

医療検査と自動化

(日本医療検査科学会誌)

Clinical Laboratory Science Journal

理事長から年頭のご挨拶

第35回春季セミナー公告(第2報)

第53回大会公告(第2報)

総説: B型慢性肝炎の管理に関わる新規バイオマーカーの
開発と実用化…井上貴子・田中靖人

2021年度学会予定

第35回春季セミナー/4月18日(日)

例会長・前田士郎 於: 沖縄県市町村自治会館

第53回大会/10月8日(金)、9日(土)、10日(日)

大会長・柳原克紀 於: パシフィコ横浜



一般社団法人

日本医療検査科学会

The Japan Association for Clinical Laboratory Science

2021
VOL.46
通巻第254号

1

HITACHI
Inspire the Next

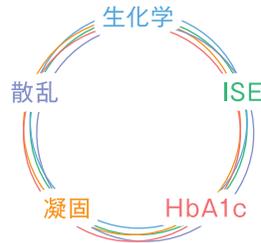
継承、そして革新

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

多彩な機能と光学系の新技术の搭載によって、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



製品情報は
こちらから



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

 株式会社 日立ハイテク

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。

<年頭のご挨拶>

新年、あけましておめでとうございます。

会員の皆様には、日頃より日本医療検査科学会への様々なご支援をいただき、心から御礼申し上げます。

皆様もご存じのように、昨年は新型コロナウイルス感染症で始まりしました。昨年の1年間ほど短く感じた年もございません。プリンセスダイヤモンド号の横浜入港は、国内でまだ感染拡大前の2月の出来事でしたが、その後の1か月で状況は急激に変化していきました。PCRへの需要の爆発的な増大、検査試薬や感染防止のためのマスクやガウンの品薄、様々な集会の計画変更など、速やかな判断と対応が求められる場面が連続する毎日でありました。昨年春に予定しておりました第35回日本医療検査学会春季セミナーは新型コロナの第一波で本年に延期となり、第52回大会およびJACLaS EXPOにつきましては、ウェブ上のオンデマンド開催となりました。会員諸兄、関連企業の皆様からは、最先端テクノロジーに触れ、様々な情報交換が行える現地開催に大きな期待を寄せられておりましたが、本学会、JACLaS、そして学会開催に携わる関係者が日々検討を重ね、努力した中での決定であったことをご理解いただきたく思います。第52回大会は本学会にとって初めてのオンデマンド形式の開催となりました。職場にいながら、あるいはご自宅で参加できることや、現地開催では重なってしまうプログラムにも網羅的に参加できるなどオンデマンド形式ならではの利点もあり、我々にとりましても貴重な経験となりました。社会状況が目まぐるしく変化する中で、初めての形式の学会を成功させていただいた慶應義塾大学病院 横田浩充会長はじめ学会運営に尽力された皆様にあらためて心から御礼申し上げます。

本年は日本医療検査科学会では、第35回日本医療検査学会春季セミナーが琉球大学・前田士郎例会長のもとで4月18日に沖縄において、そして第53回大会は長崎大学・柳原克紀会長のもとで10月8日から横浜にて開催に向けて準備を進めております。With Coronaの生活様式やイベント開催のノウハウも浸透してきたところであり、十分な対策のもとで現地開催とし、会員諸兄の貴重な情報交換と最新テクノロジーの体験の場といたく存じます。昨年は新型コロナウイルス感染症流行に伴い、世界的に新たな抗原、抗体検査が市販されました。また、PCR検査についても精度、結果の解釈、検査の意義付け、検査料金、検査スタッフの負担などあらゆる側面が社会から注目されました。今ほど医療の中で「検査」の重要性が認識されている時期は珍しいのではないかと感じております。世界が注目する中で、検査科学が新型コロナウイルスの克服に貢献し、明るく活気に満ちた年となることを心より願っております。

皆様にとりまして良い年となること、そして何よりも皆様とご家族が健やかに過ごされますことを祈願し、新年のご挨拶とさせていただきます。

理事長 萱場 広之

日本医療検査科学会(旧：日本臨床検査自動化学会)
第35回春季セミナー公告(第2報)

テーマ：プレジジョンメディスン時代の臨床検査

例会長：前田 士郎 琉球大学大学院先進ゲノム検査医学講座教授
琉球大学病院検査・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

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)～」

座長：横田 浩充(慶應義塾大学病院臨床検査技術室)

松井 啓隆(熊本大学大学院生命科学研究部臨床病態解析学講座)

- 尿沈渣検査から尿中有形成分情報へ
金城 和美(琉球大学病院検査・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：村上 正巳(群馬大学大学院医学系研究科臨床検査医学)

「プレジジョンメディスンを支えるAI」(仮)

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

【ランチョンセミナー】 11:50～12:50

【機器・試薬セミナー】 12:50～14:10

司会：草場 耕二(佐賀大学病院検査部)
山内 恵(琉球大学病院検査・輸血部)

【シンポジウムⅡ】 14:10～15:10

「AI医療の取り組み」

座長：田中 靖人(熊本大学大学院生命科学研究部生体機能病態学分野
消化器内科学講座)

和田 隆志(金沢大学大学院腎病態統御学・腎臓内科学)

- 内視鏡検査における AI 活用(仮)
横内 達則(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(株式会社テクター)

【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-ryukyuu.ac.jp

日本医療検査科学会

第53回大会 大会公告(第2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 —」



会 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

特別講演 「新型コロナウイルス感染症関連」

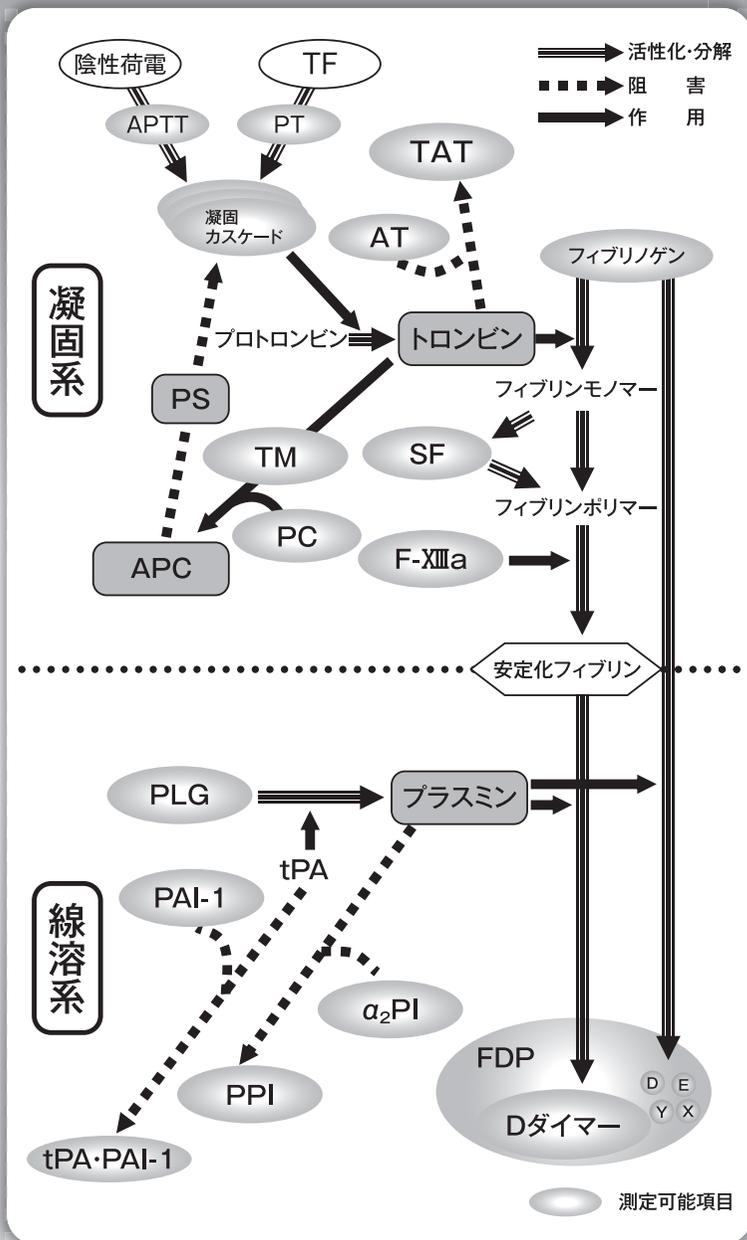
館田 一博(東邦大学医学部微生物・感染症学講座)

< 企画中 >

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、一般演題、ランチョンセミナー、サテライトセミナー、機器・試薬セミナー、論文賞受賞講演、JACLaS Award I・II、他

全自動臨床検査システム STACIA® (ステイシア)

6つの測定法を21分以内に報告!



信頼されるデータ

24時間いつでも測定可能

270テスト/hrの高速処理

全自動臨床検査システム STACIA®



届出番号 13B3X10041000011

凝固時間は、PT、APTT、Fib、トロンボテスト、ヘパラスチンの測定が可能です。
 その他に、心疾患項目、感染症項目、TDM、生化学項目等、多種に亘る項目、また、開発中の項目がございます。
 詳細は、URL、またはお近くの営業所へ。

製造販売元  **株式会社LSIメディエンス**

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

アキュラスオート TP抗体 (梅毒)-A

- **リコンビナント抗原を使用しています** (ロット差が小さい試薬です)
- **確認試験が行えます** (確認用抗原液と検体を混和してからすぐに測定できます)

統一商品コード	品名	識別記号	規格	貯蔵方法	有効期間
326053926	アキュラスオート TP抗体 (梅毒)-A	R-I 緩衝液	23 mL × 2	2~8℃保存	1年間
		R-II ラテックス試液	7.5 mL × 2		
326055715	アキュラスオート TP抗体 (梅毒)-A HLS	R-I 緩衝液	34.0 mL × 2		
		R-II ラテックス試液	14.2 mL × 2		
326062461	アキュラスオート TP抗体 (梅毒)-A (55)	R-I 緩衝液	19 mL × 2		
		R-II ラテックス試液	9 mL × 2		

< 別売品 >

*「R-I 緩衝液」、「R-II ラテックス試液」のセット規格です。

統一商品コード	品名	規格	貯蔵方法	有効期間
326047352	アキュラスオート TP抗体 (梅毒) 標準液「定量試験用」	2 mL × 5濃度	2~8℃保存	1年間
326047369	アキュラスオート TP抗体 (梅毒) 標準液「定性試験用」	2 mL × 2濃度		
326047383	アキュラスオート TP抗体 (梅毒) 陽性コントロール	2 mL × 2濃度		
326081059	アキュラスオート TP抗体 (梅毒) 陰性コントロール	2 mL × 1		
326047376	アキュラスオート TP抗体 (梅毒) 確認用抗原液	10 μL × 10		

非トレポネーマ脂質抗体キット

製造販売承認番号 22900EZ00057000

アキュラスオート RPR

- **測定範囲は 0.5~20.0 R.U.です**
- **保存安定性に優れた試薬です** (2~8℃保存で1年間安定です)

統一商品コード	品名	識別記号	規格	貯蔵方法	有効期間
326076178	アキュラスオート RPR	(20) R-I 緩衝液	20 mL × 2	2~8℃保存	1年間
		R-II ラテックス液	11 mL × 2		
326076161	アキュラスオート RPR	HLS R-I 緩衝液	34.0 mL × 2		
		R-II ラテックス液	19.0 mL × 2		
326080335	アキュラスオート RPR	(55) R-I 緩衝液	18 mL × 2		
		R-II ラテックス液	11 mL × 2		

< 別売品 >

*「R-I 緩衝液」、「R-II ラテックス液」のセット規格です。

統一商品コード	品名	規格	貯蔵方法	有効期間
326076192	RPR標準血清	1mL × 5濃度	2~8℃保存	6ヶ月間
326076208	RPRコントロール	2mL × 2濃度 × 3		

製造販売元

株式会社シノテスト

神奈川県相模原市南区大野台4-1-93

<https://www.shino-test.co.jp>

《問い合わせ先》

株式会社シノテスト カスタマーサポート

TEL 0120-66-1141

FAX 042-753-1892

目次

学会ニュース

総説

B型慢性肝炎の管理に関わる新規バイオマーカーの開発と実用化……………井上 貴子, 田中 靖人…(3)

原著

尿路感染症診療におけるフローサイトメトリー方式全自動尿中有形成分
分析装置の有用性……………服部 琴ノ…(13)
肺炎患者における血中プロカルシトニン測定の有用性についての検討……………角野 忠昭…(19)

