正司浩規, 木村茂樹, 松井晶彦ほか. 全自動キャピラリー電気泳動装置「Capillarys 2」の性能評価. 日本臨床検査自動化学会会誌 2014;39:378-385.
- 5) 三浦雅一, 宇治義則, 畠啓視ほか. キャピラリー電 気泳動法によるヒト血清蛋白の分離と同定. 臨床化 学 1994:23:32-37.
- 6) 井本真由美、山田俊幸、上硲俊法. 血清蛋白分画を 院内で実施する意義. 電気泳動 2017;61:74-78.
- 7) 江橋正浩, 老沼弘俊, 日高裕介. キャピラリー電気 泳動システムにおけるM蛋白算出法. 臨床病理 2016;64:8:887-890.
- 8) International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br J Haematol 2003;121:749-757
- Christine L.H. Snozek, Amy K. Saenger, Philip R. Greipp, et al. Comparison of Bromcresol Green and Agarose Protein Electrophoresis for Quantitation of Serum Albumin in Multiple Myeloma. Clinical Chemistry 2007;6:1099-1103.
- 10) 村本良三,大澤進,伊藤喜久ほか.血清アルブミン 測定のための比較対照法. 臨床化学 2013;42:68-79
- 11) 青木義政, 亀子光明,藤田清貴、M-蛋白の検査と臨床 4.アルブミン,直接ビリルビン,および血清 鉄測定に影響を及ぼしたIgG4-λ型 M-蛋白血症の1 例. 臨床病理 2001;49(7):686-689.
- 12) 青木義政, 亀子光明, 藤田清貴ほか. 酸性条件下で 凝集沈殿する IgG4- λ型M蛋白が引き起こしたアル ブミン測定への影響. 生物物理化学 2007;51:231-235.
- 13) 佐藤裕久,工藤真理子,真里谷靖ほか.免疫グロブリン定量値と血清蛋白分画に乖離がみられた2症例. 生物物理化学 2007;51:237-241.

## CGM における5分毎測定時と15分毎測定時の 血糖変動指標の値の比較検討

Comparison of Glycemic Variability Values Calculated from Sensor Glucose Levels Measured Every 5 and 15 Minutes

武石宗一 坪井宏樹

要旨 持続血糖モニター(CGM)における5分毎測定値(5分値)および15分毎に抽出した測定値(抽15分値)から算出される血糖変動値(GV)を比較検討した。CGM(iPro2)にて24時間血糖値を測定した2型糖尿病患者107例のデータを横断的に検討した。5分値及び抽15分値から算出されたGV(time in range (70-180 mg/dL),平均血糖値,標準偏差,変動係数,mean absolute glucose(MAG),glycemic variability percentage (GVP))を比較した。GV(抽15分値)とGV(5分値)はすべてのGVで数値的にほぼ同等となった。MAGとGVPは統計学的有意に小さかった。GV(抽15分値)とGV(5分値)は数値的にほぼ同等である。

Key words CGM, FGM, glycemic variability

### 1. 緒言

近年持続血糖モニター(CGM)が普及してから糖尿病の評価、治療の精度は目覚ましく向上した。CGMには、personalとprofessionalがある。さらに、自己血糖測定(SMBG)による較正が必要なCGMと必要でないフラッシュグルコースモニタリング(FGM)があり、CGMは5分毎の測定で、FGMは15分毎の測定である。最近になりCGMデータから算出されたTime in range(70-180 mg/dL)(TIR)が、従来の代表的な血糖コントロール指標であるHbAlc値の精度の限界を解決する新たな血糖コントロール指標として確立されつつある1)。CGMデータから算出された血糖変動値(GV)の精度に関しては、SMBG値に対するCGM、FGMセンサーグルコース(SG)値の平均絶対的相対的差異(MARD)以外に、

Received Jan. 31, 2020; Accepted Mar. 19, 2020 Soichi TAKEISHI, Hiroki TSUBOI 社会医療法人志聖会総合犬山中央病院糖尿病内科 〒484-8511 愛知県犬山市大字五郎丸字二夕子塚6 Department of Diabetes, Inuyama Chuo General Hospital

6, Futagozuka, Goromaru, Inuyama-city, Aichi, 484–8511, Japan

Corresponding author:武石宗一 Tel:0568-62-8111 Fax:0568-62-9289 E-mail:souichi19811225@yahoo.co.jp SGの測定頻度(iPro2:5分毎、FreeStyle Libre Pro: 15分毎)が関連する可能性がある。実際、最近のCGMを使用した大規模臨床試験においては、DIAMOND<sup>2/3</sup>、GOLD<sup>4</sup>、HypoDE<sup>5</sup>では5分毎測定のCGMが、IMPACT<sup>6</sup>、REPLACE<sup>7</sup>では15分毎測定のFGMが使用されており、双方から算出されるGVの精度、特性を理解しておくことは重要である。CGM、FGMのSG値のMARDを検討した報告はあるが<sup>8</sup>、SGの測定頻度と算出されるGVとの関連を検討した報告は限られている。そこで今回我々は、CGMにおける5分毎測定値および15分毎測定値から算出されるGVを比較検討した。

#### 2. 対象と方法

#### 1) 研究デザインと対象患者選定

入院中CGMセンサー (iPro2) にて24時間の血糖値を持続測定した2型糖尿病患者107例のデータを横断的に検討した。装着2日目の0時~24時のデータで解析を行った。15分毎測定値の抽出方法は、24時間288個の測定値を3連続測定値を1セットとして計96セットに分割し、すべてのセットにおける3連続測定値の中央(2番目)の測定値を抽出するという方法で行った。

研究プロトコールは総合犬山中央病院倫理委員会により承認され(承認番号:2018年 第VI号,承認日:2018年7月26日),UMINに登録された(UMIN000033429)。 ヘルシンキ宣言のガイドラインに従ったインフォームド コンセントを行い書面にて同意を得た患者を本研究に登録した。

#### 3. アウトカム

#### 1) 主要評価項目

5分毎のすべての測定値(5分値)と15分毎に抽出した測定値(抽15分値)それぞれから算出されたTIR<sup>1)9)</sup>の 比較

#### 副次評価項目

- 5分値と抽15分値それぞれから算出されたGV (平均 血糖値<sup>9</sup>)、標準偏差、変動係数<sup>9</sup>、Mean absolute glucose(MAG)<sup>10)11</sup>、Glycemic variability percentage (GVP)<sup>12)</sup>)の比較
- (2) 模擬的に作成した,抽出後の15分毎連続測定値(抽 0,15分値)及びその期間内の5分値(抽0,5,10, 抽15分値)から算出されたMAG,GVPの比較。
- (3) 連続する抽15分値の間(intervals between successive SGs extracted every 15 min:ibsSGe15s)に加えることでMAGの値を上昇させる5分値をSG5iMAG (SG5 which increase MAG), GVPの値を上昇させる5分値をSG5iGVP (SG5 which increase GVP) と定義し、SG5iMAG presence rateを (SG5iMAG が存在する ibsSGe15sの数)÷(ibsSGe15sの総数 [=95])×100(%)、SG5iGVPs presence rateを (SG5iGVPが存在する ibsSGe15sの数)÷(ibsSGe15sの総数 [=95])×100(%)と定義した。

## 4. 統計解析方法

結果は平均値(±標準偏差)で表し,対応のあるt検定, ピアソンの積率相関係数を用い,危険率5%未満を有意 とした。データはBellCurveエクセル統計(株式会社社会情報サービス)を用いて分析した。

#### 5. 結果

#### 1) 患者背景

患者背景をTable 1に示す。

#### 2) 主要評価項目

TIRおいて, GV (抽15分値 (15)) とGV (5分値 (5)) は数値的にほぼ同等となった (**Table 1**)。

#### 3) 副次評価項目

- 平均血糖値、標準偏差、変動係数において、GV (15) とGV (5) は数値的にほぼ同等となった。MAG、GVP において、GV (15) がGV (5) に比べ統計学的有意 に小さい結果となった (Table 1)。
- (2) Case 2はCase 1に比べてMAG, GVPとも同値, Case 3はCase 1に比べてMAGは同値, GVPは高い値となり, Case 4はCase 1に比べてMAG, GVPとも高い値となった (Fig. 1)。
- (3) SG5iMAGs presence rateに比べSG5iGVPs presence rateは有意に高かった (7.5  $\pm$  3.8 vs. 84.3  $\pm$  5.6; p < 0.001)。

## 6. 考察

本研究結果より、本研究で評価したすべてのGVにおいて5分値から算出した値と抽15分値から算出した値は数値的にほぼ同値であった。中でも、TIR、平均血糖値、標準偏差、変動係数は統計学的にも有意差を認めなかった。最近になりCGMデータから算出されたTIRが、従来の代表的な血糖コントロール指標であるHbAlc値の精度の限界を解決する新たな血糖コントロール指標として確立されつつ

Characteristic	Total		GVSG5	GVSGe15	p
N (Male / Female)	107 (58 / 49 )	TIR 70-180, %	70.73 ± 24.61	70.65 ± 24.60	0. 19
Age, years	70.2 ± 12.9	Mean, mg/dL	153.553 ± 36.835	153.555 ± 36.836	0. 63
Duration of diabetes, years	13.9 ± 11.6	SD, $mg/dL$	42.6056 ± 20.889	42.6060 ± 20.882	0.86
BMI, kg/m <sup>2</sup>	$24.2 \pm 5.3$	CV, %	27.495 ± 11.48	27.496 ± 11.5	0. 44
HbA1c (NGSP), %	$8.7 \pm 1.7$	MAG, mg/dL/hr	$30.7 \pm 11.9$	29.8 ± 11.7	< 0.001
CPI	$1.3 \pm 3.8$	GVP, %	$20.2 \pm 13.4$	19.2 ± 13.2	< 0.001
II-CPR ug/day	46 3 + 41 6				

 Table 1
 Patient characteristics and glycemic variability values

Data are shown as mean and standard deviation (SD).

BMI; body mass index, HbA1c; glycosylated haemoglobin, CPI; C-peptide index, U-CPR; urine-CPR, Mean; mean glucose level, CV; coefficient of variation, TIR 70-180; percentage of time in target range (70-180 mg/dL), MAG; mean absolute glucose, GVP; glycemic variability percentage, SG; sensor glucose levels, GVSG5; GV calculated from SG measured every 5 minutes, GVSGe15; GV calculated from SG extracted every 15 minutes

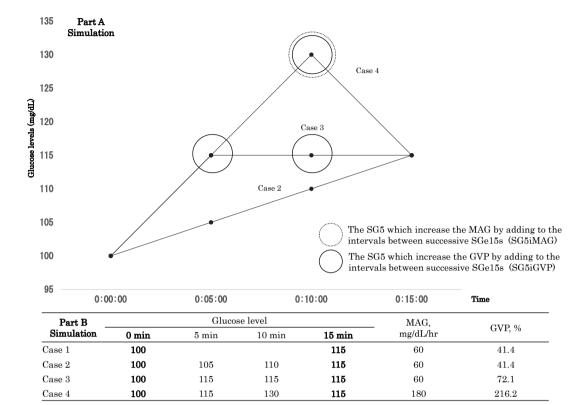


Fig. 1 Part A shows simulated glucose level profiles for 2 consecutive sensor glucose levels (SG) extracted every 15 minutes [SGe15] and SG measured every 5 minutes [SG5] during those 2 consecutive SGe15 (Case 1 is only 2 consecutive SGe15). Part B shows glycemic variability values applied to that simulated glucose level profiles. SGe15 are described in bold font.

あり<sup>1)</sup>、本研究結果はCGMデータの測定間隔という観点において、5分毎測定と15分毎測定のCGMデータから算出されたTIRの同等性を示したといえる。

MAGとGVPは血糖変動の幅と頻度を両方とも反映する指標である。酸化ストレス惹起リスクを従来の指標より鋭敏に反映する可能性が理論上あり、有用な指標と考えられる。本研究にて、大小関係においてMAG(15)がMAG(5)に比べ、またGVP(15)がGVP(5)に比べて小さくなった理由を考察する。MAGは、測定時間内のすべての血糖変動値の絶対値の和を測定時間で除した指標<sup>9)10)</sup>である。Fig. 1にてCase 4のみCase 1に比べてMAGの値が大きいが、Case 2、3はCase 1とMAGの値は同じである。つまりCase 2、3のように、連続した抽15分値の間の2つの5分値が、その連続した2つの抽15分値の範囲内に収まる限りは必ずMAGの値は同じになり、Case 4のように5分値が2つの抽15分値の範囲内を逸脱するケースでは、抽15分値のみの時に対し5分値が加わることでMAGの値は増加する。本研

究にてSG5iMAGs presence rateが7.5%であったことは、 逸脱するケースより収まるケースのほうが多かったことを示唆する。抽15分値のみの時に対し5分値が加わることで MAGの値が減少するケースは理論上存在しないため、 MAGの大小関係の本研究結果が生じたと考える。GVPは 以下の計算式によって求められる<sup>11)</sup>。

$$\begin{split} L &= \sum_{i=1}^{n} \sqrt{\Delta x_i^2 + \Delta y_i^2} \\ L_0 &= \sum_{i=1}^{n} \Delta x_i \\ GVP &= (L/L_0 - 1) \times 100 \end{split}$$

Fig. 1にてCase 3,4がCase 1に比べてGVPの値が大きく、Case 2のみCase 1とGVPの値は同じである。つまりCase 2のように、連続した抽15分値とその間の2つの5分値がすべて同じ変化速度で変化したときのみGVPの値は同じにな

り、そのケース以外は必ず抽15分値のみの時に対し5分値が加わることでGVPの値は増加する。本研究にてSG5iGVPs presence rateが84.3%であったことは、すべて同じ変化速度で変化したケースよりそうでないケースのほうが多かったことを示唆する。加えて抽15分値のみの時に対し5分値が加わることでGVPの値が減少するケースは理論上存在しないため、GVPの大小関係の本研究結果が生じたと考える。さらにSG5iMAGs presence rateに比べSG5iGVPs presence rateが有意に高かったことは、MAGに比べてGVPのほうが、抽15分値のみの時に対し5分値が加わることで値が増加するケースが多かったことを示唆する。

本研究結果より、CGMデータから算出されたGVの精度に関しては、SGの測定頻度はほぼ影響しないことが示された。MAGやGVPは、測定頻度が多いほど酸化ストレス惹起リスクを理論上より反映しうるため、その点に関しては15分毎測定のFGMは5分毎測定ほどの精度はない可能性があるが、SMBGによる較正が不要である点においてFGMは有用であると考えられる。今後実際にCGMとFGMのSG値から算出されたGVの精度を比較検討し、その中で測定頻度におけるMAG、GVPの大小関係などの本研究結果がその精度にどのように影響するのかを検討予定である。本研究は単施設、オープンラベル試験であり限界がある。今後の症例蓄積、質の高い臨床研究による証明に期待したい。

本論文に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

#### 文 献

- Battelino T, Danne T, Bergenstal RM, et al. Clinical Targets for Continuous Glucose Monitoring Data Interpretation: Recommendations From the International Consensus on Time in Range. Diabetes Care 2019; Jun 8: doi: 10.2337/dci19-0028.
- Beck RW, Riddlesworth T, Ruedy K, et al. Effect of Continuous Glucose Monitoring on Glycemic Control in Adults With Type 1 Diabetes Using Insulin Injections: The DIAMOND Randomized Clinical Trial. JAMA 2017;317:371-378.
- 3) Beck RW, Riddlesworth TD, Ruedy K, et al. Continuous Glucose Monitoring Versus Usual Care in Pa-

- tients With Type 2 Diabetes Receiving Multiple Daily Insulin Injections: A Randomized Trial. Ann Intern Med 2017; 167: 365–374.
- 4) Lind M, Polonsky W, Hirsch IB, et al. Design and Methods of a Randomized Trial of Continuous Glucose Monitoring in Persons With Type 1 Diabetes With Impaired Glycemic Control Treated With Multiple Daily Insulin Injections (GOLD Study). J Diabetes Sci Technol 2016; 10:754-761.
- 5) Heinemann L, Deiss D, Hermanns N, et al. HypoDE: Research Design and Methods of a Randomized Controlled Study Evaluating the Impact of Real-Time CGM Usage on the Frequency of CGM Glucose Values <55 mg/dl in Patients With Type 1 Diabetes and Problematic Hypoglycemia Treated With Multiple Daily Injections. J Diabetes Sci Technol 2015;9:651-662.
- Bolinder J, Antuna R, Geelhoed-Duijvestijn P, et al. Novel glucose-sensing technology and hypoglycaemia in type 1 diabetes: a multicentre, non-masked, randomised controlled trial. Lancet 2016;388:2254– 2263.
- Haak T, Hanaire H, Ajjan R, et al. Flash Glucose-Sensing Technology as a Replacement for Blood Glucose Monitoring for the Management of Insulin-Treated Type 2 Diabetes: a Multicenter, Open-Label Randomized Controlled Trial. Diabetes Ther 2017;8:55-73.
- 8) Tanizawa M, Takahashi H, Mori Y, et al. Comparison of Disparities between FGM/CGM Sensor Glucose Values and Blood Glucose Values in Type 1 Diabetic Patients on SAP Therapy. American Diabetes Association's 78th Scientific Sessions 2018; poster presentation: 915-P.
- Danne T, Nimri R, Battelino T, et al. International Consensus on Use of Continuous Glucose Monitoring. Diabetes Care 2017;40:1631-1640.
- Hermanides J, Vriesendorp TM, Bosman RJ, et al. Glucose variability is associated with intensive care unit mortality. Crit Care Med 2010;38:838-842.
- DeVries JH. Glucose variability: where it is important and how to measure it. Diabetes 2013;62:1405– 1408.
- 12) Peyser TA, Balo AK, Buckingham BA, et al. Glycemic Variability Percentage: A Novel Method for Assessing Glycemic Variability from Continuous Glucose Monitor Data. Diabetes Technol Ther 2018;20:6–16.

## キャピラリー電気泳動法技術を応用した小型で簡便かつ 精確な HbA1c 測定法 The Lab 001

Unique HbA1c Device equipped with Small, Simple, Swift and Accurate by Applying the Capillary Electrophoresis, The Lab 001

細谷幸雄1) 松井優果1)

我々は、キャピラリー電気泳動法に陽イオン交換動電クロマトグラフィー法を応用した精確・迅速でか つ小型・簡便なHbA1c測定システムThe Lab001 (ザ ラボ 001) を開発した。測定時間は90秒, 必要検体量は1.5 μ Lである。本法の試薬ザ ラボ 001 A1C HDは室温保存で使い切りのため、保管やメンテナンスが容易である。結果 の解釈はHPLC法と同等であり、違和感なく使用可能である。基本性能は並行精度がCV2%未満、トレーサビリティ ー体系としてNGSPの認証値±5相対%以内であり、主要変異ヘモグロビンの影響も対照値±7相対%以内であるこ とを確認した。本邦において、高まる国際化とともに変異ヘモグロビンの影響を受けない精確な HbAlc 検査法の需 要が高まっている中、我々は本法で、小規模から大規模の幅広い医療施設において、安心安全かつ迅速な糖尿病医療 提供貢献に努める。

HbAlc, capillary electrophoresis, cation-exchange electro-kinetic chromatography, small simple swift and accurate, less invasive and short turn-around-time (TAT)

#### 1. はじめに

世界保健機関(WHO, World Health Organization)は、 2016年の糖尿病による死亡件数は推定159.9万人で全死 亡率の2.8%と報告している10。糖尿病による死亡率はよ り経済的に整備された国に高い傾向にあったが、昨今全 世界で生活の向上とともにこの傾向は高まっており、国 際的に予防・治療の重要さが叫ばれている1.20。糖尿病 医療においてヘモグロビンAlc (HbAlc) は、Kunkel による1955年のHbA1の報告をきっかけとし、Bunnらが 1975年にHbA1cを報告した。その臨床的有用性に関して は、Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)

Received Nov. 25, 2019; Accepted Mar. 30, 2020 Yukio Hosoya<sup>1)</sup>, Yuka Matsui<sup>1)</sup>, Koji Higashino<sup>1)</sup> アークレイ株式会社研究開発本部開発一部学術統括チーム Scientific Affairs Management Team, Research & Development Unit 1, Research & Development Division, ARKRAY, Inc.1), Yousuien-nai, 59 Gansuin-cho,

連絡責任者:細谷幸雄 Tel: 050-5830-1000(代) E-mail: hosovay@arkray.co.jp

Kamigyo-ku, Kyoto 602-0008, JAPAN 〒602-0008 京都市上京区岩栖院町59 擁翠園内

が、HbA1cが糖尿病モニタリングとして重要であること を1型糖尿病 (DM, diabetes mellitus) 患者で明らかに した。さらに、United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) が2型DM患者で妥当性を証明した。 その後、多くの研究成果とともに国際標準化が推進され た3)成果として、HbA1cは糖尿病の診断・モニタリン グの指標として認められた4)。本邦においては2010年に 決定された診断基準の改定により、現在広く活用されて いる5)。現在の日常検査法は、この種々のヘモグロビン を分離する分離分析法と抗原抗体反応や酵素反応などに よってHbA1cを特異的に捕らえる生物化学法に大別さ れる。高速液体クロマトグラフィー (HPLC, high performance liquid chromatography) 法に代表される 分離分析法は精確かつ迅速でHbFなど付加価値情報が 得られるメリットがあるが、小型化・簡便さに課題を抱 えていた。我々は、キャピラリー電気泳動法を応用する ことでこの課題を解決したので報告する。

## 2. 測定システム

#### 1) 測定原理

本法はキャピラリー電気泳動(CE, Capillary Electrophoresis)法を採用している。一般的には内径 20~100 μ m の毛細管 (キャピラリー管) 内で電気泳動 を行う分析法であり、様々な対象物の分離分析が可能で ある。その原理上、高い分離性能が得られることが知ら れている一方、十分な分離能力を確保するために数十 cm長のフューズドシリカキャピラリーが使用され、数 分~数十分程度の測定時間を要する。また、発生するジ ユール熱による分離能の低下や再現性の低下を防ぐため に、キャピラリー内部の温度制御が必須とされている。 結果として. 装置は大型で使用には高度な専門性が要求 される。CE法はキャピラリー管内の内壁を正負電荷に 修飾することで電気浸透流 (EOF, electroosmotic flow) という流れが発生する。本法では電気泳動時、キ ャピラリー内壁をマイナス電荷となるよう修飾している ため、電圧をかけると陽極から陰極に向けてEOFが生 じる。検体中のヘモグロビンは弱酸性の試薬液中におい てプラス電荷を帯びるが、その種類や生体反応による 様々な修飾でプラス電荷は異なるため、この電荷差を利 用することでヘモグロビン成分を分離することが可能で ある。本法では、さらに陽イオン交換導電クロマトグラ フィー法を採用している。これは試薬液成分にマイナス 電荷を持った擬似固定相(コンドロイチン硫酸C(CS-C. chondroitin sulfate C)) をHPLC法の固定相 (陽イオン 交換カラム) に相当する機能として含んでおり、これが ヘモグロビンと結合する。この結合力はプラス電荷の大きさに比例するため、ヘモグロビン成分の電気泳動移動度の差が効率的に拡大される。この当社独自の技術によって、約90秒(電気泳動は40秒間)という短時間での分離・検出を可能とした。また陽イオン交換法を採用しているため、電気泳動結果(エレクトロフェログラム)の解釈はHPLC法のクロマトグラムと、ほぼ同様である。

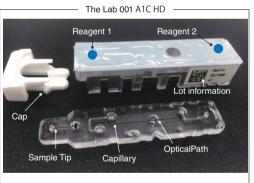
#### 2) 装置と試薬

本システムを Fig. 1 に、その主な仕様を Table 1 に示した。

#### (1) 装置

本装置の縦横寸法はA4サイズ,重量は約10kgと小型化を図った。電源投入後,60秒以内にセルフチェックが完了し、即座に検査を開始できる。操作画面には7インチのタッチスクリーン・カラー液晶を採用しており、操作はガイド付きで視覚的にも分かりやすく、結果は数値とエレクトロフェログラムで表示するので迷いがない。装置内部には圧力、加速度、温度などのセンサーを搭載し、装置の状態や測定動作の異常を検知する。装置に消耗品はなく、ユーザーによるメンテナンスは不要である。また、精度管理用のQC測定モードを搭載し、QCロックアウト(測定間隔、測定範囲を設定)にも対応できる。測定は装置前面下の試薬トレイに試薬カート





The height and width of Device (The Lab 001) is A4 compact size and ready to run the samples approximately 60 seconds after the power on. Touch screen color GUI with operation guide leads operators smooth testing. The reagent (The Lab 001 A1C HD) is dedicated for the device consists of three parts. Chip (Lower) includes sample tip and capillary. Reagent pack (Upper) includes reagents, electrodes and sample pretreatment port. Cap (Upper left) protects from the breakage or biohazard. Moreover, it equips with the lot and calibration information. The onetime-use and room temperature storage is easy to handle.

Fig. 1 Device and Reagent

Table 1	Specification

Product	The Lab 001
Specimen	Whole blood
Reagents	The Lab 001 A1C HD (Cartridge type)
Analyte	Stable HbA1c
Measurement range	HbA1c (NGSP) : 4.00%—16.00%(0.1% Minimum)
Weasurement range	HbA1c (IFCC) : 20.2-151.4 mmol/mol(1 mmol/mol Minimum)
Principle	Capillary electrophoresis
Components detection	Optical determination
Sampling	Place the sample on the tip of the reagent
Processing speed	About 90 seconds/measurement
Sample consumption	About 1.5 $\mu$ L (Whole blood)
Warm-up time	Maximum 60 seconds
Display	Color Graphical User Interface (GUI) with touch panel
Printer	58 mm width thermal printer
Memory capacity	Sample measurement: 6,000 results, QC test: 1,000 results
External input/output	USB×2, Ethernet port×2, RS-232C
Measurement environment	10 to 30°C, Humidity: 20 to 80% R.H. (No condensation)
Reagent storage	2 to 30°C, Humidity: 20 to 80% R.H. (No condensation)
Dimensions	Approximately 220 (W) × 326 (D) × 298 (H) mm
Weight	Approximately 10 kg
Power requirements	100 to 240 V AC $\pm$ 10%, 50/60 Hz

リッジをセットすることで開始され、次のステップで行われる。(a)検体を第一試薬で溶血希釈・攪拌、(b)第二試薬を電極部とキャピラリー内に充填、(c)希釈検体をろ過後に電極部に移動、(d)電圧を印加し電気泳動を開始、(e)分離した各へモグロビン成分を検出部において吸光度を測定、(f)エレクトロフェログラムよりHbA1c値を算出。エレクトロフェログラムは、測定時間は相対時間(Position)として表示され、分析開始時間を0、HbA0のピーク検出時間を1.0としている。分析開始時間は希釈検体中の電気的中性成分(第一試薬に含有)が検出された時間であり、この関係において各へモグロビン成分の検出される相対時間は一定である。(Fig. 2)

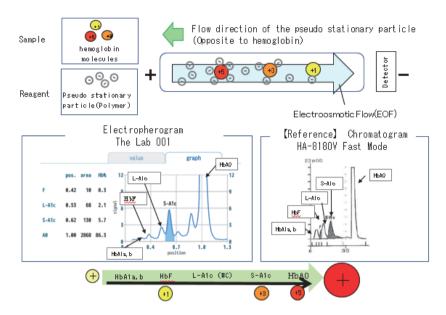
#### (2) 試薬

ザ ラボ 001 A1C HDは、カートリッジタイプの専用 試薬で、チップ、試薬パック、キャップの3つから構成 される。チップは検体採取用の流路と、 $40 \, \mu \, \text{m} \times 40 \, \mu \, \text{m} \times 30 \, \text{mm}$ (幅×深さ×長さ)のキャピラリーからなる。 試薬パックは、試薬格納部、検体前処理部と電極部から なり、キャピラリーチップと互いに嵌合することで、試薬を送液するための流路を形成する構造となっている。

試薬格納部には2種類の試薬液が格納されており、CS-Cに加えてpH緩衝剤や界面活性剤などが含まれ、温度やpH変化、検体変性を抑える特性を持つ。キャップは、輸送時のチップ保護と検体点着後のバイオハザードリスクを回避する機能を担う。検体をチップの検体採取部に点着することで、測定に必要な容量( $1.5 \mu$ L)が毛細管力により吸引される。キャップを介してチップを試薬パック内に押し込むことで、固く不可逆的にかみ合い、測定形態となる。余剰検体はこのときに除かれる。試薬パックにはロット情報ラベルが貼付されており、装置は測定条件や試薬情報、検量線情報等を自動的に読みとるため、ロット毎の測定条件設定やキャリブレーションは不要である。測定完了後は、試薬を廃棄するのみである。なお、本試薬は長期間の室温保存が可能であるため取り扱いが容易である。

## 3. 材料および方法

本報告においてはその結果を日本糖尿病学会の指針に 基づき NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) 値で表現した。



[Principle]: The inner side of capillary is charged negative in this system, thus the electroosmotic flow (EOF) from positive (+) to negative (-) electrode will start when voltage is applied. Hemoglobin molecules move to the same direction with different speed in the capillary according to the respective positive charges. In addition, cation exchange electro-kinetic chromatography, which the polymeric pseudo stationary particle with negative charge binds hemoglobin molecules to suppress the move of hemoglobin induced by EOF and expand the separation capacity effectively.

[Interpretation of the result]: The basic order of the hemoglobin detection in electropherogram(left) is same as chromatogram obtained from HPLC(right), that means the order is followed from weak to strong positive charge based on the cation exchange method.

The peak of HbA1c in the display is illustrated in sky blue color and HbA0 is positioned 1.0 (x-axis).

Fig. 2 Principle and Interpretation of Result

また臨床研究における倫理指針に基づき,事前同意を 得た社員血もしくは共同臨床研究機関において匿名化さ れた検査実施後の残余試料を観察研究用として提供を受 けて行った。

#### 1) 精密性

正常域および糖尿病 (DM) 域の全血を用い, 並行精度としてn=20で連続測定, 中間精度としてn=2/日×10日で測定を行い評価した。

#### 2) 正確性

HbA1c測定用実試料一次標準物質JCCRM411-4(JDS

Lot6) の5レベルをn=5で測定を行い平均値と認証値との差により評価した。

#### 3) 直線性

リニアリティチェック(バイオラッド社)のレベル1 と5を用い11段階の混合試料の測定を行った。評価は、 正確性が確保された濃度域から得た直線回帰式から得ら れた理論値と実測値との差により評価した。

#### 4) 相関性

比較対照法としてHA-8180V Variant Modeを用い, 120例の測定を行い、比較した。2019年のNGSP認証プ

	Repeatability		Intermediate precision		
Level	Normal	DM	Normal	DM	
n	20	20	10	10	
Mean	5.11	8.13	5. 15	11. 70	
SD	0.055	0. 079	0.027	0. 054	
CV (%)	1. 08	0.97	0.52	0. 47	

Table 2 Precision

The normal and DM whole blood samples were used for within-run and intermediate precision.

Level 1 2 3 4 5 Mean 5.09 5.81 7.39 9.54 12.01 SD 0.035 0.025 0.032 0.102 0.064 CV (%) 0.63 1.38 0.21 0.61 0.67 Certified 5.08 5.8 7.43 9.58 12.02 Value Uncertainty 0.20 0.16 0.17 0.21 0.29 0.01 0.01 -0.04-0.04-0.01Bias

Table 3 Accuracy

JCCRM411-4 (lot 6) was used for the accuracy evaluation by comparing the certified value with the mean of quintuplicate measurement of each level.

ログラムに参加し、同認証試料40例の測定を行った。 評価はNGSPの二次基準施設であるSRL(Secondary Reference Laboratory)により行った。

## 5) 干渉性

影響度合いの評価は未添加をブランクとし、最大および中間の2濃度の試料の測定を行いブランクとの差を確認した。

(1)共存物質の影響はビリルビン-Fおよびビリルビン-C (100mg/dL), アスコルビン酸 (300mg/dL) まで確認した。

(2)修飾へモグロビンの影響はレイバイルHbA1c(グルコース1,400mg/dL添加),カルバミル化(シアン化Na25mg/dL),ホルミル化(アセチルアルデヒド25mg/dL),アセチル化ヘモグロビン(アセトアルデヒド25mg/dL)まで確認した。

#### 6) 変異ヘモグロビンの影響

国際臨床化学会連合 (IFCC, The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) より提供を受けた主要変異へモグロビンHbAC, HbAS, HbAE およびHbADについて,これらの影響を受けないことが報告されているHA-8180V Variant Mode<sup>6)</sup>を比較対照法として、各約5.0%、約6.0%、約7.0%、約8.0%の計4例

について、評価を行った。

#### 4. 成績

#### 1)精密性

並行精度は正常域でCV1.08%, DM域でCV0.97%, また中間精度は正常域でCV0.52%, DM域でCV0.47%であった。(Table 2)

### 2) 正確性

正確度はJCCRM411-4の5レベルル試料の測定平均値 と認証値からの差は0.1%以下であった。(**Table 3**)

#### 3) 直線性

測定範囲 $4.0\sim16.0\%$ における実測値の理論値からの差は $\pm2.0$ 相対%以下であった。(Fig. 3)

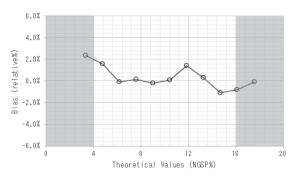
## 4) 相関性

HA-8180V Variant Mode との相関性は、n=120、y=0.984x+0.23、r=0.999とThe Lab 001の測定範囲でよく一致していた。(**Fig. 4a**)

NGSP SRLとの相関性は、n=40, y=1.013x - 0.11, r=0.996で、かつ2019年から厳格化されたNGSP認証基準(認証値±5相対%)を満たした。(**Fig. 4b**)

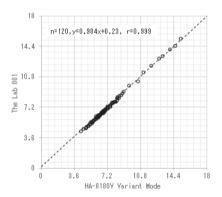
#### 5) 干渉性

干渉性は全ての共存物質および修飾へモグロビン最大

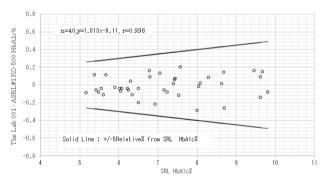


The plots in the graph are the mean of triplicate measurement of each level. The gray zone is under or over of the measurement range.

Fig. 3 Linearity



(a) 120 samples which covered the measurement range of The Lab 001were used for the comparison with HA-8180V Variant Mode and both results were well aligned within the range.



(b) 40 frozen samples of 2019 NGSP certification were used for comparison with NGSP ASRL#1 certified value. The results were satisfied with the NGSP criteria which has been tightened to +/-5% since 2019.

Fig. 4 Correlation

	Unconjugated Bilirubin	Conjugated Bilirubin	Ascorbic Acid	D-Glucose	Sodium Cyanate	Acetylsalicyl ic Acid	Acetaldehyde
Max. Concentration (mg/dL)	100	100	300	1500	25	100	25
Blank	5. 08	5. 12	5. 12	6. 16	6. 60	6. 23	6. 60
50%	-0.59%	-0. 59%	-0. 20%	-0.16%	-3. 03%	-1.77%	-2. 58%
100%	0. 59%	-0. 98%	-0. 20%	1. 79%	-2. 27%	-2. 73%	-1. 21%
	Unaan iugatad	Conjugated	Accorbic		Codium	Acetylsalicyl	

Table 4 Interference of Bilirubin, Ascorbic Acid and Modified Hemoglobin

Ascorbic Sodium Unconjugated Conjugated ic D-Glucose Acetaldehyde Bilirubin Bilirubin Acid Cvanate Acid Max Concentration 100 100 300 1500 25 100 25 (mg/dL) 7.40 Blank 7. 43 7. 43 7.84 8.56 7.83 8.00 509 100% 1.76% -1.62% 2.42% -1.66% -0.47% -1.66% -3.63%

Each level (Blank, 50%, 100%) was measured quadruple and it's mean value was used for the evaluation. The mean value of each was in the blank cell and the fluctuation from the blank as relative % was in the 50% and 100% cells.

HbAE HbA1c HbAD Level HA-8180V TheLab001 Bias HA-8180V TheLab001 Bias 5.34 0.9% 5% 5. 29 5.03 5.00 -0.6% 6% 6.32 6.41 4% 6.02 5.88 -2. 3% 1 2% 7% 7. 16 7.32 7<u>. 13</u> 7.07 -0.8%8% 7.88 7.82 -0.8% 7.99 8.12 1.6% HbA1c HbAS HbAC HA-8180V TheLab001 HA-8180V Bias TheLab001 Level Bias -0.4% -2.5%5.20 5% 5.12 5.10 5.07 6.07 6.23 2.6% 6.01 5.95 -1.0%6% -2.2% 6.93 7% 6.89 6.74 7.05 -1. 7% 7.61 8.98 8.53 -5.0%7.48 7% 8%

 Table 5
 Interference of Major Hemoglobin Variants

The figures in the table is the mean of triplicate measurements for HA-8180V and Quadruple measurements for The Lab 001. The Bias is the relative %.

濃度において  $\pm$  5.0 相対%以下であった (Table 4)。

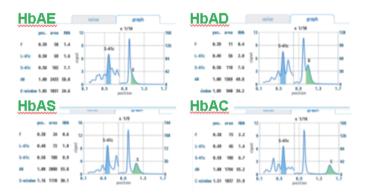
#### 6) 変異ヘモグロビンの影響回避

評価した変異ヘモグロビン試料について測定値と対照法との差は±5.0相対%以内でありNGSPの推奨する対照法±7.0相対%以内の基準®を満たした(**Table 5**)。

#### 5. 考察

今回我々はキャピラリー電気泳動法に陽イオン交換動電クロマトグラフー法を用いたことで、小型・簡便さに迅速さを兼ね備えた製品を新たに開発した。その基本性能は精密度、正確度、直線性、相関性は良好で、干渉物質に加えNGSPが推奨する主要変異へモグロビンを検出し(Fig. 5)、その影響を受けない精確な検査値を提供できることを実験検証にて確認した。HbAlc測定法は、その臨床的有用性の評価が分離分析を原理とするHPLC法を中心に進められき

たが、その後自動分析装置に適応可能で大量処理や小型化が可能な免疫法や酵素法などの生物化学法が開発され、現在検査室業務効率化の観点で現在普及している。しかし生物化学法は、その反応により結果として得られるHbAlcに特化した方法であるため、患者・受検者のヘモグロビン成分の構成は確認できない。分離分析法の本法はこれができる強みがあり、HbFなどの付加価値情報を得ることができる。また生物化学法の幾つかは、血球を測定試料とするため、検体溶血によるHbAlcの血漿への流出による偽低値の課題を抱えている<sup>7</sup>。そのため検査現場は、現状検体取り扱いや血液検査の結果を良く確認して日常業務に当たる必要があるが、特に小規模施設においてはその対応が必ずしも容易でないと考える。本法は全血測定であるため、この心配がない。本製品は指先血で検査できるため、侵襲性が低く、小規模医療施設における診療前即時検査の大幅な



The peaks of the hemoglobin variant are illustrated in green color in the display with the variant mane (E/D/S/C). Moreover, the position (x-axis) is extended to 1.7 from 1.3 and the scale of signal (y-axis) is changed in front of HbAO to show the peak top in case the hemoglobin variant detection.