技術

ALP・LD活性測定におけるIFCC法対応試薬の性能評価……………寺田 祥…(23)
Personal CGMとProfessional CGMの較正精度に関する比較
—パイロットスタディー—……………武石 宗一…(30)
梅毒血清学的検査試薬「アキュラスオートRPR」および
「アキュラスオートTP抗体」の基本性能に関する検討……………佐藤 秀信…(35)
高感度HBs抗原測定試薬「ルミパルスプレストHBsAg-HQ」の性能評価……………重満 千春…(40)
フィブリノゲン測定における凝固点下限チェック設定の有用性
～フィブリノゲン偽低値の検出ツール～……………下村 大樹…(48)
IFCC法に対応した新規ALPアイソザイム活性染色試薬（クイックEP ALP-IF）
に関する検討……………高橋美記子…(53)
全自動臨床検査システム STACIA による 自己抗体検査試薬の性能評価……………谷澤 李紗…(59)
新規自動分析装置コバス pro<503>によるALB, Ca, Mgおよび
TG項目の測定性能および搭載機能の有用性評価……………田中真輝人…(69)
自動分析装置 コバスpro<503>によるLDおよび
ALP IFCC法対応試薬の基礎的検討……………梅森 祥央…(76)
酵素法によるMg測定試薬の性能評価……………竹田 千尋…(82)
理事会議事録……………(87)

CONTENTS

JCLS News

Review

Development and Practical Application of Novel Biomarkers related
to the Management of Chronic Hepatitis B Takako INOUE, Yasuhiro TANAKA... (3)

Originals

Usefulness of a Flow Cytometry Type Full-automatic Urine Component
Analyzer in Clinical Practice for the Urinary Tract Infection Kotono HATTORI... (13)

Usefulness of Blood Procalcitonin Measurement in
Patients with Pneumonia Tadaaki KADONO... (19)

Reports

Evaluation of IFCC Measurement Reagents for ALP and
LD Activity Assay. Shou TERADA... (23)

Comparison of Personal vs. Professional Continuous Glucose
Monitoring related to Calibration: pilot study Soichi TAKEISHI... (30)

The Evaluation of the Serological Test Reagent for Syphilis;
Accuras Auto RPR and Accuras Auto TP (Syphilis)-A. Hidenobu SATO... (35)

Performance Evaluation of High-Sensitivity HBs Antigen
Immunoassay "Lumipulse Presto HBsAg-HQ" Chiharu SHIGEMITSU... (40)

Usefulness of Checking Coagulation Point Lower Limit in Fibrinogen Measurement
~ Fibrinogen False Low Detection Tool ~ Daiki SHIMOMURA... (48)

A Study on a Novel ALP Isozyme Activity Staining Reagent
(Quick EP ALP-IF) Compatible with IFCC Method Mikiko TAKAHASHI... (53)

Evaluation of STACIA for Autoantibodies Test Risa TANIZAWA... (59)

Evaluation of ALB, Ca, Mg and TG Measurement Performance and
Usefulness of Built-in Functions using the New Automatic Analyzer,
"cobas pro<503>". Makito TANAKA... (69)

Fundamental Study of IFCC Methods for Measurement of LD and
ALP by the New Automatic Analyzer, "cobas pro<503>" Yoshifumi UMEMORI... (76)

Evaluation of the Reagents in the Enzymatic Method for Magnesium Chihiro TAKEDA... (82)

Boad Meeting Minutes (87)

B型慢性肝炎の管理に関わる新規バイオマーカーの開発と実用化

Development and Practical Application of Novel Biomarkers related to the Management of Chronic Hepatitis B

井上貴子¹⁾ 田中靖人^{2,3)}

Abstract Hepatitis B virus (HBV) cannot be eliminated completely from infected hepatocytes because of the existence of intrahepatic covalently closed circular DNA (cccDNA). As chronic hepatitis B (CHB) can advance to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC), it is essential to manage CHB to prevent HCC development in high-risk patients with high viral replicative activity or advanced fibrosis. 1) Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with serum HBV DNA and intrahepatic cccDNA. In CHB patients with undetectable serum HBV DNA or loss of HBsAg, HBcrAg still can be detected and the decrease in HBcrAg levels is significantly associated with expectant outcomes. Therefore, HBcrAg can predict HCC occurrence or recurrence. 2) Measurement of the Mac-2 binding protein glycosylation isomer (M2BPGi) has been introduced for the evaluation of liver fibrosis. Because elevated M2BPGi in CHB is also related to the prediction of HCC development, monitoring its progression is important. 3) Because alpha-fetoprotein (AFP) has insufficient sensitivity and specificity for early-stage HCC, a combination of AFP plus protein induced by vitamin K absence factor II, or AFP plus *Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of AFP might improve the diagnosis of HCC development. This review provides an overview of novel biomarkers used for the management of CHB.

Key words Chronic hepatitis B, Liver fibrosis, Hepatocellular carcinoma, Intrahepatic covalently closed circular DNA (cccDNA), Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg), Mac 2-binding protein glycan isomer (M2BPGi)

1. はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) は輸血後肝炎を起こすウイルスとして、1968年に発見された。世界保健機関の報告によると、2015年、世界の約2億5700万人がHBVに慢性感染 (HBsAg陽性) している¹⁾。わが国のHBV持続感染率は約1%で、100万人以上の感染者が存在する²⁾。

HBVは血液などの体液を介して感染する。1972

年、わが国では日本赤十字社の血液センターでHBsAgのスクリーニング検査が開始され、現在輸血を含む医療行為による感染は予防可能である。1986年には母子感染予防事業が開始され、主な感染経路のひとつである母子感染が激減した。近年は性感染症としてのHBV感染の増加が問題となっている²⁾。

HBV持続感染者はその自然経過中、無症候性キャリアから慢性肝炎を経て、肝硬変へと進展しうる。

Takako INOUE, Yasuhiro TANAKA

¹⁾名古屋市立大学病院 中央臨床検査部

²⁾名古屋市立大学大学院医学研究科 病態医科学

³⁾熊本大学大学院生命科学研究部 生体機能病態学分野 消化器内科学

¹⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Nagoya City University Hospital

²⁾Department of Virology and Liver Unit, Nagoya City

University Graduate School of Medical Sciences

³⁾Department of Gastroenterology and Hepatology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University.

Corresponding author: 田中 靖人

〒860-8556 熊本市中央区本荘1-1-1

1-1-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto, 860-8556, Japan.

E-mail: ytanaka@kumamoto-u.ac.jp

活動性のHBV慢性感染症は、持続的な肝細胞傷害と組織修復をもたらす³⁾。その結果、肝硬変に至り、肝細胞癌のリスクが高まる。肝硬変まで病期が進行した場合、年間5~8%に肝細胞癌が発生する²⁾。

現在のHBV治療は、主に肝硬変・肝細胞癌への進展予防を目的としている^{4,5)}。核酸アナログ製剤(NA)またはインターフェロン製剤はHBVの複製を効果的に抑制することができるが、体内からのHBV完全排除には至らない⁶⁾。いったんHBVに感染すると、環状ウイルスDNA (covalently closed circular DNA [cccDNA]) が肝細胞核内に維持され、ウイルス複製の鋳型となる。肝内cccDNA量と転写活性は、病期進行と臨床転帰を決める重要な要因である⁷⁾。

B型慢性肝炎の効果的な管理を実現するには、診断・治療・モニタリング・予後評価に有用な検査が不可欠である。肝疾患の病態を評価するためのゴールドスタンダードとされてきた肝生検は侵襲的で、サンプリングエラーや主観的な結果解釈が発生しやすい⁸⁾。肝細胞癌は、主に画像検査と腫瘍マーカー検出に基づいて診断される^{4,5)}。そのため、より信頼性が高く非侵襲的で、費用対効果の高いバイオマーカーの開発が求められている。

本稿では、B型慢性肝炎の管理と予後評価に可能性を秘めた新規バイオマーカーに焦点を当てる。まず、肝内cccDNAとの相関関係が明らかにされたHBV複製の指標「HBコア関連抗原 (HBcrAg)」について述べる。このマーカーはB型慢性肝炎のモニタリングのみならず、肝癌発症や再発とも関連しており、肝癌発症予測を可能にする肝線維化マーカー「Mac-2結合蛋白糖鎖修飾異性体 (M2BPGi)」と合わせて紹介する。最後に、肝細胞癌特異的腫瘍マーカーとして「 α -フェトプロテイン (AFP)、PIVKA-II、AFPレクチン分画 (AFP-L3)」の特徴と活用法に触れる。

2. HBcrAg

HBcrAgは、プレコア/コア遺伝子がコードする3つのタンパク (HBcrAg, p22cr, HBeAg) から構成されるバイオマーカーである⁹⁾。HBcrAgはHBV DNAを包むヌクレオカプシドを形成している。p22crは、HBV DNAを持たない中空粒子に内包される22 kDaのプレコアタンパクである¹⁰⁾。HBeAgはプレコアタンパクに由来し、肝細胞から分泌される¹¹⁾。これら3つのタンパクは、同一の149アミノ酸配列を共有している^{10,12)} (図1)。

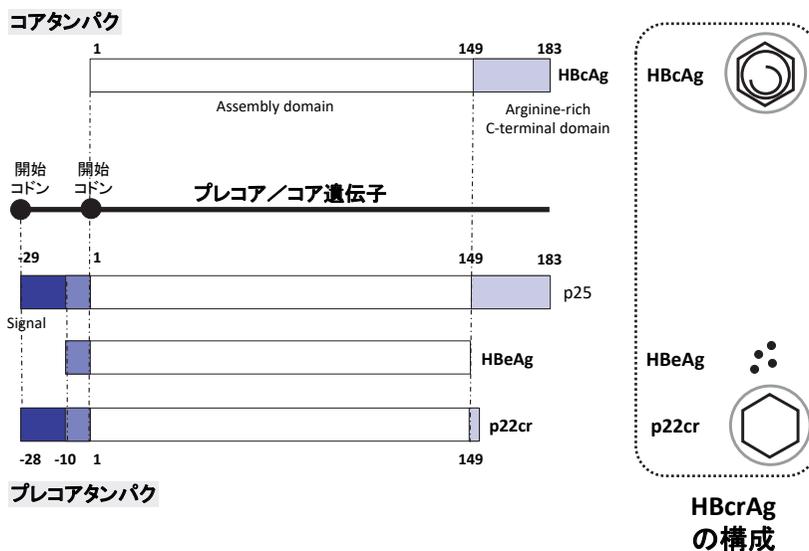


図1 HBcrAgの構成

HBcrAgは、プレコア/コア遺伝子がコードする3つのタンパク (HBcrAg, p22cr, HBeAg) から構成される。これら3つのタンパクは、同一の149アミノ酸配列を共有している。

ここではHBcrAgの歴史とバイオマーカーとしての特徴を紹介し、肝細胞癌発生と再発予測因子としての役割に焦点を当てる。

1) HBcrAgの歴史と測定系の開発

HBcrAgは近年、B型慢性肝炎の管理に関するガイドラインに取り上げられ、まず日本で、次にアジア地域、そして最近ではヨーロッパでもその意義が認められるようになった。

HBcrAgの最初の報告は2002年にさかのぼり、HBcAgとHBeAgで構成されるプレコア/コア遺伝子産物をHBcrAgと定義した。測定前処理で検体中の抗体は不活性化され、抗原は変性されるため、この測定系ではHBc抗体陽性またはHBe抗体陽性でもHBcAgおよびHBeAgを検出できる。HBcrAg値はHBV DNA量を反映しているため、この検査はHBV DNAの代替マーカーとしてB型慢性肝炎患者のモニタリングに使用できる¹³⁾。

その後、化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) が開発され、HBcrAg測定はさらに進歩した。新しい測定系の臨床成績から、HBcrAg値はHBV DNA量と正の相関があることがわかった⁹⁾。現行のHBcrAg測定系の検出下限は100 U/mLで、推奨されるカットオフラインは1,000 (3 log) U/mLである。

2) HBcrAgの臨床応用

新規バイオマーカーHBcrAgは、B型慢性肝炎のモニタリングと転帰予測をサポートするために使用される。ここでは、近年報告されたHBcrAgの臨床応用について概説する。

血清HBcrAg値は、肝内cccDNA量および血清

HBV DNAと密接に関連している^{14,15)}。HBcrAgが陰性 (<3 log U/mL) の患者は、HBcrAgが陽性の患者と比べて肝内cccDNA量・活性とも低い¹⁵⁾。HBeAg陽性・陰性にかかわらず血清HBcrAg値は肝内cccDNA量との相関が良好で、血清HBV RNAやHBsAgと肝内cccDNA量との相関よりも優れている¹⁶⁾。