Fig. 5 Electropherogram of Major Hemoglobin Variants cases

TAT (Turn Around Time) 短縮が期待できる。また、変異ヘモグロビン検出が可能なため大規模施設における検体由来のクロマトグラム異常発生時の一次精査用としても活用できると考える。

#### 6. 結語

HbAlcは、糖尿病の診断、血糖コントロールのモニタリング指標としてなくてはならない存在を確立している $^{8.9.10}$ 。一方、その普及は未だ道半ばにある $^{11}$ 。我々は、製造販売元としてHPLC法を原理とする分離分析法の製品を中心とし提供してきたが、これまで患者・受検者に直接向き合える丁寧で迅速な検査値提供を通して、高まるHbAlc検査の需要に対する十分な対応の必要があった。我々が今回開発したThe Lab  $^{001}$ でこれを実践し、さらなる信頼性の高い糖尿病診断・モニタリングを通して患者・受検者QOL(Quality of Life)向上に努める。

本論文の内容は、日本臨床検査自動化学会第51回大会 にて発表した。

著者はアークレイ㈱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。

#### 文 献

 WHO:GLOBAL HEALTH ESTIMATES 2016 SUM-MARY TABLES, http://www.who.int/healthinfo/

- global\_burden\_disease/estimates/en/
- WHO:Global report on diabetes 2016:http://www. who.int/diabetes/global-report/en/
- 3) Wieland Hoelzel, Cas Weykamp, Jan-Olof Jeppsson, et al. IFCC Reference System for Measurement of Hemoglobin A1c in Human Blood and the National Standardization Schemes in the United States, Japan, and Sweden: A Method-Comparison Study. Clinical Chemistry 2004;50:166-174
- WHO:Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus, 2011
- 5) 清野裕, 南條輝志男, 田嶼尚子, et al. 糖尿病の分類 と診断基準に関する委員会報告(国際標準化対応版) 糖尿病2012;55:485-504
- Curt Rohlfing, Steven Hanson, Cas Weykamp et al, Effects of Hemoglobin C, D, E and S traits on Measurements of Hemoglobin A1c by Twelve Methods, Clin Chem Acta. 2016:455:80-83
- 7) 宮下徹夫,山舘周恒,中山智祥.遠沈後の赤血球層 を試料とするHbAlc測定法における溶血の影響,日 本臨床検査自動化学会会誌,2014;39(3):328-334.
- 8) 日本糖尿病学会編・著. 糖尿病治療ガイド2018-2019:10-43
- ADA:6. Glycemic Targets. Standards of Medical Care in Diabetes-2019. Diabetes Care, 2019;42 (Suppl. 1):S61-S70
- 10) IDF:6 Glucose control levels. Global Guideline for Type 2 Diabetes, 2012;38-42
- 11) WHO:Diabetes country profiles:2016:http://www.who.int/diabetes/country-profiles/en/

## ディープラーニングを用いた尿中赤血球の形態分類

Morphological Classification of Urinary Red Blood Cells Using Deep Learning

山本雄彬 市村直也 東田修二

要旨 尿沈渣検査は、全自動尿中有形成分分析装置によって一部自動化されたが、鏡検法による目視確認は欠かすことができない。しかし、鏡検法は検査者の熟練度が検査結果に直接影響するため、沈渣成分分類の自動化が必要である。今回、検査者が判定に苦慮する成分のひとつである尿中赤血球形態を分類するディープラーニングモデルを構築し、その性能を検証した。分類モデルにファインチューニングおよびデータ拡張を利用することで、人間の分類に対する認識精度が95.2%と高精度に一致する分類ができた。ディープラーニングの応用により、尿沈渣検査のさらなる自動化が可能と考えられる。

**Key words** urinary red blood cells, Deep learning, fine-tuning, data augmentation

#### 1. はじめに

尿沈渣検査は、自動分析装置が上市された現在でも、顕微鏡による目視(鏡検法)が欠くことのできない検査である。無遠心尿を対象とする自動分析装置と遠心後の沈渣成分を対象とする鏡検法では、沈渣成分によって結果が乖離することが報告されており<sup>1,2)</sup>、自動分析装置のみですべての検査を実施することは検査の信頼性の観点から不可能と考えられている<sup>3)</sup>。尿沈渣検査での鏡検法の必要性が言われている一方で、検査者間の熟練度の差が検査結果に技師間差として直接影響する。例えば、尿中有形成分の中でも尿中赤血球形態は、糸球体型/非糸球体型の判定が尿路系の出血部位の推定に有用である<sup>4,5)</sup>が、鏡検者が判定に特に苦慮する成分のひとつであり、技師間差・施設間差が大きい項目であると考えられている。実際に、日本臨床衛生検査技師会の精度管理

Received Jan. 14, 2020; Accepted Apr. 6, 2020 Kazuaki YAMAMOTO, Naoya ICHIMURA, Shuji TOHDA

東京医科歯科大学 医学部附属病院検査部 Clinical laboratory, Medical Hospital of Tokyo Medical and Dental University

東京都文京区湯島1-5-45

1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan Corresponding author: 山本 雄彬

Tel: 03-5803-5624(直通) Fax: 03-5803-5618

E-mail: kzakmlab@tmd.ac.jp

調査では、糸球体型赤血球が2枚出題されたフォトサーベイの正答率が62.7%(平成27年)<sup>6)</sup>、53.1%(平成29年)<sup>7)</sup> と特に低かった。したがって、尿沈渣検査の精度向上には、沈渣成分を検査者の技量に依存せずに自動分類するシステムの構築が必要である。

近年、ディープラーニングが様々な分野へ応用されている。ディープラーニングは画像分類や物体検出において利用され、医用画像分野では眼底画像から糖尿病網膜症の検出<sup>8)</sup>、病理標本の腫瘍組織識別<sup>9)</sup>などに応用されている。しかし、これまでディープラーニングを尿沈渣検査の鏡検法に応用し、臨床検査技師とディープラーニングでの分類結果を比較した報告はない。

今回、ニューラルネットワークライブラリの一つである Keras を用いて、尿中赤血球を糸球体型/非糸球体型に二値分類するディープラーニングモデルを構築し、分類性能を検証した。このモデル構築では、分類モデルの学習に膨大な数の学習用画像データが必要であり、画像の入手が困難な場合には学習データが小ない場合の対類ができない。そこで、学習データ数が少ない場合の対策としてファインチューニングやデータ拡張が有効とされる。ファインチューニングやデータ拡張が有効とされる。ファインチューニングとは、膨大なデータセット(ImageNet などが代表)で学習したモデルの一部を利用して、自らの解析対象とするデータセットで再学習する手法である。この方法は、動物や乗り物などを分類する性能を持つ学習済モデルを流用することで、解析対象の学習データが少ない場合でも、目的の画像を分類する

ことができるとされる。またデータ拡張は学習用の画像 数を増幅する手法で、画像を上下左右にわずかにずらし たり、左右にわずかに回転させたりといった調整を自動 で行い学習画像を割り増す処理をいう。構築した分類モ デルの性能は、損失関数と認識精度で評価する。損失関 数(Loss function)は、構築したモデルがデータを分類 した時の誤分類の程度を表す指標である。すなわち、 Loss functionを最小化することは、モデルの性能の良 さを最大化することに等しい。一方、認識精度 (Accuracy) は、現在のモデルが訓練データおよびテ ストデータを分類したときの正解一致率(%)を表す。 Loss functionは0に近いほど、Accuracyは100%に近い ほど分類モデルの性能は良好であると判断し、未知デー タに対する分類モデルの性能はテストデータのLoss function と Accuracy で評価する。

分類モデルにファインチューニングおよびデータ拡張 を利用することで、人間が実施した赤血球形態分類に対 して良好な成績を得たので報告する。

## 2. 材料および方法

#### 1) 実行環境

以下すべての検証をHP社製のPavilion Gaming 15 (OS: Windows10, GPU: GeForce 1050Ti) にて行った。

以下(1)~(3)を使用してディープラーニングモデルを構 築した。PythonのインストールにはAnaconda<sup>10)</sup>を使用 した。

- (1) Python 3.6.8
- (2) TensorFlow-gpu 1.13.1
- (3) Keras 2.2.4

また,以下(4)~(6)を用いてGPUの使用環境を設定した11)。

(4) Visual Studio 2017

- (5) CUDA ver.10.0 win10
- (6) cuDNN ver.7.4.2

エディターにJupyter Notebookを使用して分類モデ ルの構築し、学習および検証を行った。

#### 2) 画像データの前処理

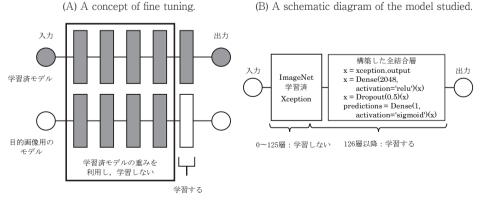
尿沈渣の観察および赤血球の分類は、「尿沈渣検査法 2010」(JCCLS GP1-P4)<sup>12)</sup>に従い, 一般検査従事歴17年 の臨床検査技師の指導のもとで、一般検査従事歴8年の 臨床検査技師が実施した。尿沈渣を顕微鏡(HPF)で 観察後、顕微鏡に備え付けられたデジタルカメラで撮像 し、ドーナツ状不均一赤血球、有棘状不均一赤血球、ド ーナツ・有棘状不均一混合型赤血球の糸球体型赤血球 70枚、円盤状赤血球、球状赤血球、円盤・球状移行型 赤血球の非糸球体型赤血球72枚のIPEG画像を得た。各 画像を100×100ピクセルのサイズに切り出し、それら の画像から目視確認によって識別できる状態で赤血球を 含む画像を抽出した。作成した糸球体型赤血球1000枚 と非糸球体型赤血球1000枚の画像を訓練データとテス トデータに分割した。ディープラーニングに用いる学習 データは一般的に、60%~80%を訓練データ、20%~ 40%をテストデータとして使用する13)ため、訓練デー タ (training data): 各700枚とテストデータ (test data):各300枚とした

#### 3) ファインチューニングとデータ拡張

ファインチューニングの概念図をFig. 1(A)に示した。 ImageNetで学習済みの Xception<sup>14,15)</sup> モデルから全結合 層を除き、別途構築した全結合層を接続した。構築した モデルの概略図をFig. 1(B) に示した。構築したモデル の0層から125層までをフリーズし学習を行わず、126 層以降のみで学習を行った。

データ拡張は、訓練データ700枚に対して、

(B) A schematic diagram of the model studied.



**Fig. 1** Fine-tuning in this study.

ImageDataGenerator<sup>16)</sup>で行った。

#### 4) エポック数、最適化手法、学習率、Loss function

学習エポック数は2000とした。最適化手法にSGDを使用し、学習率は $1.0 \times 10^{-2}$ からスタートし、直線的に減少して2000エポックで $1.0 \times 10^{-5}$ となるように設定した。Loss functionはバイナリクロスエントロピーを使用した。

## 5) ディープラーニングモデルによる尿中赤血球形態の 分類

以下に示した(1)~(4)の条件において構築したモデルで、訓練データによる学習を繰り返し、テストデータの赤血球画像を糸球体型/非糸球体型に分類させた場合のAccuracyを求めた。

- (1) ファインチューニングおよびデータ拡張を利用しない
- (2) ファインチューニングを利用し、データ拡張を利用 しない
- (3) ファインチューニングを利用せず, データ拡張を利 用する
- (4) ファインチューニングおよびデータ拡張を利用する

#### 3. 成績

#### 1) ファインチューニングの効果

ファインチューニングの効果を、データ拡張を利用し

ない条件で検証した(Fig. 2)。ファインチューニングを利用した場合、訓練データでは、Loss functionは漸減し 0付近に収束し、Accuracyは漸増して100%付近に収束した(灰色線:training data\_fine-tuning)。テストデータでは、Loss functionは学習過程で減少せず200エポック付近まで増加し0.75付近で収束し、Accuracyは学習初期で88%付近に収束した(青線:test data\_fine-tuning)。一方、ファインチューニングを利用せず、Xceptionモデルの全ての層で学習した場合、訓練データでは学習開始後すぐにLoss functionは0、Accuracyは100%となった(黒線:training data\_none)。テストデータのLoss function、Accuracyはいずれもはじめに大きく変動しながら推移し、800エポックを超えたあたりでLoss functionは1.21付近、Accuracyは84%付近に収束して、その後改善されなかった(赤線:test data\_none)。

#### 2) データ拡張の効果

データ拡張の効果を、ファインチューニングを利用しない条件で検証した(Fig. 3)。データ拡張を利用した場合、訓練データでは、Loss functionは漸減し0付近に収束し、Accuracyは漸増して100%付近に収束した(灰色線:training data\_Data augumentaion)。テストデータでは、Loss function、Accuracyともに学習の過程で大きく変動しながら推移して、2000エポックの時点でLoss

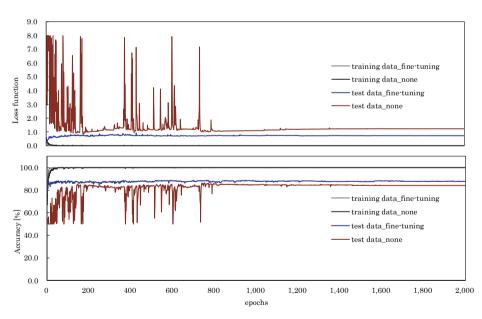


Fig. 2 The effect of fine-tuning without data augmentation: the upper panel shows the value of the loss function, and the lower panel shows the transition of recognition accuracy. The training data and the test data with fine-tuning are represented by gray and blue lines, and the training data and the test data without fine-tuning are represented by black and red lines.

function は0.27付近, Accuracy は95 %付近に収束した (青線: test data\_Data augumentaion)。データ拡張を 利用しなかった場合には、Fig. 2のファインチューニン グを利用しなかった場合と同データを表示した(黒線: training data\_none, 赤線: test data\_none)。

#### 3) 分類モデルの認識精度

ファインチューニングおよびデータ拡張を実装した分類モデルの性能を検証した(Fig. 4)。構築したモデルにて5回の学習と検証を実施した結果、訓練データとテストデータはともに学習が進むにつれてLoss functionが漸減し、Accuracyが漸増した。2000エポック学習後のテストデータのLoss functionは0.20付近に収束し、Accuracyの平均値は95.2%であった。学習したモデルで、赤血球画像各100枚を分類した結果をFig. 5、Fig. 6に示した。このうち分類結果が正解ラベルに一致しなかったものを画像上辺に青線で表示した。糸球体型赤血球は100枚中100枚、非糸球体型赤血球ともに100枚中94枚で正解に一致した。非糸球体型赤血球を糸球体型赤血球と間違えて分類した画像では、赤血球の辺縁が不整、赤血球サイズが小さい、画像に含まれる赤血球の範囲が小さいといった特徴があった。

## 4. 考察

本研究では、ディープラーニングを尿中赤血球形態の分類に応用し、その有用性を検証した。医用画像は一般的な画像に比べ、その入手や利用が困難な場合も多く、学習に用いることのできる画像データが少なくなる。通常ディープラーニングで学習を行う場合、膨大な量の画像データを必要とし、学習するデータが少ないと上手く学習が行えず、良好な結果を得ることができない。そのような場合、ファインチューニングやデータ拡張が有効とされており、今回の検討においてこのふたつの手法を利用し、良好な結果を得た。

ファインチューニングの効果を検証した結果、Fig. 2 に示したように、ファインチューニングを利用した場合には学習初期からLoss function、Accuracyは大きく変動することなく推移した。一方、ファインチューニングを利用しなかった場合にはLoss function、Accuracyは大きく変動して推移した。これは、ファインチューニングを利用しなかった場合、すなわちImageNetを学習した重みを使用せずにランダムな初期値から全ての層で学習を行った場合では、分類に最適な重みを見つけ出すまでに時間を要したことを示している。ファインチューニ

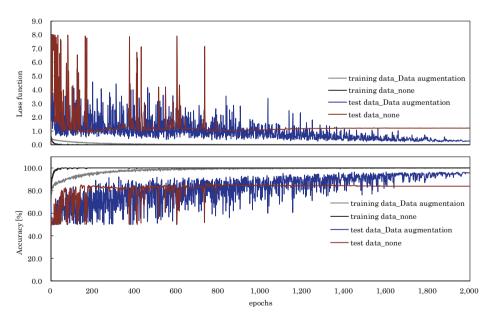
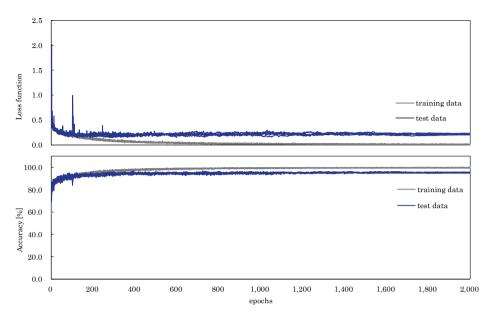


Fig. 3 The effect of data augmentation without fine-tuning: the upper panel shows the value of the loss function, and the lower panel shows the transition of recognition accuracy. The training data and the test data with data augmentation are represented by gray and blue lines, and the training data and the test data without data augmentation are represented by black and red lines.



**Fig. 4** The loss function and the accuracy of the model using fine-tuning and data augmentation: the upper panel shows the value of the loss function, and the lower panel shows the transition of recognition accuracy. The training data and the test data are represented by gray and blue lines.

ングを利用したところ、Accuracy は学習初期から70%以上、2000エポック経過後には89.2%なった。このことから、ImageNetで学習した重みは尿中赤血球の形態分類にも有用であり、ファインチューニングによって学習に必要なエポック数の削減が可能であることがわかった。訓練データのLoss functionは0付近に収束したことから、訓練データに対するモデル性能は良好であったが、テストデータのLoss functionは学習を進めるにつれて増加した。これは、答えの与えられた訓練データに対しては高い精度で分類することができるが、答えが未知のデータ(テストデータ)の分類精度は低い(=汎化性能が低い)状態で、過学習と呼ばれる。過学習は訓練データの数が少ない場合に生じるため、今回の検討に使用した各700枚の学習用画像ではデータ量が不足していたことがわかった。

この学習用データ不足を補い、過学習を抑制するためにデータ拡張を行い、その効果を検証した(Fig. 3)。データ拡張を利用した場合では、利用しなかった場合よりもAccuracyは良好であり、データ不足を補うことにより過学習を起こすことなく分類精度を改善できることがわかった。ただし、データ拡張のみを利用した学習では、Loss function、Accuracyの収束に2000エポックを要した。モデル各層の重みの初期値がランダムな値であ

るため、学習結果は安定せず、分類に最適な重みに到達 するまでに時間を必要としたと考えられた。

ファインチューニングおよびデータ拡張を実装したモデルによるLoss functionとAccuracyはFig. 4に示したように良好であり、尿中赤血球形態の分類にディープラーニングは有効であった。ファインチューニングを利用したことで分類に最適な重みの探索のためのエポック数の削減が可能であり、データ拡張を利用したことで過学習を起こすことなく学習が可能であった。また、Fig. 3、Fig. 4より、2000エポックの学習でファインチューニングを利用した場合とファインチューニングを利用した場合とファインチューニングを利用しなかった場合の分類精度は同程度となることがわかった。しかし、一般的にディープラーニングによる学習には時間を要することが知られており、ファインチューニングによって学習に必要なエポック数を削減できるのは大きな利点であると考えられる。

ファインチューニングおよびデータ拡張を実装した学習済みモデルで糸球体型赤血球100枚 (Fig. 5), 非糸球体型赤血球100枚 (Fig. 6) をそれぞれ分類した結果, その大部分は, 画像に赤血球全体が含まれなくとも正解に一致した分類が可能であったが, 一部の画像では赤血球の辺縁不整や赤血球のサイズを要因に誤分類したと推測された。

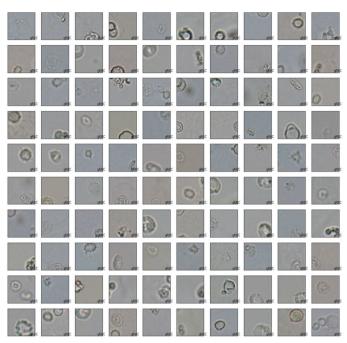


Fig. 5 Classification result of glomerular red blood cells by trained model: the classification result is shown in the lower right of the image (gRBC: glomerular red blood cells, N-gRBC: non-glomerular red blood cells). The top side of the image where the classification result did not match the correct label is indicated by a blue line.



Fig. 6 Classification result of non-glomerular red blood cells by trained model: the classification result is shown in the lower right of the image (gRBC: glomerular red blood cells, N-gRBC: non-glomerular red blood cells). The top side of the image where the classification result did not match the correct label is indicated by a blue line.

従来の分析装置による分類では、遠心尿と非遠心尿の違い、半定量と定量の違い、実測定量の違いから鏡検法と結果が乖離する1)ことが知られている。本研究ではディープラーニングによる画像認識を利用して、鏡検法と同じく遠心後の沈査成分を分類しているため、これらの違いによる乖離はないと考えられる。しかしながら、赤血球画像のみを学習データとして用いたため、シュウ酸カルシウム結晶、細菌を多く含む検体、高濃度の検体による乖離2)に対しての効果は不明であり、シュウ酸カルシウム結晶など他の成分を学習データに加えた検討が必要である。また、非糸球体型赤血球である膜部顆粒成分凝集状脱へモグロビン赤血球の画像を得ることができなかったため、本モデルでの分類の可否は不明である。

ディープラーニングによって、 尿中赤血球のように複 雑な形態をとる成分を分類することができたことから, 主要な尿中有形成分についても分類可能であると期待で きる。しかし今回の検討では、与えられた赤血球画像が 糸球体型/非糸球体型の二値分類であったために高い分 類精度を得られたと考えられ、さらに多種類の成分を分 類する場合は、今回の検討に比べ分類精度は落ちること が予測される。また、今回のモデルは教師あり学習であ るため、人が分類できないものは分類することができな い。尿中有形成分の中でも出現が稀な成分では、検査者 が正確な分類をして画像データを収集することが困難と なるためディープラーニングを利用しても分類は難し い。今後、出現が稀な成分をもディープラーニングで分 類するためには、稀な成分を分類できる検査者の技量と 分類した成分を積極的に画像として収集することが必要 である。

今回の検討にあたり、撮像した顕微鏡画像データに対して、「分割処理して目的とする赤血球のみが含まれる画像を抽出する」という前処理を施した。しかし、実際に尿沈渣検査での活用を考えた場合に、「分割→抽出→分類」というこの工程は複雑で即時性がなく現実的ではない。鏡検法の自動化のためには与えられた顕微鏡の画像から尿中有形成分を検出し(物体検出)、分類・計数する(画像分類)機能が必要である。ディープラーニングによる物体検出と画像分類を用いた尿中有形成分の分類が今後の課題であり、ディープラーニングを応用することで、尿沈渣検査のさらなる自動化が可能となると考える。

#### 5. 結論

尿中赤血球形態分類に、ファインチューニングおよびデータ拡張を実装したディープラーニングモデルを適用する

ことで,人間が行う分類と高精度に一致する分類ができた。 ディープラーニングの応用により,尿沈渣検査のさらなる自 動化が期待できる。

本論文の要旨は,第51回日本臨床検査自動化学会(2019年10月)にて報告した。また,本論文に関連し,開示すべきCOI関係にある企業などはない。

#### 女 献

- 橋本綾,田中佳,松本正美,ほか.全自動尿中有形成分分析装置UF-5000の性能評価.医学検査 2017;66:255-265
- 堀田真希,小林渉,松田沙希子,ほか.尿中有形成 分分析装置 Atellica UAS800の基礎的検討. 医学と 薬学 2018:75:407-415.
- 3) 宿谷賢一,森田賢史,久松崇司,ほか.全自動尿中有 形成分分析装置UF-5000と全自動尿中有形成分撮像ユニットUD-10の比較検討.医学と薬学 2019;76:1311-1323.
- 4) 宿谷賢一. 尿中赤血球はどのように分類: 判定するか. Medical Technology 2011;39:892-896.
- 5) 堀田真希. 尿中赤血球形態変化のメカニズムと血尿 診断ガイドラインにおける尿中赤血球形態情報の重 要性. 生物試料分析 2015;38:235-242.
- 6) 一般社団法人日本臨床検査衛生検査技師会. 6.一般 検査. 平成27年度日臨技臨床検査精度管理 調査報 告書 2016:21
- 7) 一般社団法人日本臨床検査衛生検査技師会. 6.一般 検査. 平成29年度日臨技臨床検査精度管理 調査報 告書 2018:27
- 宮下充浩, 畑中裕司, 小郷原一智, ほか. 畳み込み ニューラルネットワークを用いた眼底画像における 毛細血管瘤の自動検出. Medical Imaging Technology 2018:36:189-195
- 9) 服部英春, 柿下容弓. 染色濃淡自動分類とCNNを用いた腫瘍組織識別技術. Medical Imaging Technology 2017;35:273-280
- 10) "Anaconda Distribution". Anaconda (オンライン), 入手先〈https://www.anaconda.com /distribution/〉, (参照 2019-10-20).
- 11) "GPU support". TensorFlow (オンライン), 入手先 〈https://www.tensorflow.org/install/ gpu#hardware\_requirements〉, (参照 2019-10-20).
- 12) 一般社団法人日本臨床衛生検査技師会. 尿沈渣検査 法 GP1-P4. 尿沈渣検査法 2010 2011:7-10
- Sebastian Raschka, Model Evaluation, Model Selection, and Algorithm Selection in Machine Learning. arXiv:1811.12808v2. Available from URL: https://arxiv.org/abs/1811.12808v2
- 14) François Chollet. Xception: Deep Learning with

Depthwise Separable Convolutions. The IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) 2017;1251-1258. Available from URL: http://openaccess.thecvf.com/content\_cvpr\_2017/ html/Chollet\_Xception\_Deep\_Learning\_CVPR\_2017\_paper.html

- 15) "Keras Applications". Keras Documentation (オンライン), 入手先〈https://keras.io /ja/applications/〉, (参照 2019–10–20).
- 16) "ImageDataGenerator". Keras Documentation (オンライン),入手先〈https://keras.io/ja/preprocessing/image/#imagedatagenerator\_1〉, (参照 2019-10-21).

# 血中IgG4測定試薬「N-アッセイLA IgG4ニットーボー」の 基本性能評価

Fundamental Performance Assessment of "N-Assay LA IgG4 Nittobo" for Measurement of IgG4

田中真輝人<sup>1)</sup> 梅森祥央<sup>1)</sup> 髙橋祐輔<sup>2)</sup> 遠藤輝夫<sup>2)</sup> 淺沼康一<sup>1)</sup> 髙橋 聡<sup>1,3)</sup>

要旨 汎用自動分析装置に搭載可能な「N-アッセイLA IgG4ニットーボー」の基本性能を評価した。その結果,併行精度,室内再現精度および試薬安定性は良好であった。検出限界は6.1 mg/dL,直線性は557 mg/dLまで得られ,プロゾーン現象も認めなかった。また,ヘパリンリチウム加血漿による測定も可能であった。一方,RF添加時に負の干渉を受けた。対照試薬との相関性は良好であったが,RFによる本法での偽低値と疑われる乖離を6例認めた。本試薬は基本性能に優れ,IgG4関連疾患の診断に特に有用と考えられたが,RF高値検体における結果の解釈に注意を要する。

Key words N-assay LA IgG4 nittobo, IgG4, IgG4-related disease, rheumatoid factor, false negative value

#### 1. はじめに

IgG4は、IgGのサブクラスの1つである。2001年 Hamanoら<sup>1)</sup>が自己免疫膵炎患者で高率に高IgG4血症を呈すると報告したことを契機に、IgG4関連疾患(IgG4-RD: IgG4-related disease)が本邦発信の新規疾患として注目されるようになった。IgG4-RDは、リンパ球とIgG4陽性形質細胞の著しい浸潤と繊維化により、同時性あるいは異時性に全身諸臓器の腫大や結節・肥厚性病変を認める原因不明の疾患である。「IgG4関連疾患包括診断基準」<sup>2)</sup>では、「血液学的に高IgG4血症(135 mg/dL以上)を認める」ことがIgG4-RDの診断基準の1つとして明記されている。加えて2010年にIgG4測定が保

険収載されたことで、IgG4の検査件数は近年大幅に増加している。

従来、血中IgG4の測定はネフェロメトリー法(NIA法:Nephelometric Immuno Assay)やJCA-BM8000シリーズにのみ搭載可能な免疫比濁法(TIA法:Turbidimetric Immuno Assay)試薬で実施されてきたが³.⁴,広く普及している汎用自動分析装置では測定出来なかった。しかし、2018年7月ラテックス免疫比濁法を測定原理とし、汎用自動分析装置に搭載可能な「N-アッセイLA IgG4ニットーボー」5)が発売されたので、その基本性能について評価した。

Received Nov. 25, 2019; Accepted Jan. 27, 2020 Makito TANAKA<sup>1)</sup>, Yoshifumi UMEMORI<sup>1)</sup>, Yusuke TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Teruo ENDOH<sup>2)</sup>, Koichi ASANUMA<sup>1)</sup>, Satoshi TAKAHASHI<sup>1,3)</sup>

1) 札幌医科大学附属病院 検査部

〒060-8543 北海道札幌市中央区南1条西16丁目291番地 Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital, Japan (291, South-1, West-16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, Japan)

<sup>2)</sup> 北海道医療大学 医療技術学部 臨床検査学科 〒 002-8072 北海道札幌市北区あいの里 2条5丁目 1 Department of Clinical Laboratory Science, School of Medical Technology, Health Science University of Hokkaido (2-5-1 Ainosato, kita-ku, Sapporo 002-8072, Japan)

3) 札幌医科大学 医学部 感染制御 · 臨床検査医学講座 〒 060-8543 北海道札幌市中央区南1条西16丁目291番地 Department of Infection Control and Laboratory Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine (291, South-1, West-16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, Japan)

Corresponding author: 田中真輝人 Tel: 011-611-2111(内線: 36430) E-mail: mkt-tnk@sapmed.ac.jp

## 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:302-147)を経て実施した。

#### 2) 試薬および測定機器

IgG4の測定は、「N-アッセイLA IgG4ニットーボー」 (ニットーボーメディカル株式会社)を、自動分析装置 「LABOSPECT 008」(株式会社日立ハイテクノロジーズ)に搭載し、メーカー指定のパラメーターにて実施した。比較対照は、TIA法を測定原理とする「IgGサブクラスBS-TIA3 IgG4」(株式会社医学生物学研究所)を用いて「JCA-BM9130」(日本電子株式会社)による測定を外注施設に依頼した。

#### 3) 測定原理

本試薬は、ラテックス免疫比濁法による競合法を測定原理としている。すなわち、検体にマウス抗IgG4モノクローナル抗体とヒトIgG4感作ラテックス粒子を添加すると、競合的な抗原抗体反応により凝集が起こる。このとき生成した凝集物の量を580nmにおける吸光度変化量として測定し、検体中のIgG4濃度を測定する。

#### 4) 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濃度のプール血清を20回連続測定したところ,変動係数 (CV) は0.82~2.63%であった (**Table 1**)。

#### 2) 室内再現精度

-80℃で凍結保存した併行精度と同様の試料を15日間連続でそれぞれ1日2回測定を行い、室内再現精度を調べた。なお、初日のみメーカー指定のキャリブレーターにて6点較正を行った。その結果、総合CVは1.74~

 Table 1
 Repeatability.

(n=20)

	Low	Medium	High
Mean (mg/dL)	65.9	174.9	443.7
SD	1.74	1.44	5.33
CV (%)	2.63	0.82	1.20

3.01%であった (**Table 2**)。

#### 3) 試薬安定性

試薬を搭載後較正し、併行精度および室内再現精度と同様の試料を1週間に1回2重測定した。その間の機器への試薬架設は、常時(以下、オンボード)またはメーカー推奨の測定時のみ架設(非測定時は閉栓冷蔵保存)の2条件とした。初日の平均値±5%を超えた場合を影響ありとすると、オンボードでは3濃度とも測定値の経時的な低下がみられた。特に低濃度試料では3週目に影響が確認された。いずれの濃度域試料も、再較正により初日の測定値と近似したが、日数経過とともに再び測定値は低下した(Fig. 1-A)。しかし、推奨条件では若干の変動はみられるものの7週目まで影響はなかった(Fig. 1-B)。

#### 4) 希釈直線性

希釈直線性を検討するため、高値プール血清を生理食塩水で10段階希釈後3重測定した。その結果、557 mg/dLまで良好な直線性が得られた。

#### 5) 検出限界

専用コントロールを2倍希釈した試料(理論値25 mg/dL)を用い、10段階希釈後それぞれ10重測定し、2SD法で検出限界を求めたところ、6.1 mg/dLであった。

#### 6) プロゾーン試験

理論値8,000 mg/dLの高濃度試料を,生理食塩水で10 段階希釈後,それぞれ3重測定し,プロゾーン現象の有無を検討した結果,検討範囲内で測定値の低下は認められなかった。

#### 7) 血清とヘパリンリチウム加血漿間の相関

患者 100 例の血清およびヘパリンリチウム加血漿を対象に、両者間の相関性を解析したところ、相関係数r=0.999、標準主軸回帰式y=0.99x-0.08と、相関性は極めて良好で、測定値も近似していた (Fig. 2)。

### 8) 共存物質の影響

プール血清(IgG4:150 mg/dL)に、5段階濃度の抱合型ビリルビン、非抱合型ビリルビン、溶血へモグロビン、乳糜、アスコルビン酸およびRFをそれぞれ添加後3重測定し、これらの影響を検討した。共存物質未添加

Table 2 Intermediate precision.

(n=15)

	Low	Medium	High
Mean (mg/dL)	72.7	170	462.4
SD	2.19	3.32	8.03
CV (%)	3.01	1.95	1.74

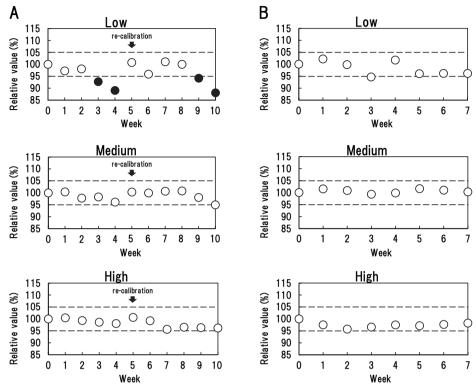


Fig. 1 Reagent stabilities.

- A. On-board.
- B. Recommended condition.

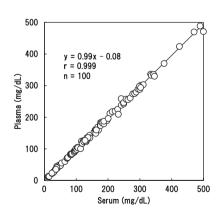


Fig. 2 Correlation of the IgG4 concentration between serum and plasma.

時の平均値±5%を超えた場合を影響ありとした。その結果,抱合型および非抱合型ビリルビンは20 mg/dL,溶血ヘモグロビンは500 mg/dL,乳糜は2,100FTU,アスコルビン酸は50 mg/dLの添加まで影響は認めなかったが,RFについては,添加濃度依存性に測定値が低下し、300 IU/mL以上の添加により影響が認められた(Fig. 3)。

#### 9) 相関

患者血清90例を用いて、本試薬と対照試薬との相関性を検討した結果、相関係数r=0.992、標準主軸回帰式 y=1.05x - 8.30と良好な結果が得られ、測定値も近似していた(Fig. 4)。また、本試薬の実測値が対照試薬に比べ±30%以上異なった検体を乖離と定義し、その有無を調べた。その結果、図中黒丸で示すように対照試薬よりも本試薬で著しく低値(対照試薬:10.1 mg/dL、本試薬:0 mg/dL)となる1例の乖離がみられた。この1例のRFは277 IU/mLと高値であった。

#### 10) RF高値例の検討

前述の検討から、高濃度のRF共存下では本試薬の測

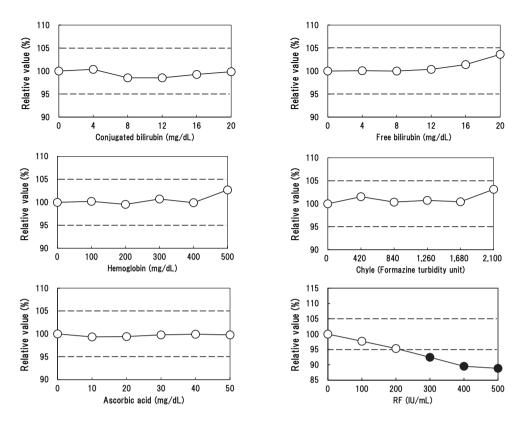


Fig. 3 Effects of interference substances.

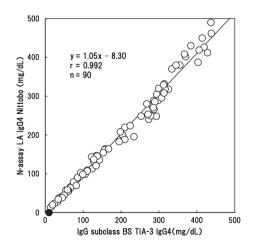


Fig. 4 Correlation between measured value of IgG4 concentration obtained by "N-assay LA IgG4 Nittobo" and "IgG subclass BS TIA-3 IgG4".