医療資源が限られる地域では、HBV DNA検査の施行は、費用の面からも制限されるため、低コストの代替マーカーが求められてきた。抗ウイルス薬で未治療の患者5,591名を調査したメタ解析の結果、HBV遺伝子型によらず、HBcrAgとHBV DNA量は相関した¹⁷⁾。また、HBcrAg測定はHBV DNA検査よりも安価で、1/5から1/10の費用で測定できる。アフリカのガンビア共和国での検討では、HBcrAgを用いたHBV DNAによらない新しいアルゴリズムを作成したところ、治療対象となる患者が良好に抽出された¹⁸⁾。したがって、HBcrAgはHBV DNAの代替マーカーとしての活用が期待される。

3) 肝細胞癌発生予測とHBcrAg

血清HBV DNA高値は、肝硬変・肝細胞癌発症のリスク増加と相関している¹⁹⁾。しかしこれまで、NA治療中のB型慢性肝炎患者の肝硬変・肝細胞癌への進展を予測することは困難であった。また、HBV DNA量が少ないか検出できない症例では肝細胞癌発症のリスクが低下するが、完全には阻止できない²⁰⁾。近年、血清HBcrAg値を含むいくつかのHBVマーカーが、B型慢性肝炎患者の肝細胞癌発生予測に有用であることが示されている。HBcrAgと肝細胞癌発生の関係について、表1にまとめる²¹⁾。

表1 肝細胞癌発生・再発とHBcrAg (文献21を引用改変)

内容	血清HBcrAg値 (log U/mL)	文献
HCC発生 (NA未治療)	>2.9 log U/mL	20, 22
HCC再発 (HCC治療後2年以内)	>4.8 log U/mL (HCC診断時)	20, 22
HCC発生 [HBV DNA中等量 (2,000-19,999 U/mL)]	≥4.0 log U/mL	23
高HCC累積発生率 (NA治療中)	≥3.4 log U/mL (HBV DNA消失時)	24
HCC発生 (NA治療中)	血清HBcrAgの検出 (NA治療中)	25
HCC発生	血清HBcrAg値 >3.0 log U/mL、血清HBsAg値 >3.0 log IU/mL (カットオフ値)	27
HCC発生 (NA治療歴あり)	>4.67 log U/mL (治療開始前)、>3.89 log U/mL (治療開始後)	26

Abbreviations: HBcrAg, hepatitis B core-related antigen; HBV, hepatitis B virus; NA, nucleos(t)ide analogue; HCC, hepatocellular carcinoma; HBsAg, hepatitis B surface antigen.

大規模なコホート研究では、HBcrAgはNA未治療のB型慢性肝炎患者における肝細胞癌発生予測の点で、HBV DNAよりも優れていた。フォローアップ期間（中央値10.7年）に、NA未治療のB型慢性肝炎患者1,031人のうち78人（7.6%）が肝細胞癌を発症し、フォローアップ開始時のHBcrAg値 $>2.9 \log \text{ U/mL}$ は肝細胞癌発生に関連していた²²⁾。別の報告では、HBV DNA中等量（2,000–19,999 U/mL）の患者で血清HBcrAg値 $\geq 4.0 \log \text{ U/mL}$ の場合、肝細胞癌発生が増加する²³⁾。また、NA治療中の肝細胞癌累積発生率が高いのは、HBV DNA消失時の血清HBcrAg値 $\geq 3.4 \log \text{ U/mL}$ のグループであった²⁴⁾。

NA治療中のB型慢性肝炎患者の場合も、HBcrAg値は肝細胞癌発症の独立した危険因子である²⁵⁾。肝硬変症例では、治療前のHBcrAg $>4.67 \log \text{ U/mL}$ 、治療開始後のHBcrAg $>3.89 \log \text{ U/mL}$ は肝細胞癌発生と関連している²⁶⁾。

最近の報告では、HBsAg値とHBcrAg値の組み合わせが、B型慢性肝炎患者の肝細胞癌発生を予測する効果的なバイオマーカーであることが示されている。HBsAgとHBcrAgのカットオフ値をそれぞれ $3.0 \log \text{ IU/mL}$ と $3.0 \log \text{ U/mL}$ とした場合、肝細胞癌の既往にかかわらず、HBsAg $>3.0 \log \text{ IU/mL}$ とHBcrAg $>3.0 \log \text{ U/mL}$ を満たす症例で有意に肝細胞癌の発生が増加した²⁷⁾。

4) 肝細胞癌再発予測とHBcrAg

NA治療が進歩した現在も、肝細胞癌の術後再発率は依然として高率で、2年間で最大41.8%と報告されている²⁸⁾。術前の血清HBsAg値 $>1,000 \text{ IU/mL}$ 、HBeAg陽性、肝硬変、腫瘍径、腫瘍数、大血管浸潤、エンテカビル（ETV）またはテノホビル（TDF）以外のNAによる治療など、いくつかの要因が再発率の上昇に関連しているとされる²⁹⁾。

最近の研究から、根治手術後の肝細胞癌再発を予測するHBcrAg値が確認された。55人の肝細胞癌患者を調査した結果、肝細胞癌診断時の血清HBcrAg値 $>4.8 \log \text{ U/mL}$ で、根治手術から2年以内に高率に肝細胞癌が再発した（ハザード比：8.96）²⁰⁾。肝移植が行われた肝細胞癌患者に関する報告から、肝移植後のHBcrAg陽性は肝細胞癌再発と有意な相関を示さなかった³⁰⁾ ことから、術前のHBcrAg値が肝細胞癌再発のリスクが高い患者を特定するバイオマーカーとなりうる。さらに、肝細胞癌が再発しない場合

の生存率は、肝内cccDNAおよび血清HBcrAg値が高い肝細胞癌患者では有意に低かったと報告されている³¹⁾。HBcrAgと肝細胞癌再発の関係について、表1にまとめる²¹⁾。

5) 今後の展望と課題

血清HBcrAg値はHBV DNA量と相関している。「機能的治癒」を達成しHBV DNAやHBsAgが検出できない患者でも、HBV再活性化や肝細胞癌発生などの合併症が報告されている。また、「機能的治癒」を達成した患者の一部からは依然としてHBcrAgが検出されるため、HBcrAg陽性・陰性それぞれの症例を集め、長期予後と比較する前向き研究が必要である。これまでHBcrAgに関する報告は、東アジア地域からがほとんどであった。HBcrAgをよりグローバルなバイオマーカーとして活用するためには、特に欧米での大規模なコホート研究を完結する必要がある。

最近、従来と比較して約10倍高感度の新しいHBcrAg測定系が開発されている³²⁾。完全自動化された前処理技術に基づいた新しい高感度HBcrAg測定の臨床応用、特にHBe抗原陰性B型慢性肝炎患者の管理やHBV再活性化のモニタリングに導入されることが期待される。

3. 肝線維化マーカー：M2BPGi

革新的なグリコプロテオミクス研究により、Mac-2結合タンパク質（M2BP）のグリコシル化および糖鎖構造の特異的修飾が、肝線維化と関係していることが明らかとなった³³⁾。この知見から、M2BPGiは肝線維化の程度を反映する新しい糖鎖バイオマーカーとして開発された。ここでは、肝線維化マーカーとして、また肝細胞癌の予測ツールとしてのM2BPGiの開発と最新の評価について概説する。

1) M2BPGiとその意義

わが国では2013年、肝線維化を評価する新規糖鎖バイオマーカーとして、非侵襲的かつ迅速測定が可能なM2BPGiの使用が承認された^{33,34)}。肝線維化特異的に修飾された糖鎖構造を有するM2BPタンパク、すなわち血清M2BPGi値は、肝線維化の進行と有意に相関する³³⁾。

M2BPGiは、M2BP上のN-グリカンおよびO-グリカンのN-アセチルガラクトサミン残基を認識する *Wisteria floribunda* agglutinin（WFA）と呼ばれ

る特定のレクチンによって検出される³⁵⁾ (図2a)。自動化されたハイスループットアッセイは、10 μ Lの血清サンプル中のM2BPGi濃度を17分で測定する(図2b)³³⁾。現在、M2BPGiは全自動免疫測定装置HISCL(シスメックス株式会社)によって、微量の検体(10 μ L)から、迅速な測定(17分)が可能である。測定範囲は0.1~20 C.O.I.と報告され、1.0 C.O.I.未満は陰性と判定される。

2) M2BPGiを用いた肝細胞癌発生予測

M2BPGiは開発後、主にC型慢性肝炎患者の肝線維化の評価に使用されてきた³⁶⁾。その後、肝線維化の評価における有効性はC型慢性肝炎に留まらず、B型慢性肝炎³⁷⁾、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)³⁸⁾、胆道閉鎖症³⁹⁾で実証された。さらに、血清M2BPGi値は、B型慢性肝炎⁴⁰⁾、C型慢性肝炎⁴¹⁾、またはNAFLD⁴²⁾における肝細胞癌発生リスクを予測できることが分かった。M2BPGiがB型慢性肝炎患者の肝細胞癌発生予測に有用であることを示すデータを紹介する。

M2BPGi値は、性別(男性)・糖尿病の合併とともに、肝細胞癌発生の独立した予測因子である。M2BPGi >1.8 C.O.I.の場合、非肝硬変患者では肝細胞癌発生のリスクが高く($p < 0.001$)、肝硬変患者にもその傾向がある($p = 0.073$)⁴³⁾。またM2BPGiは、肝細胞癌発生のリスクが低いB型慢性肝炎患者の抽

出にも用いられる。未治療のHBeAg陰性B型慢性肝炎患者でM2BPGi <0.68 C.O.I.の場合、陰性的中率は非常に高く(99.3%)、陽性的中率は低かった(25.8%)⁴⁴⁾。

NA治療中のB型慢性肝炎患者の場合、治療前とNA治療開始48週後のM2BPGi値が肝細胞癌発生の指標となる。肝硬変患者で治療前のM2BPGi値⁴⁵⁾およびNA治療開始48週後のM2BPGi値 ≥ 1.215 C.O.I.⁴⁶⁾は肝細胞癌発症と関連していた。なお、NA治療中にHBV DNAが検出できない患者では、治療前のM2BPGi値が高いほど肝細胞癌発症のリスクが上昇する⁴⁵⁾。さらに、HBV感染に関連する肝細胞癌患者において、M2BPGi値が治癒的切除後の肝細胞癌再発の独立した予測因子であった⁴⁷⁾。したがって、M2BPGiはB型慢性肝炎患者の肝細胞癌発生予測に有用である。

3) 今後の展望と課題

これまでにC型慢性肝炎患者におけるM2BPGiの実用性は十分証明されているが、B型慢性肝炎に関する報告はまだ少ない。肝硬変または肝細胞癌を予測するためのM2BPGiカットオフ値は病因によって異なり、B型慢性肝炎ではM2BPGi ≥ 0.71 C.O.I.⁴⁸⁾、前述のNA開始後48週のM2BPGi ≥ 1.215 C.O.I.⁴⁶⁾と報告されている。B型慢性肝炎患者のM2BPGi値はC型慢性肝炎患者よりも低いことが予想され、今後

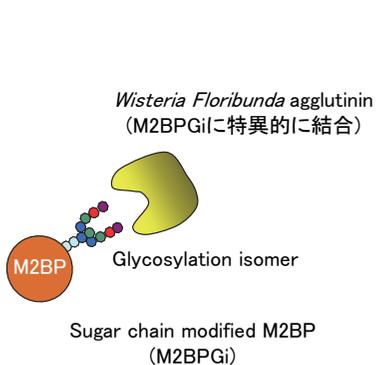


図2 (a) M2BPGiとWFAの相互作用
M2BPGiには肝線維化に関連する特有の修飾がある。レクチンWFAはM2BPGiに特異的に結合する。レクチン-グリカン相互作用から、レクチン-抗体サンドイッチイムノアッセイが開発され、M2BPGiの定量化が可能となった。

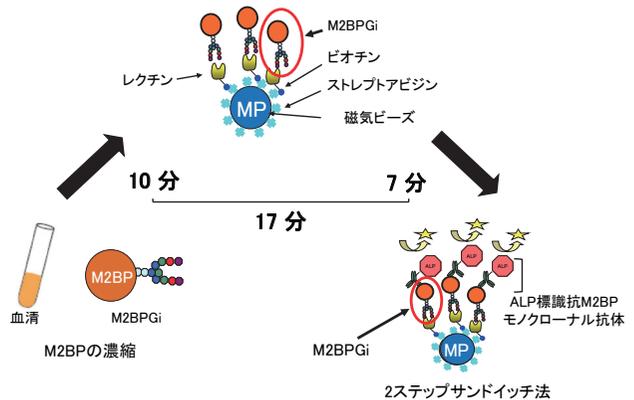


図2 (b) 全自動化されたM2BPGi測定
全自動化装置を使用したM2BPGi測定の主な手順を示す。磁気ビーズに固定化されたレクチンは、希釈血清と混和される。非結合タンパクを洗浄除去後、ALP標識抗M2BPモノクローナル抗体を添加する。化学発光基質と停止液は、未結合抗体の洗浄除去後添加される。測定に要する時間は17分である。