定値が負の干渉を受ける可能性が推測されたため、RF 高値血清10例( $420\sim3.898$  IU/mL)について、本試薬と対照試薬間で検証した。その結果、10例中5例で測定値が乖離し、いずれも本試薬で著明な低値となった。さらに、1例については対照試薬の測定値が1gG4-RD 診断のカットオフ値(135 mg/dL)を超える196 mg/dLとなる一方で、本試薬では65.4 mg/dLとカットオフ値未満であった(Table~3)。そこで、乖離検体5例についてRFの除去試験を実施した。すなわち、検体 $5\mu$ Lをニットーボーメディカル株式会社の専用RF除去剤 $50\mu$ L および生理食塩水 $45\mu$ Lと混和後、3.500rpmで7分間遠心した。その上清を試料として、本試薬で1gG4 濃度を測定しRF除去前後の測定値を比較したところ、5例中4例でRFの低下に伴った測定値の増加が認められた(Table~4)。

#### 4. 考察

本邦でIgG4-RDの概念が確立し、その診断にIgG4濃度測定の必要性が明記されていることから、近年その測

Table 6	Results of high Ri	concentration	cases.	
D(III/ I)		IgG4	(mg/dL)	

Table 3 Results of high RF concentration cases

	RF (IU/mL)	IgG4	(mg/dL)	
	RF (IU/mL)	N-assay LA IgG4 Nittobo	IgG subclass BS TIA-3 IgG4	
Deviated sample				
No. 1	667	5.8	24.3	
No.2	892	10.0	42.0	
No.3	1,338	58.7	87.5	
No.4	2,287	0.0	8.2	
No.5	3,898	65.4	196.0	
Non-deviated sampl	e			
No.6	420	10.6	13.4	
No.7	506	44.9	47.6	
No.8	532	111.3	116.0	
No.9	745	14.7	14.1	
No.10	984	46.9	45.3	

Table 4 Results of high RF concentration cases after RF removal.

	DE (III/I )	IgG4	(mg/dL)	
RF (IU/mL) -		N-assay LA IgG4 Nittobo	IgG subclass BS TIA-3 IgG-	
Deviated sample				
No. 1	80	20.0	24.3	
No.2	180	30.0	42.0	
No.3	120	72.0	87.5	
No.4	840	0.0	8.2	
No.5	640	148.0	196.0	

定件数は飛躍的に増加している。当院においても. IgG4測定が保険収載された2010年に年間653件であっ た測定件数は,2018年には2,367件と約3.6倍に増加した。

現在、IgG4の測定法はNIA法とICA-BM8000シリー ズのみ搭載可能なTIA法に限定されていることから、 当院を含め測定を外部委託している施設が大多数であ る。今回我々は、ラテックス免疫比濁法を測定原理とし、 汎用自動分析装置に搭載可能な血中IgG4測定試薬「N-アッセイLA IgG4ニットーボー」の基本性能について 評価した。その結果、併行精度、室内再現精度および検 出限界は、従来法3.40や既報50と比べ同等あるいはそれ 以上の成績でありプロゾーンも認められなかった。また、 推奨条件下における試薬安定性は7週目まで良好で、添 付文書上の保証期間である4週を上回る成績であった が、オンボードでは安定性が劣った。その原因は不明で あるが、再較正により測定値が改善することから、適切 な精度管理によりオンボードでの運用も可能であると考 えられた。

希釈直線性は,添付文書上の測定上限(500 mg/dL)を 上回る557 mg/dLまで良好で、従来法における300 mg/dL に比べ著しく測定範囲が拡大していた。

また、血清とヘパリンリチウム加血漿間の相関試験の 結果より、ヘパリンリチウム加血漿における測定も可能 であることが明らかとなった。当院ではIgG4-RDにお いて、IgG4との比が有用とされるIgGを含む生化学検 査項目の診療前検査には、ヘパリンリチウム加血漿を用 いている。本試薬は再検率の低下やTurn Around Time の向上に寄与し、診療前検査でIgG4およびIgGの同時 測定が可能となることで、IgG4-RDの診療に大きく貢 献できることが示唆された。

共存物質の影響では、RFの添加濃度依存性に測定値が 低下し、特に300 IU/mL以上の添加で5%以上の負の干渉 が認められた。対照試薬との相関性は良好で測定値も近似 していたものの、RF高値1例が本法で大幅に低値となった。 そこでRF高値10例で追加検討したところ, 5例は乖離を認 めなかったものの、残り5例ではいずれも本試薬における測 定値が低値を示した。さらに、ラテックス免疫比濁法では、 稀にRFが測定系に干渉し病態と矛盾したデータを呈する ことが知られている6。そこで、乖離した5例についてRF の除去による測定値の変化を確認したところ、4例では偽低 値が改善された。1例は変化がみられなかったが、これは、 本症例のIgG4濃度が測定下限付近であり、誤差により両試 薬間の測定値差が生じた可能性が考えられた。また、偽低 値の改善は認めたものの、いずれも対照法の測定値と近似 しなかった。原因として、RFの除去が不完全であることや 対照法のIgG4濃度がRFの影響を受けている可能性が推測 された。今後より多くのRF高値症例を蓄積し詳細な解析 を検討している。いずれにせよ、本検討により高濃度RFの 共存下では本試薬における測定値が偽低値となる可能性が あることが明らかとなった。IgG4-RDとの鑑別が必要な疾 患に加え、IgG4-RD自体においても約30%がRF陽性とな る<sup>7,8)</sup>ことを考慮するとRFの影響は無視できず、早急な試 薬改良が望まれる。

#### 5. 結語

血中IgG4測定試薬「N-アッセイLA IgG4ニットーボー」の基本性能は、概ね良好であった。汎用自動分析装置へ搭載可能で、測定範囲の拡大やヘパリンリチウム加血漿による測定が可能となったことで、従来法と比較し特に診療前検査における有用性が高いと考えられた。しかし、RFにより負の干渉を受けることに留意する必要がある。

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

- Hamano H, Kawa S, Horiuchi A, et al. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. N Engl J Med 2001;344:732-738.
- 2) IgG4関連全身硬化性疾患の診断法の確立と治療方法の開発に関する研究班,新規疾患,IgG4関連多臓器リンパ増殖性疾患(IgG4+MOLPS)の確立のための研究班.IgG4関連疾患包括診断基準2011.日内会誌2012;101:795-804.
- 3) 史 宇輝, 南雲治夫, 内藤 肇ほか. ネフェロメトリーによる IgG サブクラスの測定の基礎的臨床的検討. 医学と薬学 2002;48:115-120.
- 4) 川 茂幸、伊藤哲也、守田由香ほか、新規IgGサブクラス測定試薬「IgGサブクラスBS-TIA3 IgG1」「IgGサブクラスBS-TIA3 IgG3」 「IgGサブクラスBS-TIA3 IgG4」の基礎性能とIgG4
  - 「IgGサブクラスBS-TIA3 IgG4」の基礎性能とIgG4 の臨床的有用性の検討. 医学と薬学 2017;74:463-470
- 5) 松木友里,照内友也,森和雄.汎用自動分析装置に おけるIgG4測定試薬「N-アッセイLA IgG4ニット ーボー」の性能評価.医学と薬学 2018:75:849-858.
- 6) 大竹晧子,加野象次郎,渡邊清明.免疫比濁法によるCRP定量での異常反応と血清蛋白異常との関連. 臨床病理 2000;48:752-759.
- 7) 高橋祐樹, 山本元久, 苗代康可. IgG4関連疾患. ア レルギー 2011;60:687-691.
- 8) 正木康史. IgG4関連疾患: 内科の立場から. 口咽科 2018;31:77-81.

## 抗サイログロブリン抗体がサイログロブリン測定に 与える影響について

The Effect of Antithyroglobulin Antibody on Serum Thyroglobulin Level.

## 俵木美幸 阿部正樹 横山雄介 中田浩二

**要旨** われわれは、抗サイログロブリン抗体(TgAb)の干渉が問題となっているサイログロブリン(Tg)測定において、TgAbがTg測定に与える影響をin vitroで実験し確認した。

今回の検討結果から、現状の測定法においても患者血清中のTgAbがTg測定系を阻害することがin vitroで確認された。本現象の認識が改めて必要であり、Tg測定時にはTgAbの測定も合わせて行うことが望ましいと考える。

Key words thyroglobulin, pseudo-negative result, anti-Tg antibody, protein G, purified IgG

#### はじめに

甲状腺ホルモン生成のために欠かせないサイログロブリン(thyroglobulin:以下Tg)は、各種甲状腺疾患の治療経過判定のため、広く測定され、なかでも甲状腺分化癌の術後の経過観察では腫瘍マーカーとしての有用性が高い。しかし、このTg測定においては、慢性甲状腺炎などで高値を示す抗サイログロブリン抗体(anti thyroglobulin antibody:以下TgAb)の干渉が指摘されている<sup>1-2</sup>。今回われわれはTgAbがTg測定に与える影響について、in vitroでの実験を中心に検討したので報告する。

## 1. 対象

対象は東京慈恵会医科大学附属第三病院中央検査部に

Received Aug. 1, 2019; Accepted Feb. 6, 2020 Miyuki HYOKI, Yusuke YOKOYAMA, Masaki Abe, Koji Nakada

東京慈恵会医科大学附属第三病院 中央検査部 Central Clinical Laboratory, the Jikei University Daisan Hospital TgAbの依頼のあった検体のうち、TgAb値が400IU/mL以上の高値を示す20例を対象とした(Table 1)。そのなかで、TgAb値が1.560IU/mLの甲状腺癌術後の症例1と585IU/mLの未治療橋本病症例である症例4については、各免疫グロブリン分画の溶出を行った。なお、本検討は当施設の残余検体使用規定に基づき、患者の個人情報が特定されないように全て匿名化し使用した。

#### 1. 方法

## 1) Tgの測定

Tgの測定には蛍光酵素免疫測定法を測定原理とする AIA-2000 (東ソー社)を使用し、試薬は本装置の専用 試薬であるST Eテスト「TOSOH」II (サイログロブリン) (東ソー社)を用いた。

〒201-8601 東京都狛江市和泉本町4-11-1 4-11-1, Izumihoncho, Komae-shi, Tokyo, 〒201-8601, Japan

Tel: 03-3430-8686

E-mail: m-hyoki@jikei.ac.jp

#### 2) TgAbの測定

TgAbの測定には電気化学発光免疫測定法を原理とするCobas (Roche社)を使用し、試薬は本装置の専用試薬であるエクルーシス試薬Anti-Tg(Roche社)を用いた。

#### 3) ゲルろ過分析

症例1と4におけるゲルろ過は以下の条件によるカラム:TSKgel G4000SWXL( $7.8~\text{mm} \times 30~\text{cm}$ )(東ソー社),検体量: $100~\mu$ L,溶出:0.1M~PB+0.1~MNaCl(pH7.0),流速:0.5~mL/min,各フラクション:0.5~mL/tube

なお、得られた分画液は必要に応じてAmicon Ultra (MILLIPORE社) にて濃縮して検討に用いた。

#### 4) 添加回収試験

TgAb値が400IU/mL以上の検体20症例の血清に測定キットのTg標準液(1,050 ng/mL)を1:1の割合で添加し、Tgの回収率を求めた。

## 5) TgAb高値検体の各免疫グロブリン分画での添加回 収試験

症例1と症例4について、HPLCにより分画した免疫

グロブリン分画別の回収率を求めた。

#### 6) TgAb高値検体でのIgG除去前後の回収率の比較

プロテインG-アガロース(Roche社)と症例1の血清を2:1の割合で混合し、半日振とうの後、4℃で一晩放置し、遠心してIgG除去血清を作成する。作成したIgG除去血清と同濃度に調整した未除去血清それぞれにTg標準液を添加し、IgG除去前後の血清での添加回収率を比較した。

#### 7) ゲルろ過により得られたIgGとTg抗原の反応性の確認

症例1のIgG分画に抗原としてTg標準液(1,050 ng/mL)を添加し、再度ゲル濾過を行ない、得られた各分画中のTgを測定した。また、Tg標準液単独のゲルろ過分画もControlとして同様にTgを測定し、双方のTg測定値の分布を比較した。

#### 8) Tg抗原へのIgG添加による添加量と濃度の関係

症例1のIgGを段階的に希釈し、一定量のTg抗原液に添加した。その添加検体のTgを測定しIgG添加量と

**Table 1** Characteristics of the screening samples and results of the addition and collection test (①)

No.	Diagnosis name	TgAb(IU/mL)	Tg(ng/mL)	${\rm IgG(mg/dL)}$	Recovered(%)
1	Thyroid cancer(After surgery)	1,560	0.1>	1,130	64.8
2	Adenomatous thyroid tumor	570	17	1,613	93.0
3	Goiter	574	24.1	1,515	78.5
4	Hashimoto's disease(Untreated)	585	2	1,802	80.2
5	Hashimoto's disease	781	234.2	1,725	87.1
6	Hashimoto's disease	706	2.1	1,451	80.5
7	Hashimoto's disease	550	165.9	2,180	89.1
8	Hashimoto's disease	>4000	0.1>	1,378	49.3
9	Hashimoto's disease	>4000	0.2	1,625	29.3
10	Hypothyroidism	418	2.3	1,178	87.5
I.T: Not	tested				1

No. TgAb(IU/mL) Tg(ng/mL) IgG(mg/dL) Recovered(%) Diagnosis name 11 Hypothyroidism 456 135.1 1.337 91.0 12 Graves disease 554 19.1 1.122 77.7 13 1.440 0.7 1.365 61.0 Graves disease 14 170.2 1.126 936 Graves disease 493 Graves disease 36.4 1,226 91.4 16 Painless thyroiditis N.T 88.2 17 Thyroid dysfunction 992 1.0 1,150 51.4 Spinal cord cerebellur 18 44.6 619 0.1> 1,238 degenerative disease 19 Type II diabetes mellitus 456 2.3 1,293 76.3 20 1,210 Unknown 544 4.9 79.0

The average rate of collection: 74.7%

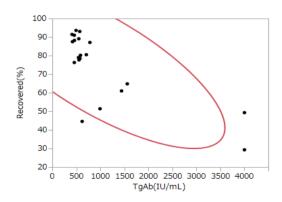
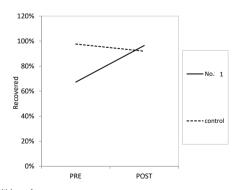


Fig. 1 Correlation test (2)



No.1 : Initial case 1 control : Non-thyroid disease patient serum

Fig. 2 Change in the Tg addition and collection test before and after absorption of IgG by protein G agalose (3))

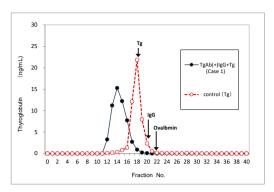


Fig. 3 Re-gel filtration examination by the Tg antigen addition to purified IgG (4)

Tg抗原測定値の関係を確認した。

## 2. 成績

#### 1)添加回収試験

TgAb値が400IU/mL以上の20症例における添加回収率は44.6~93.6%(平均回収率74.7%)となり、すべての症例で低下していた(**Table 1**)。なお、TgAb値と添加回収率の間には有意かつ負の相関が認められた(r=-0.751, P<0.001)(Fig. 1)

症例1と症例4について、免疫グロブリン分画別の回収率を確認した結果、症例1ではIgG74.2%、IgA97.6%、IgM101.2%、症例4ではIgG81.3%、IgA95.3%、IgM96.0%と2症例ともIgG分画のみ低い回収率を示した。

#### 2) IgG除去後の回収率の比較

症例1について、プロテインGによるIgG除去前後のTg添加時の回収率を比較したところ、除去前67.2%、除去後96.5%と回収率の改善が認められた。一方、対照とした甲状腺疾患を有さない患者血清での回収率は97.6%から 91.9%と大きな変動はなかった。以上のことから回収率の低下にはIgGが関与していることが推察された (Fig. 2)。

#### 3) ゲルろ過分画による IgG と Tg 抗原の反応性の確認

Tg抗原添加の症例1におけるIgG溶液とTg抗原単独溶液のゲルろ過分画溶出液のTgを測定し、プロットした(Fig. 3)。IgGに抗原を添加した溶液のピークは、Tg抗原単独のピークより高分子側へのずれが確認できた。

#### 5) Tg抗原へのIgG添加による添加量と濃度の関係

症例1のIgGを段階的に一定量のTg抗原に添加した 結果をFig. 3に示した。IgG非添加時に262.1IU/mLで あったTg値が480mg/dLのIgG添加により216.0ng/mL

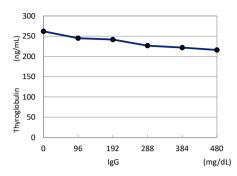


Fig. 4 Change in the Tg value by the addition of purified patient's IgG (5)

(-17.6%) まで低下することが確認できた (Fig. 4)。

#### 3. 考察

現在、Tgの測定には化学発光法を代表とする自動分析 法が広く用いられ、測定施設の多くでは診察前検査として 測定されている。これらの自動分析法が登場する前の放射 免疫測定法の時代から、Tg測定法におけるTgAbの影響 は問題となってきた1-2)。その影響回避のために5種類のモ ノクローナル抗体を用いた測定系の開発や<sup>3)</sup>、アッセイ系に 既知量のTgを加えてその回収率より実測値を補正する方 法4など種々の工夫がなされてきたが、現状では、患者血 清中のTgAbが認識するTg抗原の抗原認識部位と、一部 でも異なる部分を認識できるような抗Tgモノクローナル抗 体を極力組み合わせた試薬が用いられている5-60。しかし、 それらにおいてもTg測定系におけるTgAbの影響を完全 に回避するところまでは至っていない。今回の検討でも添 加回収試験を行った20症例について、Tg値が低値となる 傾向が確認できた。また、TgAb高値検体の免疫グロブリ ン分画にTg抗原を添加した回収率は、IgG分画のみ低い回 収率であったこと、同検体のプロテインG処理によるIgG 除去により、除去後の回収率が改善されたことからも、 TgAbがIgGクラスであることが確認できた。さらにTg抗 原を添加したIgG溶液と、Tg抗原単独溶液のゲルろ過分 画におけるTg活性の比較から、Tg本来の分子量ピークよ りIgG結合Tgの分子量は高分子側にずれ、TgとIgGの結 合による免疫複合体の高分子化が確認された。また、IgG 添加による影響については、TgAb値が1,560IU/mL と高 値であった血清から溶出したIgG最大480mg/dLのTg抗 原への段階的な添加により、46.lng/mL(17.6%)の低下が 認められた。血中でIgG濃度は1130mg/dLであることを合 わせて考えると一般的なTgの基準値が33 ng/mL程度で

あることも合わせてその影響度合いは小さくないものと思われた。

自己抗体が腫瘍マーカーやホルモンの測定系であるイム ノアッセイの測定値に影響を及ぼすケースには、今回のよ うな偽低値を示す場合と偽高値を示す場合がある。偽低値 を示すケースには測定対象物質のエピトープがマスクされ、 反応が阻害されることによる場合であり、 偽高値を示すケ ースには免疫複合体の高分子化による血中クリアランスが 低下する場合と自己抗体そのものが測定系へ干渉すること による場合があると考えられている7。これらの非特異的な 反応は、CEA、PSA、TSH、FT3<sup>7)</sup>などでの報告がなされ ており決して頻度が高いものではないが、 今回検討した TgAbや抗インスリン抗体などは発生頻度が比較的高いこ とに加え、臨床的な意義も明らかになっていることから保険 収載もされ、日常の測定項目として測定されている。また、 これら自己抗体による干渉の確認には、今回も有効であっ た添加回収試験の実施も推奨されているで。今回明らかに なったTgAbの干渉については、IgGがin vitroでTgと結 合することから測定系自体への干渉ではなく、IgG型の TgAbが血中でTgと結合し、Tgのエピトープがマスクさ れ、試薬中の抗Tg抗体との結合が阻止され、偽低値を引 き起こしたものと考えられた。

Tgは各種甲状腺疾患で高値を示し、治療経過の判定にも役立つほか、甲状腺癌の再発や転移の予知マーカーとして有用である。しかし、TgやTgAbは試薬メーカーごとに使用する抗体や認識するエピトーブが異なるため測定値のキット間差は大きい。そのためTgAbのTg測定への影響度も各施設で異なっている。臨床診断を誤らせる危険性があるTgAbによる偽低値の可能性を認識することが改めて必要であると思われた。

#### 4. 結論

現段階においては、Tg測定法の原理上、Tg測定におけるTgAbの影響を避けることは難しく、そのためTgAb高値検体ではTg値が偽低値を示す可能性の認識が改めて必要であると思われた。さらに、Tg測定時にはTgAbの測定も合わせて行うことが望ましいと思われた。

本論文の要旨は日本臨床検査自動化学会第48回大会 (2016年 横浜) にて報告した。

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

- Spencer CA, Bergoglio LM, Kazarosyan M ,et.al . Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody method differences on the management of patients with differentiated thyroid carcinomas. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:5566-5575
- 2) 武田京子. サイログロブリン. ホルモンと臨床 2011;59:517-523
- Piechaczyk M, Baldet L, Pau B, et al. Novel immunoradiometric assay of thyroglobulin in serum with use of monoclonal antibodies selected for lack of cross-reactivity with autoantibodies. Clin Chem 1989:35:422-424
- 4) 笠木寛治, 高坂唯子, 御前隆ほか. IRMA による血中サイログロブリン濃度測定の基礎的ならびに臨床的検討-自己抗体陽性例における測定の試み-. 医学と薬学1993;30:83-93
- 5) 山口伸之, 青山昭, 名執由起ほか. サイログロブリン「コスミック」の基礎的ならびに臨床的検討. 医学と薬学 1996;36:175-185
- 6) 才木康彦, 池窪勝治, 増井裕利子ほか, 電気化学発 光免疫測定法 (ECLIA) によるサイログロブリン測 定の基礎的検討と臨床的評価, 医学と薬学 2002;48:879-888
- 7) 阿部正樹,鈴木晴美,杉本健一ほか,イムノアッセイに影響を及ぼす自己抗体の検討とその干渉様式の分類について、JJCLA 2016;41:94-100

## エアシューター® 搬送による物理的衝撃が プレセプシン値に及ぼす影響

Impact of Air-shooter® Transportation on Presepsin Values

坂本大典<sup>1)</sup> 小山田崇<sup>1)</sup> 宮城博幸<sup>1)</sup> 関口久美子<sup>1)</sup> 山﨑聡子<sup>2)</sup> 大西宏明<sup>2)</sup> 渡邊 卓<sup>2)</sup>

**要旨** プレセプシンは検体への物理的衝撃により偽高値となることが知られている。本研究では、検体の搬送にエアシューター®を用いた場合の影響と、それを低減させる方法について検討を行った。エアシューター®搬送による影響は、採血管内の血液の流動が大きな要因であることが示唆され、血清測定型の試薬を用いる場合は搬送前に十分に凝固させることが偽高値の低減につながった。また、急速凝固採血管を用いて搬送前の血液凝固時間を短縮することで、エアシューター®搬送を用いたプレセプシン測定における臨床的利便性の向上につながると考えられた。

**Key words** presepsin, serum, STACIA, air shooter transporter

#### 1. はじめに

プレセプシン (P-SEP: presepsin) はマクロファージや単球, 好中球といった貪食細胞の細胞膜上に存在する糖タンパク質である膜貫通型CD14の可溶性分画である<sup>1)</sup>。細菌の多くはCD14と結合し細胞内に取り込まれるが, 細胞内リソソームに存在するアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシンDによりこのCD14が切断され, 分子量約13kDaの蛋白がプレセプシンとして血中に放出される<sup>2)</sup>。そのため細菌感染では, 炎症性サイトカインにより細胞から産生されるプロカルシトニンや, タンパク合成亢進により産生される CRPよりも, 早期にプレセプシンの上昇が見られる<sup>3)</sup>。またプレセプシンは, 外科手術や熱傷などの影響を受けにくく, 細菌感染に対する特異性が高いことから, プロカルシトニンや

CRPよりも敗血症診断の指標として有用性が高いとされる。

しかしながらプレセプシン測定においては、いくつかの問題点が報告されている。その一つとして、検体の激しい撹拌によりプレセプシン値が偽高値となることが測定試薬の添付文書に記載されており、検体の取り扱いには十分に注意が必要である $^4$ 。これと関連して、エアシューター $^8$ による検体搬送でプレセプシン値が偽高値となる例も報告されている $^5$ 0。

今回我々は、採血後の検体搬送にエアシューター®を 用いた場合の物理的衝撃がプレセプシン値に及ぼす影響 を調べ、またそれを低減させる方法について検討したの で報告する。

Received Mar. 26, 2020; Accepted Jun. 2, 2020 Daisuke SAKAMOTO<sup>1)</sup>, Takashi OYAMADA<sup>1)</sup>, Hiroyuki MIYAGI<sup>1)</sup>, Kumiko SEKIGUCHI<sup>1)</sup>, Satoko YAMASAKI<sup>2)</sup>, Hiroaki OHNISHI<sup>2)</sup>, Takashi WATANABE<sup>2)</sup>

1) 杏林大学医学部付属病院 臨床検査部 〒181-0004 東京都三鷹市新川6-20-2

Department of Clinical Laboratory, Kyorin University Hospital

6-20-2, Shinkawa, Mitaka, Tokyo, 184-0004, Japan

2) 杏林大学医学部臨床検査医学教室

〒181-0004 東京都三鷹市新川6-20-2

Department of Laboratory Medicine, Kyorin University

6-20-2, Shinkawa, Mitaka, Tokyo, 184-0004, Japan

Corresponding author: 坂本大典

Tel: 0422-47-5511(2807)

E-mail: d-sakamoto@ks.kyorin-u.ac.jp

## 2. 材料および方法

#### 1) 材料

#### (1) 測定対象

杏林大学医学部付属病院職員のうちで、本研究への参加に同意を得られたのべ36名の血清を対象とした。なお本研究は杏林大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。(承認番号: H30-184)

#### (2) 測定試薬および機器

測定試薬はプレセプシンキット「ステイシアCLEIA Presepsin」(株式会社LSIメディエンス)を用い、機器は「全自動臨床検査システムSTACIA」(株式会社LSIメディエンス)で測定した。本試薬および機器を用いる測定系では、血清・血漿のいずれでも測定可能であるが、今回は検体凝固の影響についても検討を行うことから、全て血清を用いて測定した。

#### (3) 採血方法

ルアーアダプター付きセーフタッチ PSV セット 21G × 3/4"(ニプロ株式会社)の翼状針を用いて、標準採血法ガイドライン(GP4-A3)に則った方法 $^{60}$ で採血を行った。また採血管はインセパック II -D 凝固促進タイプ 6mL 採血管(以下,6mL 採血管)、インセパック II -D 凝固促進タイプ 2mL 採血管(以下,2mL 採血管)(徳山積水工業株式会社)、ニプロネオチューブ急速凝固管 3mL 採血管(以下,急速凝固管)(ニプロ株式会社)を使用した。

### 2) 方法

当院救命救急外来で採血し、専用気送管を用いたエアシューター®(株式会社日本シューター製)による搬送(以下、エアシューター搬送)を種々の条件で行い、プレセプシン測定を行った。対照として、採血直後に検体搬送箱を用いて用手により搬送した「手搬送」、15分静置後に用手により搬送した「静置検体」についても測定を行った。搬送後の検体は室温で2330g、7分遠心を行い、直後に血清を採取し測定した。なお、いずれの検討でも1人の対象者の血液を3本の同一種類の採血管に採取し、3種類の搬送法におけるプレセプシン値を比較した。

評価方法は、以下の各検討においてIBM SPSS Statistics25.0のソフトウエアを用いて、同一被検者の検体を用いた対応のある3群間に差があるかをFriedman 検定で評価し、有意差があれば個々の群間に差があるかどうかをBonferroni法で多重比較した。なおp<0.05を有意差ありと判定した。

(1) 静置検体,手搬送,エアシューター搬送の比較(n=6)

採血後直ちにエアシューター搬送(緩衝材1個)した 検体,直ちに用手搬送した検体(手搬送),および15分 後に用手搬送した検体(静置検体)のプレセプシン値に ついて比較した。本検討では6mL採血管を使用した。

#### (2) 緩衝材の影響 (n=8)

専用気送管には採血管自体の振動を抑えることが可能な緩衝材が装着できる。採血直後および15分静置後に、緩衝材1個もしくは2個を装着して搬送した検体のプレセプシン値を手搬送の検体を対照として比較した。本検討では2mL採血管を使用した。

#### (3) 搬送前血液凝固が及ぼす影響 (n=16)

採血直後に十分に血液が凝固していない状態でエアシューター搬送した検体と、15分静置し十分に凝固した後エアシューター搬送した検体のプレセプシン値を手搬送の検体を対照として比較した。本検討では2mL採血管を使用した。

#### (4) 急速凝固採血管の有用性 (n=6)

採血後直ちにエアシューター搬送した検体と採血後3 分静置後にエアシューター搬送した検体のプレセプシン 値を手搬送の検体を対照として比較した。本検討では急 速凝固管を使用した。

#### 3. 成績 (Table 1)

#### 1) 静置検体,手搬送,エアシューター搬送の比較(Fig. 1)

静置検体の中央値は68.5 pg/mLであったのに対し、 採血後直ちに手搬送した検体のプレセプシン値の中央値 は72.0 pg/mL, 直ちにエアシューター搬送した検体の 中央値は127.0 pg/mLであり、エアシューター搬送では 静置検体および手搬送に対し有意差を認めた。

#### 2) 緩衝材の影響 (Fig. 2-A, B)

採血直後および15分静置後に緩衝材1個で搬送した検体の中央値は108.0 pg/mL, 82.0 pg/mL, 緩衝材2個の場合の中央値は129.0 pg/mL, 94.5 pg/mLであり、搬送前条件にかかわらず緩衝材1個と2個では有意差は認めなかった。手搬送した検体の中央値は80.0 pg/mLであった。

#### 3) 搬送前血液凝固が及ぼす影響 (Fig. 3)

血液が凝固していない検体の中央値は113.0 pg/mLであったのに対し、十分に凝固した検体の中央値は97.0 pg/mLで有意差を認めた。手搬送した検体の中央値は81.5 pg/mLであり、十分凝固した検体との有意差は認めなかった。

#### 4) 急速凝固採血管の有用性 (Fig. 4)

採血後直ちにエアシューター搬送した検体の中央値は 82.5 pg/mLであったのに対し、3分静置後にエアシュー

Table 1	C	-£i	4	من بالمام ما مام		
rable r	Comparison	or various	transier	methods in	presepsin	measurement

		transfer	median(25%-75%)	total p value	ta	rget p value	
method 1 Comparsion of manual transfer and air shooter transfer	n=6	standing	68.5(64.5-89.5)	p<0.05	standing	vs manual	n.s.
		manual	72.0(64.5-90.5)			vs air shooter	p<0.05
		air shooter	127.0(88.8-227.8)		manual	vs air shooter	p<0.05
method 2 Influence of cushioning material (immediately)	n=8	manual	80.0(62.3-109.0)	p<0.05	manual	vs one cushion	p<0.05
		air shooter (one cushion)	108.0(91.5-179.3)			vs two cushions	p<0.05
		air shooter (two cushions)	129.0(96.0-157.8)		one cushion	vs two cushions	n.s.
method 2 Influence of cushioning material (15 min standing)		manual	80.0(62.3-109.0)		manual	vs one cushion	NT
		air shooter (one cushion)	82.0(73.8-120.3)	n.s.		vs two cushions	NT
		air shooter (two cushions)	94.5(73.3-100.3)		one cushion	vs two cushions	NT
method 3 Influence of blood clotting before transfer.	n=16	manual	81.5(79.3-82.3)		manual vs	non blood clotting	p<0.05
		non blood clotting	113.0(100.0-151.5)	p<0.05		vs blood clotting	n.s.
		blood clotting	97.0(86.8-101.8)		non blood clotting	vs blood clotting	p<0.05
method 4 Usefulness of Rapid clotting tube	n=6	manual	71.5(59.0-80.8)		manual	vs immediately	p<0.05
		air shooter (immediately)	82.5(70.3-108.5)	p<0.05		vs 3 min stabding	n.s.
		air shooter (3 min standing)	72.0(61.3-82.5)		immediately	vs 3 min stabding	p<0.05

n.s.: not significant NT: not tested

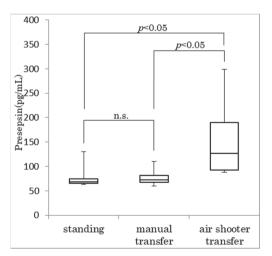


Fig. 1 Comparsion of manual transfer and air shooter transfer.

Air shooter transfer exhibited significant difference in presepsin values compared to manual transfer and still standing. n.s.: not significant

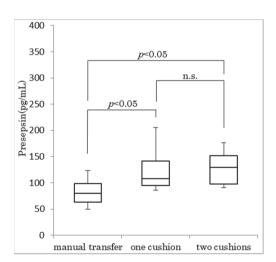


Fig. 2-A Influence of cushioning material (immediately after blood sampling). No significant difference was observed between one cushion and two cushions when immediately transferred by the air shooter. n.s.: not significant

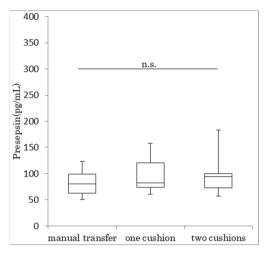


Fig. 2-B Influence of cushioning material (15 min standing after blood sampling). No significant difference was observed between one cushion and two cushions when transferred after 15 min standing by the air shooter. n.s.: not significant

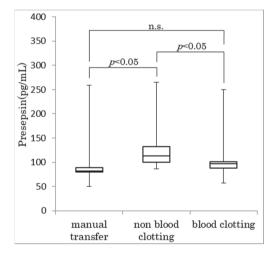


Fig. 3 Influence of blood clotting before transfer. Air shooter transfer of coagulated blood exhibited no significant difference in presepsin values compared to manual transfer. n.s.: not significant

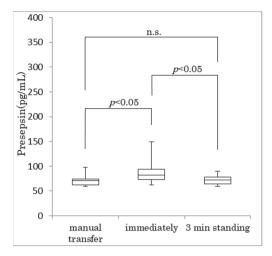


Fig. 4 Usefulness of rapid clotting tube. There was not significant difference between manual transfer and air shooter transfer after 3 min standing. n.s.: not significant

ター搬送した検体の中央値は72.0 pg/mLで有意差を認めた。手搬送した検体の中央値は71.5 pg/mLであり、3分静置したエアシューター搬送の値との有意差は認めなかった。

#### 4. 考察

日本版敗血症診療ガイドライン2016によれば、敗血症診断においてプレセプシン測定は「ICUなどの重症患者において敗血症が疑われる場合、感染症診断の補助検査」として2Bの推奨度となっているつ。敗血症診断から抗菌薬投与までの時間が長くなるほど死亡率は高くなるため、1時間以内の投与が推奨されており®、敗血症を早期に、かつ高精度に診断できるバイオマーカーのプレセプシンは今後より需要が高まると考えられている。

しかしながらプレセプシンは敗血症以外でも上昇する場合がある。代表例は腎機能障害であり、プレセプシンの多くは腎臓より排泄されるため、慢性透析患者やeGFRが30 mL/min以下の高度腎障害の患者では敗血症でないにも関わらず、敗血症カットオフ値の500 pg/mLを超える値を認めることが多い<sup>9)</sup>。一方、疾患とは別に検体の取り扱いによる影響も知られており、採血後の採血管の過度な転倒混和やボルテックス等による混和、検体搬送時の物理的衝撃がプレセプシン値に影響を与え、偽高値になることが知られている。一般的に検体搬送方法は、人による手搬送が主であるが、近年エアシューター搬送を導入している施設も数多く認める。プレ

セプシンの測定にあたり、検体搬送にエアシューター®を使用する際は、検体に対しての物理的衝撃を可能な限り低減する必要があるが、その低減方法に関する報告は我々の知る限り認められない。

今回我々は、エアシューター搬送を用いた場合の物理的衝撃がプレセプシン値に及ぼす影響について確認し、物理的衝撃による偽高値を低減させる方法について検討した。最初に、手搬送とエアシューター搬送の比較において、採血後直ちに検体を搬送する場合、エアシューター搬送を用いると人による手搬送よりも約2倍高値となったことから、原則的には手搬送することが望ましいと思われた。エアシューター搬送による偽高値は物理的衝撃が原因であると推察されたが、この物理的衝撃の主要因として、採血管自体の振動と採血管内での血液の流動性の二つが想定されたため、これらの要因が及ぼす影響についてそれぞれ検討を行った。

まず採血管自体の振動を低減させるため気送管に装着 する緩衝材の数について検討したところ、採血直後およ び15分静置後のいずれの場合でも緩衝材1個と2個では プレセプシン値に有意差は見られなかった。次に、採血 管内の血液流動性が及ぼす影響について、 搬送前に凝固 していない検体と十分凝固した検体を比較した。その結 果,十分凝固した検体は手搬送とほぼ変わらない値であ ったのに対し、凝固していない検体は有意に高値であっ た。このことからエアシューター搬送におけるプレセプ シン値への影響は、搬送時の採血管の振動による衝撃そ のものより、採血管内での血液の流動が主な要因である と考えられた。最後に、血液凝固後の搬送が有用であっ たことから採血後の凝固時間短縮を目的とし、約3分で 凝固する急速凝固採血管を用いて搬送前血液凝固の有無 の影響を検討したところ、3分静置後にエアシューター 搬送した検体は手搬送と変わらない値であった。そのた め、急速凝固採血管を専用採血管とすることで、臨床現 場でも大きな測定の遅延を生じることなくエアシュータ ー搬送を用いることが可能になると考えられた。ただし, このような現象については臨床側へ十分に周知し協力を 得る必要がある。そのためには、プレセプシン測定依頼 があった場合には、専用採血管とともに採血と搬送に関 する注意書きを同封したものを配布するといった対応が 必要であると考える。また、検体到着後の取り扱いにも 注意を要することから検査技師への周知教育も必要であ り、臨床側と検査技師両方の理解と協力により信頼性の ある値を提供することで, 敗血症患者への迅速な治療に つながると思われる。

現在のところ、物理的衝撃によるプレセプシン偽高値

の機序は正確には解明されていない。プレセプシンは膜 貫通型のCD14が切断されたものであるが、血漿または 血清中には生理的に49kDaと55kDaの可溶型CD14が存 在している100。通常、これらはプレセプシンの測定系で は認識されないが、物理的衝撃によりこれらの蛋白が分 解されることでプレセプシンとの交差性を示している可 能性がある。この解明には、今後さらなる検討が必要で あると考えられる。原因はともあれ、採血から測定に至 る過程で物理的衝撃を低減し、測定値に影響を与えない ことが重要であり、今回の検討結果から、血清を使用す る測定法においては、凝固促進剤入りの採血管を用いる ことで、エアシューター搬送による偽高値を低減できる と考えた。しかしながら、プレセプシンの検査材料とし ては現在のところ全血や血漿が主であり、血清が使用可 能である試薬キットはLSIメディエンス社の「ステイシ アCLEIA Presepsin」が唯一であることから、今後は全 血や血漿の測定においてもエアシューター搬送による偽 高値を低減させる方法の検討が必要であると思われた。

### 5. 結語

エアシューター搬送を用いるとプレセプシン値は偽高値となるが、血清測定型試薬を用いる場合は、血液凝固後に搬送することが偽高値を低減させる方法として有効であった。また、急速凝固採血管を用いて搬送前の血液凝固時間を短縮することで、エアシューター搬送を用いたプレセプシン測定における臨床的利便性の向上につながると考えられた。

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) 白川嘉門. 敗血症診断の新規バイオマーカーープレセ プシンの発見と産生機序 - . アニムス 2019;99:27-32.
- Shirakawa K, Naitou K, Hirose J, et al. The new sepsis marker, sCD14-ST, induction mechanism in the rabbit sepsis model. Criticl Care 2010;14 (Suppl 2):S7(P-19).
- Koh H, Aimoto M, Katayama T, et al. Diagnostic value of levels of presepsin (soluble CD14-subtype) in febrile neutropenia in patients with hematological disorders. J Infect Chemother 2016;22:466-471.
- 4) プレセプシンキット ステイシアCLEIA Presepsin 添付文書
- 5) 宮澤孝仁, 大橋茉耶, 柏倉恵美子ほか. Eテスト 「TOSOH」(Presepsin) の基礎的検討および気送管

- による影響. 日本臨床検査自動化学会会誌 2018;43(4):415-415.
- 6) 日本臨床検査標準協議会 標準採血法検討委員会: 標準採血法ガイドライン (GP4-A3)
- 7) 日本集中治療医学会・日本救急医学会 日本版敗血 症診療ガイドライン2016作成特別委員会(編):日 本版敗血症ガイドライン2016. 日本集中治療医学会 雑誌. 2017;24(Suppl. 2);S1-S232./日本救急医学会雑 誌. 2017;28;S1-S232.
- 8) Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of

- hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med 2006;34:1589–1596.
- 9) 今川朱美, 魚住恵理子, 潮田友紀ほか. プレセプシン値に及ぼす腎機能障害の影響. 医学検査 2015;64:169-172.
- 10) Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, et al. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. J Infect Dis 1995;171:639-44.