明確な指標設定が求められる。

また、これまでM2BPGiに関する報告は、HBcrAg同様アジア地域からが大半であった。今後より広範な地域の患者集団において、肝線維化および肝細胞癌バイオマーカーとしての有用性を議論し、証明する必要がある。

4. 腫瘍マーカー：AFP, AFP-L3, PIVKA-II

AFP, AFP-L3およびPIVKA-IIは肝細胞癌に特異的な腫瘍マーカーで、B型慢性肝炎の管理に不可欠である。腫瘍マーカーの測定は肝細胞癌の診断基準では触れられず、アメリカ肝臓病学会⁴⁹⁾または欧州肝臓病学会⁵⁰⁾のガイドラインでも推奨されていないが、肝細胞癌の診断に必要な情報を提供する。

AFP, AFP-L3, PIVKA-IIの測定値は通常肝細胞癌の進展、すなわち肝細胞癌の腫瘍径と数が増加し、脈管浸潤が進行するにつれて上昇する⁵¹⁾。また腫瘍マーカーの上昇は肝細胞癌の大きさや数の増加とは関係なく、悪性度を示唆しているとも報告されている⁵²⁾。したがって、これらの腫瘍マーカーの上昇は予後が悪いことを意味している⁵¹⁾。ここでは肝細胞癌発生の指標および転帰の予測因子として、3つの腫瘍マーカーAFP, AFP-L3, PIVKA-IIの特徴を概括する。

1) AFPおよびAFP-L3

AFPは1964年に肝細胞癌患者の血清から最初に発見され、それ以降肝細胞癌診断における主要なバイオマーカーとなっている⁵³⁾。血清AFP高値は肝細胞癌の存在や発症と相関しており、診断および予後予測因子として使用されている⁵⁴⁾。AFPは肝細胞癌の診断精度が低く、感度が18~60%、特異度が85~90%であるため、最近アメリカ肝臓学会肝細胞癌ガイドラインから除外された⁵⁵⁾。実際、AFPの上昇がみられる肝細胞癌患者は60~80%⁵⁶⁾で、AFP単独での肝細胞癌スクリーニングは推奨されない⁵⁴⁾。

AFPはレクチン *Lens culinaris* agglutinin (LCA) への結合能力が異なる3つのグリコフォームとして存在する。AFP-L1は非結合画分、AFP-L2は弱い結合画分、AFP-L3は結合画分である。AFP-L1は慢性肝炎と肝硬変で増加し、AFP-L3は肝細胞癌で増加する⁵⁶⁾。AFP-L3は肝細胞癌に対して92.0~99.4%の高い特異性を持ち、18.8~37.0%と感度は

低い⁵⁷⁾、肝細胞癌に特異的なバイオマーカーである。AFP-L3は通常AFP <20 ng/mLの場合は検出されないため、AFP-L3を用いた肝細胞癌の診断は困難である。

高感度分析法の進歩により「高感度AFP-L3」(hs-AFP-L3)と呼ばれるAFP-L3イムノアッセイの感度が向上し、感度と特異性はそれぞれ84.9%と88.6%であった⁵⁸⁾。さらに、術後のAFP-L3%は治癒的治療後の肝細胞癌再発の予後因子であり、微小肝細胞癌の検出につながる⁵⁹⁾。これらの結果はhs-AFP-L3が初期段階の肝細胞癌を検出するバイオマーカーとして有望であることを示している。

2) PIVKA-II

des- γ -カルボキシプロトロンビン (DCP) として知られるPIVKA-IIは、肝細胞癌で増加する異常プロトロンビン分子である⁵⁶⁾。PIVKA-IIの利点は、AFPと比べて非肝細胞癌で上昇する可能性が低いことである⁵⁴⁾。肝細胞癌のスクリーニング検査では、PIVKA-IIの感度は72.7%、特異度は90.0%であった⁶⁰⁾。

初期の肝細胞癌診断でPIVKA-IIはAFPよりも優れ、PIVKA-II >90 mAU/mL (基準値: <42 mAU/mL) は肝細胞癌の重要な予後因子とされる微小血管浸潤の独立した予測因子である⁶¹⁾。PIVKA-IIはB型慢性肝炎患者の肝細胞癌診断において、腫瘍径や民族的背景に関係なく、AFPよりも優れた精度を示す⁶²⁾。

最も重要な点はPIVKA-IIが門脈浸潤の検出に適しており、肝細胞癌初期診断時のPIVKA-II値はその後の門脈浸潤への進展と有意な相関関係があることである⁶³⁾。腫瘍径が小さい (≤ 2 cm) 場合でも、PIVKA-IIが高い (>100 mAU/mL) 患者は微小浸潤のリスクがあると報告されている⁶⁴⁾。

3) AFPとPIVKA-IIの組み合わせ

PIVKA-IIは肝細胞癌に特異的であり、他の慢性肝疾患で上昇する傾向が少ないため、AFPとPIVKA-IIの組み合わせは、肝硬変患者の早期肝細胞癌の診断に有効である。この組み合わせはAFP単独と比較して、感度が向上し(65%から87%)、特異性は低下する(84%から69%)と報告されており、肝細胞癌のスクリーニングに有効である⁶⁵⁾。

肝細胞癌を検出する5つの代表的なバイオマーカー (AFP, AFP-L3, PIVKA-II, 扁平上皮癌抗原

[SCCA], およびセントロメアプロテインF自己抗体 [抗CENPF]) を用いた大規模な検討でも、有効な2種類のマーカーの組み合わせはAFPとPIVKA-IIであった⁶⁶⁾。

4) 今後の展望と課題

肝細胞癌の診断は特に初期段階では依然として困難で、B型慢性肝炎患者の予後を改善するためにより早期の正確な診断が不可欠である。現在まで、単一で肝細胞癌の検出に十分な感度と特異性を持っているバイオマーカーは実用化されておらず、バイオマーカーの組み合わせが初期肝細胞癌の検出を改善した。日本肝臓学会のガイドラインでは、肝細胞癌高リスク群のスクリーニングとしてAFP, AFP-L3およびPIVKA-IIと超音波検査の同時測定が推奨されている⁶⁷⁾が、現状では保険適用の面からも汎用が難しい。

5. おわりに

本稿では、B型慢性肝炎の管理に関わる新しいバイオマーカーの開発と実用化について概説した。HBcrAgは、B型慢性肝炎患者の肝内cccDNAの活動性を評価するのに適している。M2BPGiは、B型慢性肝炎患者の肝線維化と肝細胞癌発症リスクを評価できる。肝細胞癌特異的な腫瘍マーカーとして紹介したAFP, PIVKA-II, AFP-L3については、1つでは癌の検出が制限されるが、組み合わせることで検出率が向上する。

これらのバイオマーカーの適切な選択は、日常診療において的確な見通しをもたらす。B型慢性肝炎診療の多くの側面ですらにバイオマーカーを活用するために、よりグローバルなデータが必須である。

本論文内容に関連する著者の利益相反：

井上貴子 (研究費・助成金：ギリアド・サイエンシズ株式会社, MSD株式会社)

田中靖人 (治験・奨学寄附金：中外製薬株式会社, ヤンセンファーマ株式会社, グラクソ・スミスクライン株式会社, 富士レビオ株式会社, ギリアド・サイエンシズ株式会社, 講演料：富士レビオ株式会社, シスメックス株式会社, ギリアド・サイエンシズ株式会社)

文献

- 1) World Health Organization (WHO). Hepatitis B fact-sheet. WHO web site, 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
- 2) B型肝炎治療ガイドライン (第3.2版). 日本肝臓学会肝炎診療ガイドライン作成委員会 編. 2020:1.
- 3) Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:181-194.
- 4) EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017;67:370-398.
- 5) Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology.* 2018;67:1560-1599.
- 6) Lok AS, Zoulim F, Dusheiko G, et al. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval. *Hepatology.* 2017;66:1296-1313.
- 7) Inoue T, Tanaka Y. The Role of Hepatitis B Core-Related Antigen. *Genes.* 2019;10.
- 8) Parikh P, Ryan JD, Tsochatzis EA. Fibrosis assessment in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Annals of translational medicine.* 2017;5:40.
- 9) Rokuhara A, Tanaka E, Matsumoto A, et al. Clinical evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigen; a marker distinct from viral DNA for monitoring lamivudine treatment. *J Viral Hepat.* 2003;10:324-330.
- 10) Kimura T, Ohno N, Terada N, et al. Hepatitis B virus DNA-negative Dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain. *J Biol Chem.* 2005;280:21713-21719.
- 11) Glebe D, Bremer CM. The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis.* 2013;33:103-112.
- 12) Hadziyannis E, Laras A. Viral Biomarkers in Chronic HBeAg Negative HBV Infection. *Genes.* 2018;9.
- 13) Kimura T, Rokuhara A, Sakamoto Y, et al. Sensitive enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigens and their correlation to virus load. *J Clin Microbiol.* 2002;40:439-445.
- 14) Liu YY, Liang XS. Progression and status of antiviral monitoring in patients with chronic hepatitis B: From HBsAg to HBV RNA. *World J Hepatol.* 2018;10:603-611.
- 15) Testoni B, Lebosse F, Scholtes C, et al. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients. *J Hepatol.* 2019;70:615-625.

- 16) Chen EQ, Wang ML, Tao YC, et al. Serum HBcrAg is better than HBV RNA and HBsAg in reflecting intrahepatic covalently closed circular DNA. *J Viral Hepat.* 2019;26:586-595.
- 17) Yoshida K, Desbiolles A, Feldman SF, et al. Hepatitis B Core-Related Antigen to Indicate High Viral Load: Systematic Review and Meta-Analysis of 10,397 Individual Participants. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;S1542-3565(20)30590-5.
- 18) Shimakawa Y, Ndow G, Njie R, et al. Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg): an alternative to HBV DNA to assess treatment eligibility in Africa. *Clin Infect Dis.* 2020;70:1442-1452.
- 19) Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA.* 2006;295:65-73.
- 20) Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al. Impact of hepatitis B core-related antigen on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients treated with nucleos(t)ide analogues. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;49:457-471.
- 21) Inoue T, Tanaka Y. Novel biomarkers for the management of chronic hepatitis B. *Clinical and molecular hepatology.* 2020;26:261-279.
- 22) Tada T, Kumada T, Toyoda H, et al. HBcrAg predicts hepatocellular carcinoma development: An analysis using time-dependent receiver operating characteristics. *J Hepatol.* 2016;65:48-56.
- 23) Tseng TC, Liu CJ, Hsu CY, et al. High Level of Hepatitis B Core-Related Antigen Associated With Increased Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Chronic HBV Infection of Intermediate Viral Load. *Gastroenterology.* 2019;157:1518-1529. e3.
- 24) Jung KS, Park JY, Chon YE, et al. Clinical outcomes and predictors for relapse after cessation of oral antiviral treatment in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol.* 2016;51:830-839.
- 25) Honda M, Shirasaki T, Terashima T, et al. Hepatitis B Virus (HBV) Core-Related Antigen During Nucleos(t)ide Analog Therapy Is Related to Intrahepatic HBV Replication and Development of Hepatocellular Carcinoma. *J Infect Dis.* 2016;213:1096-1106.
- 26) Cheung KS, Seto WK, Wong DK, et al. Relationship between HBsAg, HBcrAg and hepatocellular carcinoma in patients with undetectable HBV DNA under nucleos(t)ide therapy. *J Viral Hepat.* 2017;24:654-661.
- 27) Suzuki Y, Maekawa S, Komatsu N, et al. Hepatitis B virus (HBV)-infected patients with low hepatitis B surface antigen and high hepatitis B core-related antigen titers have a high risk of HBV-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2019;49:51-63.
- 28) Lee TY, Lin JT, Zeng YS, et al. Association between nucleos(t)ide analog and tumor recurrence in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Hepatology.* 2016;63:1517-1527.
- 29) Zhou HY, Luo Y, Chen WD, et al. Hepatitis B virus mutation may play a role in hepatocellular carcinoma recurrence: A systematic review and meta-regression analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015;30:977-983.
- 30) Urabe A, Imamura M, Tsuge M, et al. The relationship between HBcrAg and HBV reinfection in HBV related post-liver transplantation patients. *J Gastroenterol.* 2017;52:366-375.
- 31) Chen S, Jia J, Gao Y, et al. Clinical evaluation of hepatitis B core-related antigen in chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma patients. *Clin Chim Acta.* 2018;486:237-244.
- 32) Inoue T, Baudi I, Tanaka Y. Novel Biomarkers of Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma: Clinical Significance of HBcrAg and M2BPGi. *Int J Mol Sci.* 2020;21.
- 33) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, et al. A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep.* 2013;3:1065.
- 34) Narimatsu H. Development of M2BPGi: a novel fibrosis serum glyco-biomarker for chronic hepatitis/cirrhosis diagnostics. *Expert review of proteomics.* 2015;12:683-693.
- 35) Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, et al. A novel serum marker, glycosylated *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA(+)-M2BP), for assessing liver fibrosis. *J Gastroenterol.* 2015;50:76-84.
- 36) Sato S, Genda T, Ichida T, et al. Prediction of Hepatocellular Carcinoma Development after Hepatitis C Virus Eradication Using Serum *Wisteria floribunda* Agglutinin-Positive Mac-2-Binding Protein. *Int J Mol Sci.* 2016;17.
- 37) Zou X, Zhu MY, Yu DM, et al. Serum WFA(+)-M2BP levels for evaluation of early stages of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Liver Int.* 2017;37:35-44.
- 38) Abe M, Miyake T, Kuno A, et al. Association between *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2015;50:776-84.
- 39) Yamada N, Sanada Y, Tashiro M, et al. Serum Mac-2 binding protein glycosylation isomer predicts grade F4 liver fibrosis in patients with biliary atresia. *J Gastroenterol.* 2017;52:245-52.
- 40) Chuaypen N, Chittmittraprap S, Pinjaroen N, et al.