# 一般社団法人 日本医療検査科学会 2019 年度 第8回理事会

開催日時: 2020年2月9日(日)13時00分~16時30分

開催場所: 日本医療検査科学会 事務局

出 席 者: 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、

〆谷直人理事、高橋聡理事、通山薫理事、萩原三千男理事、日高洋理事、

村上正巳理事、白井秀明監事、内海健監事

藤巻慎一オブザーバー

欠席者: 和田隆志理事

### 議題

1. 理事長挨拶

萱場広之理事長より、多忙の中を第8回理事会にご参集頂いたことへの謝辞があった。 今回より理事会に参加した藤巻慎一オブザーバーより挨拶があった。

### 2. 報告事項

2-1. 総務職務報告 (横田副理事長)

12月16日に日本臨床検査教育協議会で JACLaS Award の広報活動をした。第52回 大会の準備を進めていることを報告した。

- 2-2. 地域担当報告(各理事)
- 1) 北海道:特になし
- 2) 東北地区:特になし
- 3) 関東地区: 次回の理事会にて候補者の推薦を検討している。
- 4) 東海地区:特になし
- 5) 北陸地区:特になし
- 6) 近畿地区:特になし
- 7) 中国・四国地区:特になし
- 8) 九州地区:特になし
- 2-3. 国際交流委員会より特別賛助会員について (康理事) (資料 1) 康理事より資料に基づいて特別賛助会員の募集要項の説明があり確認をした。
- 2-4. POCC 移行処置のレポート判定結果について(康理事) (資料 2) POCC 移行制度の該当者全員のレポートの提出を確認し、全員が合格となったと報告した。
- 2-5. 定款・細則の改定について(石川)(資料 3-4)

定款・細則の改定事項の確認と修正を行った。

細則第28条の「医学研究の利益相反」は「医学研究の倫理・利益相反」にする。 細則第37条の(機関誌の配布)ならびに細則第44条の「機関誌にて公告し」の文 言について、学会誌オンライン化に伴う修正案を検討後、書面審議をすることとなった。

2-6. 法人設立届出の遡及について(石川)(資料5)

鹿谷税理士より都税事務所には法人登記の届けを行っていないとの連絡があり、法 人設立届の提出に伴う手続きを行うと報告した。

2-7. その他

特になし

### 3. 審議事項

- 3-1. 第52回大会での共催セミナー申込状況について(横田副理事長)(資料6) 例年に比べセミナー申込数が少ない為、理事・役員が企業の担当者への声掛けを行うこととなった。
- 3-2. 第52回大会での共催シンポジウムについて(横田副理事長)(資料) 私立医科大学臨床検査技師会より共催シンポジウムの依頼を受け、審議の結果、申 請通り承認された。共催シンポジウムのみ参加希望の来場者にも参加登録が必要で あること、共催シンポジウム担当者は本学会または共催学会のどちらかに所属して いる会員から選定することが決まった。
- 3-3. 第52回大会プログラム・日程表について(横田副理事長)(資料7-8) 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。
- 3-4. 第52回大会託児所について(石川)(資料9) 横浜での大会開催時に使用していた託児施設がサービス終了となった旨を報告した。現状としては代替案の検討が難しい為、第52回大会での託児所の設置を見送り、それ以降の大会については状況を確認しながら検討を進めていくことで決まった。
- 3-5.第67回日本臨床検査医学会より共催シンポのお願い(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、申請通り承認された。第67回日本臨床 検査医学会共催シンポジウムの担当は〆谷理事で決まった。
- 3-6. 大会参加事前登録について(萩原理事)(資料11) 資料に基づき説明があり、審議の結果、以下の内容が決まったが次年度以降のシステム維持費が高額なため、見積り内容と額面について業者と至急協議することとした。
  - ・4月1日(演題登録開始日)より開始・大会2週間前に締め切りとする
  - ・支払い方法は、クレジットカード決済のみ
  - ・事前登録の際、ランチョンセミナーも併せた登録が可能となる
  - ・ランチョンセミナー整理券に氏名の記載はしない
  - ・大会当日に参加証を忘れた場合、事前登録完了メールに添付した2次元コードを 利用して発券が行えるようにする。
- 3-7. 技術セミナーの事前登録実施について (石川) 必要に応じて各技術委員会が事前登録実施の申請をするが、実習を行うセミナー・ 認定資格試験などがある場合は事前登録を必須とすることが決まった。
- 3-8. 生理検査委員会・施設アンケートについて(石川)(資料 12-14) 資料に基づいて説明があり、審議の結果、一部の誤記を訂正した上で申請通り承認 された。

- 3-9. 認定 POCC 制度運営規程について(康理事)(資料 15-16) 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。
- 3-10. 認定 POCC 制度 WG 議事録確認(康理事)(資料 17) 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。
- 3-11. J-STAGE (国立研究開発法人科学技術振興機構)登録について(高橋理事) (資料 18)

資料に基づいて説明があり、審議の結果、論文検索して医中誌でみられるのであれば当面は現状の HP での閲覧方法とし、様子を見ながら再度検討を進めていくことに決まった。

- 3-12. Web サイトの保守メンテナンスに関して(石川)(資料 19) 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。
- 3-13. その他

特別賛助会員制度に伴い細則の改定案が提案され、申請通り承認された。臨時会費については現状維持として運用でカバーすることとなった。

### 4. その他

4-1. 次回開催日程

プログラム委員会 2020 年 4 月 4 日 (土) 11:45-12:00 沖縄県自治会館 第 1 回理事会 2020 年 4 月 4 日 (土) 12:30-13:50 沖縄県自治会館 学術委員長会議 2020 年 4 月 4 日 (土) 14:00-14:50 沖縄県自治会館 第 2 回理事会 2020 年 5 月 23 日 (土) 13:00-

第3回理事会 臨床化学会社員総会の日程確認後に決定

第4回理事会 2020年8月22日(土) 13:00-第5回理事会 2020年9月24日(木) 11:30-第6回理事会 2021年12月5日(土) 13:00-第7回理事会 2021年2月6日(土) 13:00-

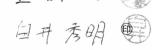
以上

2020年 8月 3/日

一般社団法人 日本医療検査科学会

議長 萱場広之 ®

議事録署名人



議事録署名人 八仏 (車)

# 一般社団法人 日本医療検査科学会 2020 年度 第1回理事会(紙上)

期 間:2020年4月3日(金)~2020年4月8日(水)

開催場所:メール審議

回 答 者: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、

〆谷直人理事、高橋聡理事、通山薫理事、萩原三千男理事、日高洋理事、

村上正巳理事、和田隆志理事

白井秀明監事、内海健監事、藤巻慎一オブザーバー

#### 議題

### 1. 理事長挨拶

理事会の皆様におかれましては、ご多忙のことと拝察いたします。今般の新型コロナウイルス流行状況に配慮いたしまして、皆様にお会いできなのは誠に残念ではございますが、メール審議をお願いいたします。議題は比較的必要性の高い議題に絞りましたが、複数回のメールのやり取りが必要な内容もあり、皆様にはご面倒をおかけいたしますが、何卒、ご容赦頂きたく、お願い申し上げます。また、新型コロナウイルス流行につきましては、今後の見通しも立たず、今後理事会はもとより各種委員会や打ち合わせなどに ZOOM による遠隔会議の導入を考えておりますので、この点につきましてもご審議頂きますよう、お願い申し上げます。何よりも皆様のご健康をお祈り申し上げております。

### 2. 報告事項

2-1. 日本医療検査科学会第52回大会について(横田理事)

大会第3報に掲載の通り、進めている。オリンピック・パラリンピックの延期に 伴い、関連のシンポジウムを中止としたとの報告があった。

2-2.第35回 (2021年度) 春季セミナー開催日程について (石川) 2021年4月17日(土) 18日(日) 沖縄県市町村自治会館を予約したとの報

**2021** 年 4 月 17 日(土),18 日(日)沖縄県市町村自治会館を予約したとの報告があった。

### 3. 審議事項

3-1. タイトル:第27回論文賞選出について(高橋理事)(資料1) 資料に基づき説明があり、下記の評価上位2名を論文賞受賞者とすることを承認 した。

間瀬浩安(東海大学医学部付属病院 臨床検査技術科)

中島一樹(埼玉県立大学大学院 保健医療福祉学研究科 )

- 3-2. JJCLA より公益社団法人の会員としての登録依頼(石川) (資料2) 資料に基づき説明があり、審議の結果承認された。
- 3-3. POC 委員会委員異動申請(通山理事)(資料3) 資料に基づいて委員会委員移動の説明があり、審議の結果申請を承認した。

3-4. 評議員申請(澤部理事)(資料 4-5)

資料に基づいて2名の評議員推薦者について説明があり、審議の結果下記の2名の評議員を理事会として認め、6月の社員総会に提案することとした。

海渡健(東京慈恵会医科大学附属病院中央検査部)

菅野光俊(信州大学医学部附属病院臨床検査部)

3-5. 認定 POCC 制度案内文の HP 掲載と学会誌掲載について(康理事) (資料

6)

資料に基づいて説明があり、審議の結果承認された。

3-6. ウェブ会議の運用について(萱場理事長)(資料7)

資料に基づき説明があった。システムの使用方法・セキュリティ、費用などの面から再度検討することとなった。

3-7. その他

6月の社員総会の日程と開催方法について議論がなされ、審議の結果、委任状+ 学会事務局に数人+ウェブ会議、時期は例年通り第3土曜日(6月20日)開催 とする。

### 4. その他

4-1. 次回開催日程

第 2 回理事会 2020 年 5 月 23 日 (土) 13:00~ ZOOM 利用予定

以上

2020年 6 月 / 日

一般社団法人日本医療検査科学会

議事録署名人 日井 秀明 即 議事録署名人 日神 秀明 即

## 一般社団法人 日本医療検査科学会 2020 年度 第 2 回理事会 議事録

開催日時: 2020年5月23日(土)13時00分~15時00分

開催場所: 日本医療検査科学会事務局より web 会議

主 席 者: 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、

〆谷直人理事、高橋聡理事、通山薫理事、萩原三千男理事、

日高洋理事、村上正巳理事、和田降志理事

白井秀明監事、内海健監事、藤巻慎一オブザーバー

欠席者: なし

### 議題

1. 理事長挨拶

萱場理事長より、ご参集頂いたことへの謝辞があった。

### 2. 報告事項

2-1. 総務職務報告(横田副理事長)

5月21日に JACLaS との打ち合わせを行った。現時点では大会・展示会を実施する方向で準備を進めている旨の報告があった。5月23日現在では演題数は100件のため演題登録の声掛け進めることとなった。

2-2. 地域担当報告(各理事)

特になし

2-3. 2020 年度春季セミナー会計報告(石川)(資料1)

来年度の助成金は、今年度の支出額約70万を助成すると会計報告があり 承認された。

2-4. 国際交流委員会より (康理事)

萩原理事・工藤先生とミャンマーに行き、ASEAN の技師会会長・企業の方々とミーティングを行った。NCGM(国立国際医療研究センター)より事業への協力要請があり国際医療協力局、国際交流委員会、微生物検査・感染症委員会と「国際展開推進事業 ミャンマー事業に関する打ち合わせ」についてオンライン会議を行った旨の報告があった。

2-5. 第 52 回大会一般演題、JACLaS Award 登録数(事務局)

一般演題:99件

JACLaS Award I:12件 JACLaS Award II:10件

21 日の JACLaS との会議の際、JACLaS Award I の受賞者は5名程度となるが、受賞者以外の方にも一般演題として発表できる事を提案し、発表の際にかかる交通費は JACLaS が負担する方向で声掛けをする事となった。合同交流会は三密を避ける為、中止にする事となったと報告があった。

2-6. 第52回大会について(横田副理事長)(資料2)

横田副理事長の所属が慶應義塾大学病院へ変更となった。シンポジウム 4 は 演者が確定していない為抄録登録が出来ていない。シンポジウム 6 は海外か らの演者を予定していたため渡航できない可能性があるため、オンラインや 録画などの発表方法を検討しながら依頼を進めていくこととなった。私立医 科大学臨床検査技師会共催シンポジウムは全く進んでいない為、催促を行っ ている。技術セミナーでは遺伝子・プロテオミクス技術セミナー、POC セミ ナーではコロナを取り上げた内容のセミナーを行う予定している。微生物検 査・感染症技術セミナーでは JACLaS 共催シンポジウムとして、2 時間枠を 設けて「コロナ PCR 検査の課題と現状」を予定し準備を進めている。サテラ イトセミナーの意見交換会は行わない事で依頼することとなったと報告が あった。セミナーや講演に関して密を避ける会場作り、モーニングセミナ ー・ランチョンセミナーなど会場内での飲食方法などが課題となった。「ス クール形式の会場なので、席の間隔をあける」「使用していない会場を食事 場として開放する」「モーニングセミナーは3部屋を開放し中継形式で行う」 などの意見があがり、状況を見ながら検討を進めていくこととなった。

2-7. その他

事務局より、IACLaS 共催 IVD-MD マーケティングセミナーは AACC の先生を 呼ぶ予定であったが現状難しい為、日本人の方が英語で講演する予定との報 告があった。

#### 3. 審議事項

3-1.学術委員会委員異動申請(通山理事)(資料3)

資料に基づき説明があり、審議の結果申請通り承認された。

第36回(2022年)例会長について(萱場理事長)

資料に基づき説明があり、審議の結果以下が例会長として承認された。

- 末岡 榮三朗 (佐賀大学)
- 3-3. 名誉会員・功労会員選出(事務局)(資料4)

資料に基づき説明があり、審議の結果以下が名誉会員・功労会員として推薦 されることが決まった。

名誉会員

松尾 収二 (公益財団法人天理よろづ相談所病院)

・功労会員

柴田 綾子 (慶応義塾大学病院)

舩渡 忠男 (東北福祉大学)

松原 朱實 (熊本保健科学大学)

3-4.定時社員総会議事案関連(横田副理事長)

送付資料と式次第の確認をし、以下が修正された。

・監査報告書:公認会計士と監事のサインを入れる

・第3号議案:新規功労会員の選出は上記の3名を追記する

- ・第2号報告:第35回春季セミナー例会長を追記する
- ・返送出欠ハガキ:審議事項に記載してある氏名を番号に変更する

### 3-5. その他

- ・萩原理事より、「国際展開推進事業 ミャンマー事業に関する打ち合わ せ」について説明があった。NCGM の医療技術等国際展開推進事業の一つと して、「ミャンマー国における薬剤耐性 (AMR) サーベライスと抗菌薬適正使 用 (AMS) の強化事業」があり、この状況下の中で「On-line による教育支 援」が施行されており当学会に研修用の教材作成支援が求められている。理 事会にて承認を得てからの事柄ではあるが、委員会活動の中核として進めて いきたいと考えている。また分野が微生物領域の為、柳原先生(微生物検査・ 感染症委員会委員長) および委員会の皆様に力添えをいただく了承も得た。 教材作成にかかる経費は厚労省予算より 100 万円程度の費用支出は可能と の事。もし理事会で承認された場合の会計処理は、都度請求になるのか、NCGM に委託となるのか二種類の方法が考えられる。今後上記の様な活動を進めた いとの報告があり承認された。
- ・和田理事より、第2回医療情報技術セミナー開催にあたり、サポートス タッフを募集したいとの提案があり承認された。
- ・萱場理事長より冊子制作費用の確認があった。総説執筆者に別刷りで 50 部送っている件について、髙橋編集委員長にて検討することとなった。
- ・次回の理事会:6月20日(土)13:00-14:00 学会事務局よりWEB会議
- ・定時社員総会:6月20日(土)14:30-15:00 学会事務局よりWEB会議

以上

2020年8月3/日

一般社団法人 日本医療検査科学会





議事録署名人 白井 秀明 (出席監事) 日井 秀明 (出席監事) 日井 秀明 (出席監事)

### 一般社団法人日本医療検査科学会 2020年(令和2年)度 第3回理事会

開催日時: 2020年6月20日(土)13時00分~14時15分

開催場所: 日本医療検査科学会事務局より web 会議

出 席 者: 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、

〆谷直人理事、高橋聡理事、通山薫理事、萩原三千男理事、

日高洋理事、村上正巳理事

白井秀明監事、内海健監事、藤巻慎一オブザーバー

欠席者: 和田隆志理事

### 議題

1. 理事長挨拶 
萱場理事長より、ご参集頂いたことへの謝辞があった。

- 2. 報告事項
- 2-1. 総務職務報告(横田副理事長) 第52大会の準備を進めている旨、報告があった。
- 2-2. 定時社員総会について (横田副理事長)
- (1) 出欠はがき返信数確認 (資料 1) 評議員数 166 名中、出席 38 名、欠席 89 名、無効 1 名、未返信 1 名、回答率 77%で、出席定数を満たしていると報告があった。
- (2) 議事録署名人の選出について 宮地勇人先生、矢冨裕先生、荒木秀夫先生、大川龍之介先生を議事録署名 人の選出候補としていると報告があった。
- (3) 式次第および資料の最終確認(資料2) 資料に基づき説明があり、確認をした。