- Serum *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein level as a diagnostic marker of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2018;48:872-881.
- 41) Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, et al. Elevated serum levels of *Wisteria floribunda* agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology.* 2014;60:1563-1570.
 - 42) Kawanaka M, Tomiyama Y, Hyogo H, et al. *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein predicts the development of hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2018;48:521-528.
 - 43) Kim SU, Heo JY, Kim BK, et al. *Wisteria floribunda* agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predicts the risk of HBV-related liver cancer development. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver.* 2017;37:879-887.
 - 44) Mak LY, To WP, Fung J, et al. Serum Mac-2 binding protein glycosylation isomer level predicts hepatocellular carcinoma development in E-negative chronic hepatitis B patients. *World Journal of Gastroenterology.* 2019;25:1398-1408.
 - 45) Hsu YC, Jun T, Huang YT, et al. Serum M2BPGi level and risk of hepatocellular carcinoma after oral anti-viral therapy in patients with chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;48:1128-1137.
 - 46) Shinkai N, Nojima M, Iio E, et al. High levels of serum Mac-2-binding protein glycosylation isomer (M2BPGi) predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis B patients treated with nucleot(s)ide analogues. *J Gastroenterol.* 2018;53:883-889.
 - 47) Kim HS, Kim SU, Kim BK, et al. Serum *Wisteria floribunda* agglutinin-positive human Mac-2 binding protein level predicts recurrence of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after curative resection. *Clinical and molecular hepatology.* 2020;26:33-44.
 - 48) Ichikawa Y, Joshita S, Umemura T, et al. Serum *Wisteria floribunda* agglutinin-positive human Mac-2 binding protein may predict liver fibrosis and progression to hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res.* 2017;47:226-233.
 - 49) Heimbach JK. Overview of the Updated AASLD Guidelines for the Management of HCC. *Gastroenterol Hepatol.* 2017;13:751-753.
 - 50) Aghemo A. Update on HCC Management and Review of the New EASL Guidelines. *Gastroenterol Hepatol.* 2018;14:384-386.
 - 51) Toyoda H, Kumada T, Tada T, et al. Tumor Markers for Hepatocellular Carcinoma: Simple and Significant Predictors of Outcome in Patients with HCC. *Liver cancer.* 2015;4:126-136.
 - 52) Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, et al. Significance of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy. *Ann Surg Oncol.* 2009;16:2795-2804.
 - 53) Witz I, G. Hermann G, M. Pikovski M, et al. The Antigenic Composition of Tumours, Sera and Urines of Tumour-Bearing Mice and the Partial Purification of Two Antigens Present in Increased Amounts. *Br J Cancer.* 1964;18:397-406.
 - 54) Ayoub WS, Steggerda J, Yang JD, et al. Current status of hepatocellular carcinoma detection: screening strategies and novel biomarkers. *Ther Adv Med Oncol.* 2019;11:1758835919869120.
 - 55) Reichl P, Mikulits W. Accuracy of novel diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma: An update for clinicians. *Oncol Rep.* 2016;36:613-625.
 - 56) Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, et al. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2015;21:10573-10583.
 - 57) Marrero JA, Feng Z, Wang Y, et al. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2009;137:110-118.
 - 58) Toyoda H, Kumada T, Tada T. Highly sensitive Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein: a new tool for the management of hepatocellular carcinoma. *Oncology.* 2011;81 Suppl 1:61-65.
 - 59) Kobayashi M, Hosaka T, Ikeda K, et al. Highly sensitive AFP-L3% assay is useful for predicting recurrence of hepatocellular carcinoma after curative treatment pre- and postoperatively. *Hepatol Res.* 2011;41:1036-1045.
 - 60) Carr BI, Kanke F, Wise M, et al. Clinical evaluation of lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in histologically proven hepatocellular carcinoma in the United States. *Dig Dis Sci.* 2007;52:776-782.
 - 61) Pote N, Cauchy F, Albuquerque M, et al. Performance of PIVKA-II for early hepatocellular carcinoma diagnosis and prediction of microvascular invasion. *J Hepatol.* 2015;62:848-854.
 - 62) Chen J, Wu G, Li Y. Evaluation of Serum Des-Gamma-Carboxy Prothrombin for the Diagnosis of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *Dis Markers.* 2018;2018:8906023.
 - 63) Koike Y, Shiratori Y, Sato S, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients. *Cancer.* 2001;91:561-569.

- 64) Yamashita Y, Tsujita E, Takeishi K, et al. Predictors for microinvasion of small hepatocellular carcinoma ≤ 2 cm. *Ann Surg Oncol.* 2012;19:2027-2034.
- 65) Lok AS, Sterling RK, Everhart JE, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2010;138:493-502.
- 66) Chen H, Zhang Y, Li S, et al. Direct comparison of five serum biomarkers in early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2018;10:1947-1958.
- 67) Kokudo N, Takemura N, Hasegawa K, et al. Clinical practice guidelines for hepatocellular carcinoma: The Japan Society of Hepatology 2017 (4th JSH-HCC guidelines) 2019 update. *Hepatol Res.* 2019;49:1109-1113.

尿路感染症診療におけるフローサイトメトリー方式全自動尿中有形成分分析装置の有用性

Usefulness of a Flow Cytometry Type Full-automatic Urine Component Analyzer in Clinical Practice for the Urinary Tract Infection

服部琴ノ 高橋安実 金城和美 又吉和哉 上地幸平 前田士郎

Abstract To evaluate the clinical usefulness of a flow cytometry (FCM) type full-automatic urine component analyzer, we compared the results obtained from a FCM type full-automatic urine component analyzer with those obtained from a microscopic examination for urinary sediment, or microbial identification using bacterial culture samples.

We examined urine samples with leukocyte counts 5-9 / HPF or higher, and obtained the information for Gram stainabilities, leukocyte counts, squamous cell counts by using the FCM type full-automatic urine component analyzer (UF-5000®, Sysmex). Then, results were compared with those of bacterial identification by mass spectrometry using urine culture samples, or of microscopic examination for urinary sediment.

The concordance rate of Gram staining results estimated by UF-5000® (BACT-info) with the results of the bacterial identification was 73% and 93% for perfect concordance and partial concordance, respectively. The correct answer rates of BACT-info were 54% and 90% for Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria, respectively. We observed high concordance rates between the results of UF-5000® and microscopic examination for urinary sediment, 91% for white blood cell counts and 99% for squamous cell counts, within one category difference.

These results suggest that FCM type full-automatic urine component analyzer is useful for the management of UTI.

Key words Urinary tract infection (UTI), Flow cytometry type full-automatic urine component analyzer, Gram-stain, Microscopic examination for urinary sediment

1. はじめに

尿路感染症 (urinary tract infection: UTI) は頻度の高い感染症の一つであり、適切な治療のためには迅速な診断が求められる¹⁾。

UTIの診断ステップとして、患者背景や排尿痛などの臨床所見から感染症を疑い、尿一般検査にて膿尿の存在を確認し、細菌検査にてグラム染色の実施、起因菌の同定・

薬剤感受性検査を実施することが必要である。尿一般検査における膿尿の判定は尿沈渣法にて400倍1視野あたり5個以上の白血球 (≧5個/HPF)を確認すること、または非遠心尿の計算盤鏡検や尿中有形成分分析装置で1μL中に10個以上の白血球を認めること²⁾とされている。尿沈渣検査は尿定性検査後に遠心分離を経て上清の除去、尿沈渣標本作製、続いて沈渣成分の鏡検となっており、鏡検終了まで1検体あたり10分以上を要することが多

Received May. 19, 2020; Accepted Jul. 20, 2020
Kotono HATTORI, Ami TAKAHASHI, Kazumi KINJO, Kazuya MATAYOSHI, Kohei UECHI, Shiro MAEDA
琉球大学病院 検査・輸血部
〒903-0215 中頭郡西原町字上原207番地
Department of Clinical Laboratory and Blood

transfusion, University of the Ryukyus Hospital
207 Uehara, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa
903-0215, Japan
Corresponding author : 前田士郎
TEL : 098-895-3331 (内線 : 1315)
E-mail : smaeda@med.u-ryukyu.ac.jp

い。細菌検査におけるグラム染色は染色から鏡検まで約5分と短時間で実施可能であるが、多くの検体の処理をしなければならない日常業務のなかで、すべての検体を1検体ごとに染色から鏡検、即時報告することは容易ではない。

フローサイトメトリー（Flowcytometry：FCM）法を原理とした全自動尿中有形成成分分析装置は、非遠心尿中の赤血球、白血球、上皮細胞、円柱や細菌を定量的に測定する装置である。また、細菌の定量測定時に表示されるスキャットグラムのドット分布パターンを装置内で解析し、グラム染色性の推定を行うことが可能とされている。グラム陽性菌と陰性菌を前方散乱光と側方蛍光を用いて細胞壁構造の違いから判定しており、グラム陽性菌のみ、または陰性菌のみといった単一染色性を示す場合だけでなく、グラム陽性菌・陰性菌が混在している場合も判定可能であるため、尿路感染症の早期診断に有用であると考えられる。今回、尿中有形成成分分析情報と直接鏡検による尿沈渣結果および細菌培養結果と比較し、感染症診療におけるFCM方式全自動尿中有形成成分分析装置の有用性を検討したので報告する。

2. 材料および方法

1) 対象

2018年5月から2019年4月までに当院 検査・輸血部 一般検査室に提出された尿検体のうち、尿沈渣検査にて白血球数が5-9個/HPF以上かつFCM方式全自動尿中有形成成分分析装置にてグラム染色性が判定できた94件を対象とし

た。FCM方式全自動尿中有形成成分分析装置はUF-5000®（シスメックス社）を使用した。UF-5000®では細菌の定量測定時に表示されるスキャットグラムからグラム染色性を判定し、推定された尿中細菌グラム染色情報（BACT-Info）が他の有形成成分項目と同時に約3分で表示される。スキャットグラムの典型例をFig. 1に示す。今回、BACT-Infoで分類不能であった検体は除外した。

2) 尿沈渣検査

尿沈渣検査は随時尿10 mLを「尿沈渣検査法2010」に基づき、500 G、5分間で遠心分離後、尿沈渣標本を作製し、顕微鏡で400倍1視野あたりの白血球数と扁平上皮細胞数の計測を行った。

3) 菌種同定検査

尿検体は トリプチケースソイ5% ヒツジ血液寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に塗布し、35℃、大気条件下にて18時間培養した。菌種同定は発育した菌集落から直接ターゲットプレートに塗布後、VITEK® MS CHCA を1μL 添加し、質量分析装置（VITEK® MS, ビオメリュー・ジャパン）にて行った。

4) 比較項目

- (1) UF-5000®と尿沈渣検査における白血球数および扁平上皮細胞数について比較検討した。
- (2) UF-5000®におけるBACT-Infoのグラム染色性と菌種同定結果を比較検討した。本研究は琉球大学人を対象とする医学系研究倫理審査委員会の承認を得たプロトコールにより行った。（承認番号：1530）

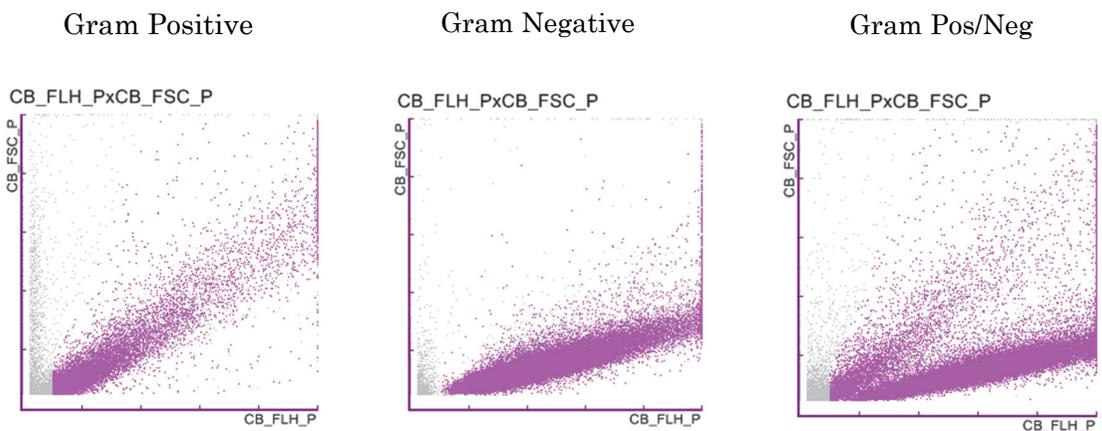


Fig. 1 Representative scattergrams for Gram-positive, Gram-negative and Gram-positive/negative estimated by UF5000®.

3. 成績

1) UF-5000®と尿沈渣検査との比較

対象検体94件におけるUF-5000®と尿沈渣鏡検法との一致率は、白血球数では完全一致率56% (53件), ±1ランク差での一致率35% (33件) であり, ±1ランク差以内の一致率は91% (86件) であった (Table 1)。扁平上皮細胞数では完全一致率33% (31件), ±1ランク差での一致率が66% (62件) で±1ランク差以内の一致率は99% (93件) であった (Table 2)。

2) BACT-Info.のグラム染色性結果と培養法にて発育した菌種のグラム染色性との比較

BACT-Info.と培養法にて発育した菌種のグラム染色性との一致率と正答率をTable 3に示す。94件中、菌集落の発育を認めなかった8件 (BACT-Info.: Gram Positive 8件)を除く86件のグラム染色性の一致率は73% (63件), 複数菌種検出された検体での部分一致率が20% (17件), 不一致率は7% (6件) であった。グラム陽性菌では94% (16件中15件), 陰性菌では78% (49件中38件), 陽性・陰性混合検体では48% (21件中10件) が完全一致となっていた。BACT-Info.の染色性別正答率は、Gram Positiveが54% (28件中15件), Gram Negativeが90% (42件中38件), Gram Pos/Negが63% (16件中10件) であった。

BACT-Info.と尿培養同定における菌種別のグラム染色性一致率をTable 4に示す。単一菌種が検出された検

体56件においては、グラム陽性菌の一致率は100% (13件中13件), グラム陰性菌の一致率は74% (43件中32件) であり, 全体では80% (56件中45件) であった。

培養検査にて複数菌種が分離された30検体のうちグラム陽性菌のみ, もしくは陰性菌のみが複数分離されたのは8件 (Table 5) で, これらのグラム染色性はすべて完全一致していた。グラム陽性菌と陰性菌が混在していた検体のうち10件はBACT-Info.でもグラム陽性・陰性菌混合と判定されていた (Table 6)。残る12件はBACT-Info.ではグラム陽性菌もしくは陰性菌のみと判定されていた (Table 7)。培養検査にて複数菌種が分離された検体においてはBACT-Info.のグラム染色性が一致した検体は60% (30件中18件) であった。

4. 考察

UF-5000®のBACT-Info. でグラム陰性菌と判定された場合の正答率は90%と良好であった。河村ら³⁾の報告においてもUF-5000®がグラム陰性と判定した場合的中率は93.9%と報告されており, UTIの主な起因菌は*Escherichia coli*をはじめとするグラム陰性菌である事より, BACT-Info.は適切な抗菌薬選択の一助になり得ると考えられた。

また, 白血球と扁平上皮細胞についても ±1ランク差以内での一致率はそれぞれ91%, 99%と良好であった。尿中白血球数はUTI診断において膿尿の指標として用いられており, 尿沈渣検査にて5個/HPF以上の白

Table 1 Comparison for results of white blood cell counts between FCM type full-automatic urine component analyzer and Microscopic examination for urinary sediment.

Number of complete concordance, concordance with one category difference and dis-concordance are indicated in dark gray, gray and light gray columns, respectively (n = 94)

WBC counts (FCM type full-automatic urine component analyzer)	≥100									2		3	27		
	50-99									1		4	1		
	40-49									3	5	5			
	30-39									2	3	5			
	20-29									2	8	4	2	2	
	10-19										1	2			
	5-9										5	2			
	1-4											4	1		
	<1														
		<1	1-4	5-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-99	≥100	n=94				
WBC counts (Microscopic examination for urinary sediment.)															

Table 2 Comparison for results of squamous cell counts between FCM type full-automatic urine component analyzer and Microscopic examination for urinary sediment.

Number of complete concordance, concordance with one category difference and dis-concordance are indicated in dark gray, gray and light gray columns, respectively (n = 94)

Squamous cell counts (FCM type full-automatic urine component analyzer)	≥100													
	50-99													
	40-49													
	30-39													
	20-29													
	10-19											1		
	5-9										1	3	5	
	1-4										2	15	12	1
	<1										13	41		
		<1	1-4	5-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-99	≥100	n=94			
Squamous cell counts (Microscopic examination for urinary sediment.)														

Table 3 Comparison between the results of BACT-info and bacterial identification by mass spectrometry using urine culture samples.

Mass spectrometry	BACT-Info.				Total	Concordance rate
	Gram Positive	Gram Negative	Gram Pos/Neg			
Gram Positive	15	0	1	16	94%	
Gram Negative	6	38	5	49	78%	
Gram Pos/Neg	7	4	10	21	48%	
Total	28	42	16	86		
Correct answer rate	54%	90%	63%			

* BACT-Info. The information of Gram stainability obtained from the FCM type full-automatic urine component analyzer.

Table 4 Comparison between the results of BACT-info and bacterial identification by mass spectrometry using urine culture samples with single isolates. GP, Gram positive, GN, Gram negative, CNS: Coagulase Negative Staphylococci

Bacterial species identified by mass spectrometry	n	BACT-Info.			Concordance rate (%)
		GP	GN	GP/GN	
<i>E. faecalis</i>	4	4			100
<i>S. agalactiae</i>	4	4			100
CNS*	5	5			100
<i>E. coli</i>	29	2	23	4	79
<i>K. pneumoniae</i>	7	2	4	1	57
<i>P. aeruginosa</i>	1		1		100
<i>P. mirabilis</i>	4	2	2		50
<i>S. marcescens</i>	1		1		100
<i>A. baumannii</i>	1		1		100

* BACT-Info. The information of Gram stainability obtained from the FCM type full-automatic urine component analyzer.

Table 5 Results of BACT-info, which is completely matched with those of bacterial identification by mass spectrometry using urine culture samples with two or more isolates (only GP or GN).

GP, Gram positive, GN, Gram negative

Bacterial species identified by mass spectrometry	n	BACT-Info.	
		GP	GN
<i>S. mitis, S. oralis</i>	1	1	
<i>S. aureus, S. agalactiae</i>	1	1	
<i>C. koseri, P. aeruginosa</i>	1		1
<i>E. coli, C. koseri</i>	1		1
<i>K. pneumoniae, M. morgani</i>	1		1
<i>P. aeruginosa, C. freundii</i>	1		1
<i>Myroides spp.</i>	1		1
<i>Alcaligenes faecalis spp faecalis</i>	1		1
<i>E. coli, K. oxytoca</i>	1		1

* BACT-Info. The information of Gram stainability obtained from the FCM type full-automatic urine component analyzer.

Table 6 Results of BACT-info, which is completely matched with those of bacterial identification by mass spectrometry using urine culture samples with two or more isolates.

GP, Gram positive, GN, Gram negative

Bacterial species identified by mass spectrometry	n	n=10 BACT-Info.	
		GP/GN	
GPR, <i>E. coli</i> , Other 3 strains	1	1	
<i>G. sanguinis</i> , <i>E. coli</i>	1	1	
<i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , Other 1 strains	1	1	
<i>E. faecalis</i> , <i>K. oxytoca</i>	1	1	
<i>E. faecium</i> , <i>P. aeruginosa</i>	1	1	
<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	1	1	
<i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , Other 1 strains	1	1	
<i>E. faecalis</i> , <i>S. marcescens</i> , Other 1 strains	1	1	
<i>E. faecalis</i> , <i>M. morgani</i> , Other 1 strains	1	1	
<i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i>	1	1	

* BACT-Info. The information of Gram stainability obtained from the FCM type full-automatic urine component analyzer.

Table 7 Results of BACT-info, which is partially matched with those of bacterial identification by mass spectrometry using urine culture samples with two or more isolates.

Bacterial species identified by mass spectrometry	n	n=12 BACT-Info.		
		GP	GN	GP/GN
CNS, <i>P. mirabilis</i> , Other 1 strains	1	1		
GPR, <i>E. coli</i>	2	2		
<i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i> , Other 1 strains	2	1	1	
<i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i>	1	1		
<i>Bacillus</i> species, <i>E. coli</i>	1		1	
<i>S. agalactiae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , Other 1 strains	1	1		
<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , Other 1 strains	1		1	
<i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , Other 4 strains	1		1	
<i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i>	1	1		
<i>E. faecium</i> , <i>Enterococcus</i> species	1			1

* BACT-Info. The information of Gram stainability obtained from the FCM type full-automatic urine component analyzer.

血球が認められる場合は有意の膿尿と判定される。UF-5000®を用いて白血球数を測定するとともにBACT-Infoによるグラム染色性の判定を報告することはUTI診療に寄与できるものと考えられた。

扁平上皮細胞は尿道炎やカテーテル挿入などによる機械的損傷後、エストロゲン治療中などの場合に多く尿中に出現する。また、尿路系に異常がない場合でも女性では外陰部または膣由来の扁平上皮細胞が赤血球や白血球、細菌とともに混入しやすい⁵⁾。そのため、女性で尿中に白血球または細菌が検出され、同時に扁平上皮細胞数が多い場合はコンタミネーションの可能性が示唆され

る。BACT-Info.とあわせて白血球数、扁平上皮細胞数を同時に報告することは、UTI診療の補助となり得るだけでなく、必要のない尿培養検査の省略にも繋がると思われる。

一方、今回の検討にてBACT-Info.と培養同定結果が不一致となった検体が6件確認されたが、これらはすべてBACT-Info.にてグラム陽性と判定され、培養同定ではグラム陰性菌が検出されていた。 β -lactam系抗菌薬が投与されていた場合、グラム陰性桿菌がフィラメント化し、スキヤットグラムの角度が高くなることが示唆されていることから⁴⁾抗菌薬の投与が判定に影響した可能

性も考えられるが、今回の検討で抗菌薬の投与が確認できたのは1検体のみであった。抗菌薬の投与が確認できなかった5件について、スキヤッタグラムを参照したところ、3件はドットがスキヤッタグラム上に幅広く分布していたため、ドット分布の拡散がBACT-Info.の判定に影響を及ぼしたのではないかと推測される。残る2件のドット分布の角度は30度付近であった。村谷ら⁴⁾の報告では、スキヤッタグラムの角度が30度未満であればグラム陰性桿菌である確率が89.2%と高く、30度以上の角度でグラム陽性菌のみが分離された検体は83.3%であったとされている。今回不一致となった2件ともドット分布の角度は30度以上35度以下とカットオフ値付近であり、さらに、うち1件は菌量が919/μLで定性値が1+以下(100/μL~1000/μL)と少なかったため、培養同定結果と一致しなかったと考えられる。また、嫌気性グラム陽性菌と少量のグラム陰性菌が混在し、嫌気性菌のみ尿培養検査で発育しなかった可能性もあるが、今回嫌気性菌を対象とした培養を行っていないため、詳細は不明である。