### その他

特になし

- 2-3. 地域担当理事からの報告 特になし
- 2-4. 第52回大会の進捗状況について(横田副理事長)(資料3)
- (1) 一般演題数報告

一般演題数は184題が集まった。それに伴い大会スケジュールの作成、優秀演題賞・座長の選出を行っている。現段階では演題の座長は8割ほど決定したと報告があった。

(2) 謝礼について

資料に基づき説明があり、例年通りであることを確認した。

(3) その他

海外演者の来日が難しく国際シンポジウムの講演は中止とするが、提出された抄録は残す事となった。

- 2-5. 国際委員会より事業・決算報告(康理事長)(資料 4-5) 資料に基づき説明があり、確認をした。新型コロナウイルス感染症の影響 もあり、活動計画が予定通り行えていない。今後は国立国際医療研究セン ター(NCGM)の活動協力(主に研修教育用の教材)を進めていく。7月下 旬特別賛助会員報告会を行うと報告があった。
- 2-6. 大会参加事前登録システムについて(萩原理事)(資料 6) 資料に基づき説明があり、機能・運用について確認をした。6月22日から 事前登録を開始すると報告があった。
- 2-7. その他 特になし
- 3. 審議事項
- 3-1. 評議員推薦(横田副理事長)(資料 7-8) 資料に基づき説明があり、審議の結果、申請通り承認された。
- 3-2. 学術委員会より委員異動申請(通山理事)(資料9) 資料に基づき説明があり、審議の結果申請通り承認された。
- 3-3. POC 委員会第76回 POC 共催セミナー申請(通山理事)(資料10) 資料に基づき説明があり、審議の結果申請通り承認された。POC セミナーは 例年講演と実技を行っているが、企業からの申し出があり本年は実技が中 止となった。その為実技の為に用意した会場を利用し、会場を広げること で募集人数を増やすことも検討していると報告があった。
- 3-4. 転載許諾に関して提案(髙橋理事)(資料 11-12) 資料に基づき説明があり、審議の結果申請通り承認された。英訳による二 次利用については、申請 1 件につき別途 30 万円とする記載を案内文に追記 することとなった。
- 3-5. 大会における感染対策について (萩原理事) (資料 13-14) 資料に基づき説明があった。JACLaS の残松理事長より感染予防対策のガイ

ドライン作成の要請を受け、本学会からは菅場理事長、横田副理事長、高 橋理事、萩原理事が担当することとなった。

### 3-6. その他

澤部理事より、科学技術セミナーは例年満員となっていることからソー シャルディスタンスについて相談があり、空いている会場を利用して中 継にてセミナー行う事を検討するとの報告があった。

### 4. その他

- ・横田副理事長より、コロナウイルス感染による大会中止などの判断基準 を決めたいとの意見があった。コロナウイルスが感染拡大した場合、各 都道府県の自治体の判断や指導を遵守すること、あるいは情報を共有し ながら早めに判断を進めていく事となった。
- ・横田副理事長より、会員からランチョンセミナー開催の方法について、質 問があったと報告があった。お弁当の受け渡し・回収方法やソーシャルデ ィスタンスの方法について、感染対策ガイドライン作成会議の際に審議す る事となった。
- ・事務局より、発刊予定の抄録集に感染対策に関する案内文掲載の申請があ り、案内文を作成し掲載することが承認された。
- ・定時社員総会:6月20日(土)14:30-15:00 学会事務局よりWEB会議
- ・次回の理事会:8月22日(土)13:00- 学会事務局よりWEB会議

以上

2020年9月2日

一般社団法人日本医療検査科学会

長管場九之



議事録署名人 日子 秀明 即 (出席監事)



議事録署名人、丹海、健・⑩ (出席監事)

## 一般社団法人日本医療検査科学会 2020年(令和2年)度 臨時理事会

開催日時: 2020年8月1日(土)16時00分~17時30分

開催場所: 日本医療検査科学会事務局より web 会議

出 席 者: 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、

必谷直人理事、高橋聡理事、通山薫理事、萩原三千男理事、日高洋理事、藤巻慎一理事、村上正巳理事、和田隆志理事、

白井秀明監事、内海健監事、

欠席者: なし

### 議題

1. 理事長挨拶

萱場理事長より、ご参集頂いたことへの謝辞があった。

### 2. 審議事項

第52回大会開催について

横田副理事長より、7月31日に行われた JACLaS との web 会議の報告があった。日本臨床検査薬協会からコロナウイルス感染拡大に伴い機器展示自粛の申し入れを受けたと JACLaS から報告があった。また、機器展示キャンセルが14社、座長予定者が2名辞退、一般演題も複数の辞退の申し入れ、ランチョンセミナー座長および演者未定が4社あり、関東圏への出張が難しいとの意見も出ている。その為、横田副理事長より第52回大会開催について臨時理事会開催の申し入りがあった。

康理事より、一般演題はオンライン上での「ポスター発表」または「パワーポイントにて発表」を掲載し、発表した業績が残るようにしたいとの意見があり、審議の結果、第52回大会はオンデマンド開催とすることが承認された

通山理事より、7月に行われた検査血液学会では、一般演題は誌上発表、特別講演・教育講演はパワーポイントでの収録、シンポジウムは Zoom で行ったとの参考例が挙がった。学術集会としての機能を維持するならばオンライン開催でも対応可能との意見があり、審議の結果特別講演・教育講演・シンポジウム・ランチョンセミナーもオンデマンド配信をする方針で決定した。

村上理事・〆谷理事より各技術セミナーの開催に関する質問があり、各技術 セミナーでは委員会の希望に応じてオンデマンド配信とする。実習がある 委員会は講演部分のみを配信する事で承認された。

和田理事・藤巻理事よりオンデマンド開催をする場合の準備時間に関する指 摘があり、会期期間の延長や開催時期の見直しも検討してはどうかとの意 見があった。

また、オンデマンド視聴にあたっては大会事前参加登録を必須とし、参加 費は8000円で承認された。

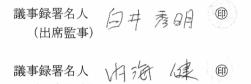
事務局より、現地開催がなくなることによりパシフィコ横浜へのキャンセ ル料が約500万円、オンデマンド開催にすることで約800万円の費用 が追加予定となることが報告された。

以上

2020年 9月2日

一般社団法人日本医療検査科学会

萱場在之風 議



(出席監事)

(令和元年10月5日改定)

- 1. 医療検査と自動化(日本医療検査科学会誌)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)日本医療検査科学会 「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科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研究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体を本文の基本書式 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)
- 3) 所属機関名とその住所(和文および英文)
- 2) 著者名(和文および英文) (英文の例: Koki MOTEGI)
- 4) 原著,技術,症例,短報いずれを希望かを明記
- 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
    - 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 所に肩付きで、右片括弧にいれて記載する。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。

- 5. 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。
- 6. 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。
- 7. 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。
- 8. HbAlc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、HbAlc値の初出に NGSP値であることを明記する。
- 9. 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。
- 10. 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。
- 11. 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:頁一頁(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 プロープ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)	$10^{-6} = \mu$ (micro)	10 = da (daca)	109 = G (giga)
$10^{-15} = f \text{ (femto)}$	$10^{-3} = m$ (milli)	$10^2 = h$ (hecto)	$10^{12} = T \text{ (tera)}$
10 <sup>-12</sup> = p (pico)	$10^{-2} = c$ (centi)	$10^3 = k \text{ (kilo)}$	$10^{15} = P \text{ (peta)}$
$10^{-9} = n \text{ (nano)}$	$10^{-1} = d \text{ (deci)}$	$10^6 = M \text{ (mega)}$	$10^{18} = E \text{ (exa)}$

- b)接頭語を二重に用いない。 $\mu\mu g$  ( $\gamma\gamma$ )  $\rightarrow pg$
- c) 長さに関する単位は $m\mu$   $\rightarrow$ nm,Å  $\rightarrow$  0.1nm(あるいは100pm), $\mu$   $\rightarrow$   $\mu$ mなどとする。
- d) 容量の単位は「L」を用い、dm³, cc, cm³などを用いない。dm³→L, cc→mL, mm³→μL
- 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。  $7\,g/dL$ → $70\,g/L$ 、 $100\,mg/dL$ → $1\,g/L$ ( $1,000\,mg/L$ )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)  $mol/min/L \rightarrow mol/$   $(minL^{-1})$ ,  $\sharp t l mol min^{-1}L^{-1} \xi \dagger \delta$ .

#### 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会誌 18(1):3-41, 2003」を参照する。なお, CLSI(旧NCCLS)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.	<b>と稿者は(一社)日本医療検査科学会会員であるか ⋯⋯⋯⋯</b> □				
2.	同じ内容の論文を他誌に発表していないか				
3.	ff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、 《認を得ている旨、明記しているか ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・				
5.	全文の体裁について     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				
6.	≧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 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)

			(共著者を含む
\ <del></del>	<b>夏名:</b>		
日义厄	84.		
筆頭著	音者・Corresponding author(連絡責任者)について、投稿印	寺から遡って過去2年 「	間以内での論文内容に関係する企業・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
	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	
(:	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) \_\_\_\_\_

(何れかに○)

### 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)が企業に嘱する場合)

著者名:		
		(共著者を含む)
論文題名	:	
	○株式会社) の社員であり、本研究に関わる費 参考に記載)	用等は所属企業の経費等にて支払われています。
(由生口	)  年 月 日	(本 COI 申告書は論文掲載後 2 年間保管されます)
	年 月 日 筆頭著者・Corresponding author(連絡責任者) (何れかに○)	(署名) ⑩

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

## 日本臨床検査自動化学会会誌(JJCLA)第45巻総目次

(2020年4月)
関連疾患  菅野光俊,上原 剛…(113)   <b>ム講演要旨</b>
名
度 <b>管理のあり方</b> 度管理 と自動顕微鏡装置の活用を中心に 石川 義徳…(132) 管理阿部 仁…(137)
<ul> <li>管理</li> <li>野を中心に一</li> <li>窓定分野を中心に一</li> <li>等検査」・・・・・ 田邊 晃子・・・ (144)</li> <li>検査の進歩</li> <li>技師の役割</li> <li>応した4社のALP活性測定試薬の明・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・</li></ul>
#

第45巻 第3号(2020年6月)	第45巻 第 4 号(2020年 8 月)
学会ニュース	第52回大会抄録集
総説 微生物検査における自動化 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	第45巻 第5号(2020年11月) 学会ニュース
原著  翼状採血針における製品別の溶血率調査 市村 直也…(208)  液状プロトロンビン時間測定試薬「コアグピア® PT- Liquid」の性能評価佐藤 有紗…(213)  VITEK MSでNeisseria meningitidisと 誤 同 定 さ れ た Neisseria polysacchareaとNeisseria meningitidisとの鑑 別法 およびVITEK MSの同定精度の検証 服部佳奈子…(222)	総説 白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の試み ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
接術 全自動エンザイムイムノアッセイ装置AIA-900を用いた Eテスト「TOSOH」II(Presepsin) によるプレセプシ ン測定の基礎的検討・・・・・・	脳梗塞症例を対象としたBNPおよびD-dimerの臨床的有用性に関する検討
<b>症例</b> 改良されたACMIA法による血中タクロリムス濃度測定    試薬の性能の評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	技術   CGMにおける5分毎測定時と15分毎測定時の血糖変動指標の値の比較検討   武石 宗――(569)   キャピラリー電気泳動法技術を応用した小型で簡便かつ精確なHbA1c測定法 The Lab 001   細谷 幸雄…(573)   ディープラーニングを用いた尿中赤血球の形態分類   一山本 雄彬…(581)   血中IgG4測定試薬「N-アッセイLA IgG4ニットーボー」 の基本性能評価   田中真輝人…(589)   抗サイログロブリン抗体がサイログロブリン測定に与える影響について   俵木 美幸…(595)   エアシューター <sup>®</sup> 搬送による物理的衝撃がプレセプシン値に及ほす影響   坂本 大典…(599)

## キーワード索引 (数字はVol. 45の通算ページを示す)

Accuraseed	44	data augmentation	581
ACCU-CHECK_Guide	244	Deep learning	581
ACMIA 2	260	DGGMR method	39
AIA 2	230	DIC	78
air shooter trasporter 5	599	Dimension	260
alanine aminotransferase	555	Dimension EXL200	53
albumin 5	562	diversities	17
alkaline phosphatase 1	55	ECLIA	260
ALP reagent 1	55	enzymatic method	544
anti-phospholipid antibody 1	68	evaluation of reagent	67
anti-Tg antibody5	595	Fabry disease	264
apoenzyme	32	FAD-GDH	244
application to routine	44	false negative value	589
APTT 1	68	FEIA	230
ARC and Aldosterone ruick measurement	44	FGM	569
ARCHITECT i2000SR 2	240	Fibrinogen	), 22
aspartic aminotransferase	32	fine-turning	581
automatic analyzer LABOSPECT 008 a	67	fucosylated C4-binding proteina-chain	540
autotaxin 5	551	full automatic	569
blood coagulation factor 1	68	glycemic variability	574
blood cell counts	17	HbA1c	513
BNP 5	523	HBV 240,	513
butterfly needle	208	HCV	513
calibration result	67	Hemolysis	208
capillary electrophoresis 574, 5	562	HIV-1	513
cation-exchage electro-kinetic chromatography 5	574	HTLV-I	175
CE (cadioembolic infraction) 5	523	HTLV-II	175
CGM 5	569	identification of microorganism	255
cholestrol5	544	IFCC method	250
CI (cerebral infraction) 5	523	IFCC primary reference procedure	155
CKDstage	49	IgG4	589
CLEIA 2	235	IgG4 rerated disease	589
clotting time	. 9	immunoglobulin	562
cobas 6800/8800 5	513	influence of drugs	555
collection of urine	59	intact PTH	49
Confirmatory test	75	intra-indvidual variation	17
CP 3000	213	internal quality control	255
Cygnus auto LIP	39	presepsin	599
D-dimer 5	523	JSCC method	250
Daratumumab	83	JSCC recommended method	155

JSCC reference method	81	protein G	595
Lactate dehydrogenase	81	prothrombin time	213
Late Agglutination Assay	531	pseudo-nagative result	595
LD <sub>1</sub>	250	PT	213
LDs	250	PT-derived	9, 22
LD isozyme	81	PT-Liquid	213
lection antibody ELISA 5	540	PTH	49
less invasive and short turn-around-time (TAT) 5	540	purified IgG	595
levodopa cardidopa	555	quantitatiue limit	53
Line Immunoassay	75	re-examine criteria visual examination	264
lipoprotein fractionation	544	reagent of clinical chemistry	67
liquid-type PT	213	real-time PCR	513
liquid type reagent	22	renal function	551
Lumipulse L2400	240	rheumatoid factor	589
LUMIPULSE Presto II	235	scattered light intensity	9
MALDITOF MS, 2	222	self-monitoring of blood glucose: SMBG	244
matrix-assisted laser desorption/ionization		serum	589
time-of-flight mass spectrometry	255	serum biomaker	540
microalbumin	59	serum protein electrophoresis	83
misidentification	222	small simple swit and accurate	574
modified bromocresol purple method	562	sodium azide	39
modified IFCC reference method	32	STACIA	599
mulberry body	264	tacrolimus 53	, 260
N-assay LA IgG4 Nittobo	589	TAT	53
Nanopia PAI-1	78	TDM	260
Neisseria meningitidis	222	therapeutic monoclonal antibodies	83
Neisseria polysaccharea	222	thyroglobulin	595
NIHSS score	523	triglycerides	544
NMIJ CRM 6402-a	44	U-SCANNER II	264
non-capsulated Neisseria meningitidis	222	unfractionated heparin	168
overcooling	39	uriMeasure	59
pancreatic lipase	39	urine albumin	59
pancreatic ductal adenocarcinoma	540	urinary red blood cells	581
PIVKA-II	235	venipuncture	208
plasminogen activator inhibitor 1(PAI-1)	78	VITEK MS	222
postzone phenomenon	531	western blotting	175
pre-analytical process	208	whole PTH	49
Presepsin	230	whole PTH / intact PTH ratio	49
primary aldosteronism	44		

### 特別賛助会員

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
シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス(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)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
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

<b></b>		
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	150-0073	東京都渋谷区東2-22-14 ロゼ氷川 4F
アボットジャパン(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26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
キヤノンメディカルシステムズ(株)検体検査システム営業部		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
(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
セラビション・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
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(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
ニットーボーメディカル(株)	102-0083	東京都千代田区麹町2-4-1 麹町大通りビル
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
ビオメリュー・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	105-8717	東京都港区虎ノ門1-17-1 虎ノ門ヒルズビジネスタワー
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)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3-5-7TOC 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 京都東京都大東京大学院会の東町2
(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

### 編集後記

今年は夕刻になると新型コロナウィルスの新規感染者数を確認するのが日課となってしまいました。奇しくもこの年に、当学会第52回大会の大会長を仰せつかりました。当初は大会の開催される時期には収束しているので、通常開催が可能と判断し、理事ならびに関係者からも心配される気配はありませんでした。しかしながら、当初の予想は外れ、現地開催を中止し、WEB開催に至りました。大会に合わせて開催される日本臨床検査機器・試薬・システム振興協会展示会(JACLaS EXPO)の中止は初めての出来事でした。一方で、オンライン会議やパワーポイントの音声録画機能の便利さに気付かされました。大会は10月1日~31日にオンデマンド開催されましたが、会員の皆様にはこの利点を生かし、ご都合の良い時間に専門外の領域のテーマなども含めて幅広く学ぶ機会にしていただけたものと考えております。

さて、本号は総説1編、原著8編、技術6編が掲載されました。総説の「白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の試み」では、広く行われている白血病キメラ遺伝子の

外部精度管理法とその結果が報告されています。キメラ 遺伝子定量検査は、その数値が病態の指標になるため、 検査の質保証と施設間差是正のためにも外部精度評価が 重要です。

原著論文8編は本誌のアクティビティーにおいて立派な投稿数であり、編集幹事として感謝する次第です。どれも優秀な論文です。感染症の核酸増幅検査試薬の評価、脳梗塞症例におけるBNPおよびD-dimer測定の有用性、IgG4高値症例における測定範囲向上の必要性、全自動リポ蛋白分画法の開発、抗パーキンソン病薬がALT値に与える影響とその対策、免疫グロブリン高値検体におけるアルブミン値乖離に関する検討などは考察を読むことで、その検討の意義と重要な知見を得ることが出来ました。技術論文では、エアシューター搬送による物理的衝撃がプレセプシン値に影響を及ぼす、興味深く拝読させていただきました。論文投稿された方々に敬意を表したいと思います。

(構田浩充)

### 「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, 〆谷直人, 白井秀明, 清宮正徳, 千本松孝明, 竹越一博, 通山 薫, 中山智祥, 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5号 (通巻 第253号) 2020年11月1日発行

発 行 一般社団法人 日本医療検査科学会

発行人 萱場広之

**事務所** 〒113-0033 東京都文京区本郷4-2-5

Tel.03-3813-6635 Fax.03-3813-6679 ホームページ https://jcls.or.jp e-mail:office@jcls.or.jp

制 作 「医療検査と自動化」編集委員会

〒113-0033 東京都文京区本郷2-31-2 Tel. 03-3818-3205 Fax. 03-3818-6374

e-mail: t-gaku@gk9.so-net.ne.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-mal・Fax・郵送にてご連絡下さい。