今回の検討において菌集落の発育がみられなかった8検体の菌量をUF-5000[®]により測定したところ214.4/μL~3566.3/μLの範囲であった。このうち5検体の菌量は214.4/μL~776.8/μLの範囲であり、定性値1+以下(100/μL~1000/μL)であったため、菌集落の発育がみられなかったと考えられた。菌量が1000/μL以上(定性値2+以上)にもかかわらず発育がみられなかった3検体については、1件で抗菌薬投与がなされており、この1件については抗菌薬投与による影響が考えられた。他2件では抗菌薬投与は確認できなかった事から、細菌が何らかの要因ですでに死滅していた、あるいはUF-5000[®]で細菌以外の他の有形成分を細菌と誤判定した、BACT-Info.で検出された菌が嫌気性菌であった等の理由が考えられた。

本研究においては、以下のような点が課題として考えられる。まず、解析数が94件と十分でない事、および尿沈渣検査で白血球数が5-9個/HPF以上の検体、BACT-Info.で判定結果が得られた検体のみを対象とし

ている事、検体採取から検査までの経過時間を考慮していない事、さらにBACT-Info.の結果が実際に適正な抗生剤選択に貢献しうるのかが不明である事などである。今後、これらの点について更なる検討が必要と考えられる。

今回の測定では除外しているが、FCM方式全自動尿中有形成分分析装置では強度の血尿や混濁の強い尿の測定は困難とされており、測定の際には注意が必要である。

5. 結論

UTIの起因菌推定にFCM方式全自動尿中有形成分分析装置は有用であると考えられる。

6. コメント

本論文の要旨は、日本臨床検査自動化学会第51回大会(2019年10月、神奈川)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) 松本哲郎:「尿路感染症における診断・治療の標準化」, 臨床検査, 2007;51:137-141.
- 2) 青木大輔, 他: 尿路感染症, 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 検査値アプローチ/症候/疾患, 第1版, 一般社団法人 日本臨床検査医学会; 東京, 2015;339-342.
- 3) 河村佳江, 他: 全自動尿中有形成分分析装置UF-5000による尿中グラム陽性菌/陰性菌弁別判定の評価, 医学検査, 2017;66:516-523.
- 4) 村谷哲郎, 他: 尿路感染症患者由来尿を用いた全自動尿中有形成分分析装置UF-1000iによる細菌種推定の可能性の検討, Sysmex Journal Web, 2010;11:1-10.
- 5) 日本臨床衛生検査技師会: 尿沈渣検査法2010, 第1版, 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会; 東京, 2011;21-22.

肺炎患者における血中プロカルシトニン測定の有用性についての検討

Usefulness of Blood Procalcitonin Measurement in Patients with Pneumonia

角野忠昭 石山 進 小林雅子

Abstract Procalcitonin (PCT) is a biomarker mainly used to diagnose sepsis and determine severity, and its usefulness has been reported in the community - acquired pneumonia, while reports of non-bacterial pneumonia are still few, and this time, the usefulness of PCT measurements in active pulmonary tuberculosis, old-term pulmonary tuberculosis, nontuberculosis mycobacteriosis, and interstitial pneumonia was compared with bacterial pneumonia. As a result, in these pneumonias, PCT values were significantly lower ($p < 0.05$) and useful for differentiation of bacterial pneumonia. In PCT positive cases, the mortality rate was significantly higher than in negative cases.

Key words procalcitonin, pneumonia, tuberculosis, nontuberculous mycobacteriosis, interstitial pneumonia, inflammatory markers.

1. はじめに

プロカルシトニン (Procalcitonin : PCT) は、カルシトニンの前駆体として甲状腺C細胞で合成されるアミノ酸116個よりなる分子量約13kDaのペプチドである。重症細菌感染症において、TNF- α などの炎症性サイトカインが誘導され、その刺激を受け全身の臓器でPCTが産生され、血液中に分泌される。一方、ウイルス感染や非感染性疾患では、PCT値が上昇しても軽微にとどまることから、PCTは敗血症の診断や重症度判定に用いられている¹⁾。肺疾患においては、市中肺炎患者で、pneumonia severity index (PSI)が高い患者群でPCTが高値となる報告や²⁾、肺炎治療前のPCT値がPSIと同程度に生命予後予測に有用であるとの報告がある³⁾。これらのことから、PCTは市中肺炎における重症度判定や予後予測因子として利用可能なバイオマーカーと言える。一方、肺結核、非結核性抗酸菌症、或いは間質性肺炎などの非細菌性肺炎におけるPCTの報告は未だ少ない。

肺炎はその原因によって治療法も異なり、症状、画像検査、微生物学的検査及び血液検査などをあわせて診断するが、鑑別に苦慮する例もしばしば経験する。PCT測

定もこれらの鑑別に利用できれば、早期診断、早期治療へと繋げることが可能となる。そこで今回、各種肺炎におけるPCT測定の意義・有用性について、特に細菌性肺炎との鑑別や、重症度判定、予後予測因子について検討を行ったので報告する。

2. 対象と方法

1) 対象

2018年8月から2019年6月まで期間、金沢市立病院を受診した肺炎患者296例(肺結核37例、陈旧性肺結核12例、非結核性抗酸菌症77例、間質性肺炎42例、細菌性肺炎128例)を対象とした(Table 1)。Normal controlとして健常者5例も合わせて検討した。なお、本研究は金沢市立病院倫理委員会の承認を得て実施した。

2) 方法

各肺炎患者の血清検体を用いて、PCT (ADVIA Centaur PCT, SIEMENS)、CRP (デンカ)及び白血球数 (XE-2100, SYSMEX)を測定し、各肺炎と細菌性肺炎で陽性率を比較検討した。尚、PCTは0.4ng/ml以上、CRPは0.5mg/dL以上を陽性とし、白血球数は8500個/ μ L以上を高値とした。また、各症例における

Received May. 8, 2020; Accepted Jul. 29, 2020
Tadaaki KADONO, Susumu ISHIYAMA, Masako KOBAYASHI
金沢市立病院中央診療部臨床検査室
Central Clinical Laboratories, Kanazawa municipal hospital

〒921-8104 石川県金沢市平和町3-7-3
3-7-3, Heiwa, Kanazawa-shi, Ishikawa, 〒921-0814, Japan
Corresponding author : 角野忠昭
TEL : 076-245-2612 (金沢市立病院臨床検査室直通)
E-mail : kadono.ta@kanazawa-cityhosp.jp

Table 1 Comparison of inflammatory marker positive rates for bacterial pneumonia.

症例	炎症マーカー陽性数 (率)					
	PCT 陽性 ^{*1}	p value	CRP 陽性 ^{*2}	p value	白血球数増加 ^{*3}	p value
活動性肺結核 37 例	2 ^{*4} /37 (5.4%)	0.017	25/37 (67.6%)	0.031	5/37 (13.2%)	0.002
陳旧性肺結核 12 例	1 ^{*5} /12 (8.3%)	0.465	9/12 (75.0%)	0.626	2/12 (16.7%)	0.510
非結核性抗酸菌症 77 例	1 ^{*6} /77 (1.3%)	<0.001	34/77 (44.7%)	<0.001	6/77 (7.9%)	<0.001
間質性肺炎 42 例	3 ^{*7} /42 (7.1%)	0.011	15/42 (35.7%)	<0.001	9/42 (22.0%)	<0.001
細菌性肺炎 128 例	32/128 (25.0%) *		107/128 (83.6%) *		39/128 (30.2%) *	
健常者 5 例	0/5 (0.0%)	<0.001	0/5 (0.0%)	<0.01	0/5 (0.0%)	<0.001
計 296 例	39/296 (23.6%)		190/296 (64.2%)		61/296 (20.6%)	

*1 PCT \geq 0.4ng/mL*2 CRP \geq 0.5mg/dL*3 白血球数 \geq 8500/ μ L

*4 粟粒結核, MDS 合併

*5*6 敗血症合併

*7 敗血症, 劇症肝炎合併

Table 2 Inflammatory markers in acute exacerbation of interstitial pneumonia and interstitial pneumonia complicated by bacterial pneumonia.

	PCT 陽性	CRP 陽性	WBC 増加
間質性肺炎急性増悪 2 例	0/2 (0%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)
細菌性肺炎合併 5 例	2/5 (40%)	5/5 (100%)	2/5 (40%)

合併症についても、電子カルテで調査した。さらに、検査後1か月以内の死亡率も調査し、予後との関連性についても比較検討した。統計学的には、Fisherの χ^2 検定を用いて検討した (IBM SPSS statistics Ver19, IBM)。

3. 結果

1) PCT 陽性率

各肺炎における PCT 陽性率は、活動性肺結核 5.4%、陳旧性肺結核 8.3%、非結核性抗酸菌症 1.3%、間質性肺炎 7.1% と非常に低値を示したのに対し、細菌性肺炎では 25% と、陳旧性肺結核を除いた他の肺炎群と比較し有意に高値であった ($p < 0.05$) (Table 1)。

また、細菌性肺炎以外での PCT 陽性例は、いずれも重篤な合併症を有していた。肺結核の 2 例はそれぞれ粟粒結核と骨髓異形成症候群 (MDS, RAEB) を合併し、陳旧性肺結核と非結核性抗酸菌症の PCT 陽性例はいずれも尿路感染症から敗血症に至り、重篤な病態であった。間質性肺炎の 3 例中 2 例も尿路感染症から敗血症に至った例であり、残りの 1 例は劇症肝炎を合併していた。

2) CRP, 白血球数

細菌性肺炎においては、CRP は、肺結核、非結核性抗酸菌症、間質性肺炎と比較し有意に高く ($p < 0.05$)、白血球数では、肺結核、非結核性抗酸菌症と比較し有意に高かった ($p < 0.05$)。

尚、健常者 5 例においては、いずれの炎症性マーカーにおいても陰性を確認した。

3) 間質性肺炎における急性増悪と細菌性肺炎合併の鑑別

今回の間質性肺炎例において、間質性肺炎の急性増悪か、或いは間質性肺炎に細菌性肺炎が合併したのか、臨床的に鑑別を要する例が 7 例あった (Table 2)。各種検査の結果、7 例中 2 例は間質性肺炎の急性増悪で、5 例は細菌性肺炎合併例であった。間質性肺炎急性増悪の患者 2 例はいずれも PCT 陰性であったが、細菌性肺炎合併例 5 例中 2 例は PCT 陽性であった。これに対し、CRP や白血球数は、両者で特別な傾向を示さなかった。

4) 結核と細菌性肺炎の鑑別

陳旧性肺結核における結核再燃か、陳旧性肺結核に細菌性肺炎を合併したか、臨床的に鑑別を要する例も 5 例あった (Table 3)。5 例中 4 例が結核再燃で、1 例が細菌性肺炎合併例であった。結核再燃例は 4 例中粟粒結核の 1 例のみが PCT 陽性で、3 例が PCT 陰性であり、細菌性肺炎 1 例は PCT 陽性であった。CRP、白血球数は結核再燃と肺炎合併で特別な傾向は認められなかった。

5) 検査後 1 か月以内の死亡率

肺炎全体における PCT 陽性患者の 1 か月以内の死亡率は 23.1% であり、PCT 陰性患者の 4.3% と比較し有意に高かった ($p < 0.05$) (Table 4)。

Table 3 Comparison of inflammatory markers in patients with exacerbation of tuberculosis with old tuberculosis complicated by bacterial pneumonia.

	PCT 陽性	CRP 陽性	WBC 増加
結核再燃 4例	1*/4 (25%)	4/4 (100%)	3/4 (75%)
細菌性肺炎合併 1例	1/1 (100%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)

*: 粟粒結核

Table 4 Comparison of breakdown of mortality within one month after testing for PCT positive patient and negative patient.

症例	死亡数 (率)	
	PCT 陽性	PCT 陰性
活動性肺結核	1/2 (50.0%)	2/35 (5.7%)
陳旧性肺結核	1/1 (100%)	0/11 (0.0%)
非結核性抗酸菌症	0/1 (0.0%)	0/76 (0.0%)
間質性肺炎	1/3 (33.3%)	2/39 (5.1%)
細菌性肺炎	6/32 (18.8%)	7/96 (7.3%)
健常者	0/0 (0.0%)	0/5 (0.0%)
計	9/39 (23.1%*)	11/257 (4.3%)

* $p < 0.05$

4. 考察

PCTは細菌感染で高値となるバイオマーカーで、敗血症の診断や、その重症度判定に広く用いられており、細菌感染で特異度が高い検査といわれている。今回の研究では、肺結核、非結核性抗酸菌症、間質性肺炎において、PCT値は細菌性肺炎より有意に低値を示し、陽性例はいずれも、細菌感染症や重篤な疾患を合併していた。一方、陽性率は低値であったが、陳旧性肺結核で陽性率に有意な差が認められなかったことについては、症例数が少なかったことが影響していると考えられた。以上より、細菌性肺炎以外の肺炎単独では、PCTが陽性となることは稀であり、PCT測定は細菌性肺炎との鑑別に有用であることが示された。倉田らの報告でも、PCT高値は一般細菌感染症の診断を裏付ける所見と考察しており⁶⁾、我々の結果と一致している。特に臨床的に鑑別が難しい、間質性肺炎の経過中に急性増悪した例と細菌性肺炎が合併した例の鑑別や、陳旧性肺結核患者の結核再燃と細菌性肺炎合併の鑑別にも、PCT測定が有用であると考えられる。尚、CRP、白血球数などの炎症マーカーは、これらで差はなかった。

PCT値と重症度については、市中肺炎患者では、重症度が高くなると、血清PCT値も上昇すると報告され

ている⁴⁾⁵⁾。倉田らの報告でも、PCT値は従来の炎症性マーカーと比較して、肺炎の重症度判定における信頼性の高いマーカーであると結論付けている⁶⁾。今回、我々の検討でも、細菌性肺炎以外の肺炎患者におけるPCT陽性例は、粟粒結核やMDSの合併例、尿路感染症から敗血症に至った例、劇症肝炎発症例など、いずれも重症例であった。以上のことから、細菌性肺炎以外の肺炎における経過中にPCT陽性が認められた場合は、細菌感染症や重症疾患が合併している可能性が高く、重篤な状態であることを示唆している。尚、CRP、白血球数などの炎症マーカーでは、重症度との関連性は認められなかった。

また、今回、全肺炎例において、PCT陽性例の1か月以内の死亡率は23.1%であり、陰性例4.3%と比較して有意に高かった。倉田らも、市中肺炎患者において、PCT陽性例の死亡率は有意に高いと報告している⁶⁾⁷⁾。以上より、肺炎の種類にかかわらず、PCT高値例は、死亡の危険性が高いことも合わせて考慮する必要がある。

5. 結語

各種肺炎患者におけるPCT測定の有用性について検討を行った。肺結核、陳旧性肺結核、非結核性抗酸菌症、および間質性肺炎で、PCTが陽性となる場合は稀であり、

細菌性肺炎との鑑別に有用である。また、いずれの肺炎においても、PCTが陽性となった場合は、細菌感染や重篤な疾患を合併している可能性が高く、死亡率も高いことを考慮する必要がある。以上のことから、肺炎患者におけるPCT測定は原因の鑑別や、重症度判定、予後予測に有用なマーカーであるといえる。

本文の要旨は、第51回日本臨床検査自動化学会にて発表した。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) 新井隆男, プロカルシトニン. モダンメディア, 2006;52 (12):384-388.
- 2) Muller B, Diagnostic and prognostic accuracy of clinical and laboratory parameters in community - acquired pneumonia. BMC Infect Dis, 2007;7:10.
- 3) Park JH, The Value of procalcitonin levels in community- acquired pneumonia in the ED. Am J Emerg Med, 2012;30:1248-1254.
- 4) Kruger S, Procalcitonin predicts patients at low risk of death from community acquired pneumonia across all CRB-65 classes. Eur Respir J, 2008;31: 349-355.
- 5) Hirakata Y, Comparison of usefulness of plasma procalcitonin and C- reactive protein measurements for estimation of severity in adults with community-acquired pneumonia. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008;61:170-174.
- 6) 倉田季代子, 呼吸器感染症の診断における血清プロカルシトニン定量の有用性. 日呼吸会誌, 2010;48 (9) :654-660.
- 7) 山本善裕, 各種肺炎におけるプロカルシトニン測定 の臨床的有用性の評価. 日呼吸誌, 2014;3 (1):50-55.

ALP・LD活性測定におけるIFCC法対応試薬の性能評価

Evaluation of IFCC Measurement Reagents for ALP and LD Activity Assay.

寺田 祥¹⁾ 正司浩規¹⁾ 傍島麻由¹⁾ 植田康樹¹⁾ 前田育宏¹⁾ 日高 洋²⁾

要旨 IFCC法対応試薬である「Lタイプワコー ALP IFCC」, 「Lタイプワコー LD-IF」〔富士フィルム和光純薬(株)〕の性能評価を行った。両試薬とも同時再現性, 日差再現性, 希釈直線性, 定量限界, 正確さは良好な結果であった。本法でのALP活性値はJSCC法と比較して約1/3となったが, LDではほぼ一致した活性値が得られた。ALPは小腸型, 胎盤型優位試料, LDはLD₅優位試料でJSCC法との相関から乖離を認めた。本試薬は共存物質の影響を受けにくく, 試薬安定性も良好であることから日常検査に十分有用と考えられた。

Key words Alkaline phosphatase (ALP), Lactate dehydrogenase (LD), IFCC, JSCC

1. はじめに

アルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase ; ALP, EC 3.1.3.1) は, 有機リン酸モノエステルを加水分解する酵素群のうちアルカリ側に至適pHをもつ酵素である。一般的に肝胆道系疾患や骨疾患の指標とされており, アイソザイムはALP₁(肝高分子型), ALP₂(肝型), ALP₃(骨型), ALP₄(胎盤型), ALP₅(小腸型), ALP₆(免疫グロブリン結合同型)に分けられる¹⁾。一方, 乳酸デヒドロゲナーゼ (Lactate dehydrogenase ; LD, EC 1.1.1.27) は, 補酵素の共役下でピルビン酸と乳酸の相互転換を触媒する酵素であり, 体内組織中に広く分布している。HとMの2種のサブユニットからなる4量体であり, 5種のアイソザイムLD₁(H₄), LD₂(H₃M₁), LD₃(H₂M₂), LD₄(H₁M₃), LD₅(M₄)に分けられる²⁾。

現在, 日本における血清ALP, LD活性測定法は, 99%以上の施設において日本臨床化学会 (JSCC) が提示したJSCC勧告法にトレーサブルなJSCC標準化対応試薬を用いているが³⁾, JSCC法に準じた測定値では国

際的な治験に使用できないことや, 診療ガイドラインや症例報告等における海外との相互利用が不便であることが問題であった。そこで近年, グローバルハーモナイゼーションの必要性が認識されるようになり, JSCCは2020年4月より1年間で準備の整った施設からALP, LD活性測定法を国際臨床化学連合 (IFCC) 法に変更する方針を固めた⁴⁾。

JSCC法はALP, LDとも各アイソザイムに対して反応性が均一な点の特徴であったが, IFCC法になると緩衝液の種類やpHが異なるため, さまざまな変更点が生じる。ALPにおいてはJSCC法の約1/3程度の活性値になるほか, 小腸型ALPとの反応性が抑えられるため, 臨床判断を惑わせるB, O型の分泌型における食後の小腸型ALP上昇が抑制されることが予想される⁵⁾。またLDにおいては活性値にほとんど差がないものの, 肝疾患患者等におけるLD₅優位試料で, JSCC法より活性値が低くなることが予想される⁶⁾。

そこで今回我々は, IFCC法対応試薬である「Lタイプワコー ALP IFCC」, 「Lタイプワコー LD-IF」の基礎

Received Mar. 2; Accepted Apr. 13, 2020
Shou TERADA¹⁾, Hiroki SHOJI¹⁾, Mayu SOBAJIMA¹⁾,
Yasuki UEDA¹⁾, Ikuhiro MAEDA¹⁾, Yoh HIDAKA²⁾
¹⁾大阪大学医学部附属病院 医療技術部 検査部門
Division of Clinical Laboratory, Department of Medical
Technology, Osaka University Medical Hospital
²⁾大阪大学医学部附属病院 臨床検査部

Development of Laboratory for Clinical Investigation,
Osaka University Medical Hospital
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15
2-15 Yamadaoka Suita shi, Osaka. 565-0871, Japan.
Corresponding author : 寺田祥
TEL : 06-6879-6664
E-mail : shou.terada@hp-lab.med.osaka-u.ac.jp

的性能評価およびJSCC法との相関性試験を行ったので報告する。

2. 対象および検討試薬・機器

1) 対象

対象検体は、大阪大学医学部附属病院を受診した患者血清の検査終了後の残余血清を用いた。なお、本検討は当院倫理委員会の承認（承認番号：19124）を得て実施した。

2) 試薬、測定機器および分析条件

検討試薬としてLタイプワコー ALP IFCC, Lタイプワコー LD-IFを用いた。JSCC標準化対応試薬には、Lタイプワコー ALP-J2, Lタイプワコー LD-Jを用いた。校正は指定の酵素キャリブレーターにて行った。コントロールには液状コントロール血清IワコーC&C（以下、Low-C）、液状コントロール血清IIワコーC&C（以下、High-C）を、直線性用高値試料にはリニアチェック Enzymeを用いた。〔すべて富士フイルム和光純薬（株）〕

測定機器は自動分析装置JCA-BM6050〔日本電子（株）〕を用いた。分析条件はTable 1に示す。なお、統計処理には日本臨床化学会 Validation-Support Ver.3.5⁷⁾を用いた。

3) 測定原理

ALP：2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール（AMP）緩衝液 [pH 10.2 (37°C)] 中で4-ニトロフェニルリン酸（4-NPP）に試料を作用させると、試料中のALPにより4-ニトロフェノール（4-NP）が遊離する。この4-NPの生成速度を410 nmで測定することにより試料中のALP活性値を求める。

LD：pH 9.4 (37°C)、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型（NAD）の存在下で試料中のLDを作用させると、乳酸はピルビン酸に酸化される。このときNADは β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型（NADH）に還元される。このNADHの生成速度を

340 nmで測定することにより試料中のLD活性値を求める。

3. 方法

1) 同時再現性・日差再現性

2濃度のコントロール血清（Low-C, High-C）と患者プール血清を試料とし、同時再現性は20回連続測定、日差再現性は15日間測定（1日につき3重測定）を行った。なお、週1回2点校正を行い、それ以外の日はブランク補正のみ実施した。

2) 希釈直線性

高活性試料であるリニアチェック Enzymeを生理食塩水で10段階希釈を行い、各3重測定を行った。

3) 定量限界

患者プール血清を生理食塩水で段階希釈したものを試料として5日間測定（1日につき2重測定）を行った。測定値の平均値をプロットしてPrecision profileを作成し、CV 5%のときの活性値を定量限界とした。

4) 正確さ

(1) 実試料標準物質による評価

常用参照標準物質JCCLS CRM-001d（認証値および拡張不確かさ：ALP 153 ± 6 U/L, LD 430 ± 11 U/L）を用い、10回連続測定を行った。測定値の95%信頼区間を求め、この区間内に認証値が含まれているか確認した。

(2) 多数の患者試料を用いた比較対照法との方法間評価

ALPは189例、LDは167例の血清検体を対象に、比較対照法との方法間評価を行った。比較対照法にはIFCC primary reference procedure (IFCC PRP)^{8,9)}に従って調製したIFCC基準測定操作法試薬を用い、自動分析装置にて測定した。なお、校正はJCCLS CRM-001dにて行った。

5) 共存物質の影響

遊離型ビリルビン（Bil-F）、抱合型ビリルビン（Bil-C）、溶血ヘモグロビン（Hb）、アスコルビン酸（Ascorbic acid）は富士フイルム和光純薬（株）製を、乳び（Intralipos）は大塚製薬（株）製のものをを用いた。患者プール血清（ALP 294 U/L, LD 592 U/L）に共存物質を各5濃度添加し、これらの影響を検討した。共存物質未添加時の測定値を100%としたときの相対値（%）を求め、正確さの許容誤差限界 B_A の範囲内（ALP 6.5%, LD 4.4%）¹⁰⁾であれば影響なしと判断した。

6) 試薬安定性

試薬開封後の安定性を検討した。試薬を2週間機器保冷庫に開栓状態で搭載し、生理食塩水（試薬盲検）、キャリブレーター（ALP 166 U/L, LD 438 U/L）、患者プール血清（ALP 92 U/L, LD 181 U/L）を試料として、測定値の

Table 1 Analytical parameter.

	ALP	LD
Sample* (μL)	7.5	7.5
Reagent 1 (μL)	60	60
37°C, 5 min		
Reagent 2 (μL)	15	15
37°C, 5 min		
Measurement point (min)	6.5~10	6~10
assay	rate	rate
Main/Sub (nm)	410/505	340/410

*The sample diluted 5 times with saline.

経時変化を観察した。初日の測定値を100%としたときの相対値 (%) を求め、正確さの許容誤差限界 B_A の範囲内 (ALP 6.5%, LD 4.4%)¹⁰⁾であれば許容と判断した。

7) JSCC法との相関

ALPは251例、LDは262例の血清検体を対象に、本法 (y: IFCC) とJSCC標準化対応法 (x: JSCC) の相関を求めた。

8) 相関乖離検体のアイソザイム分析

7) において、相関から乖離した検体 (ALP: A~F, LD: G~K) のアイソザイム分析を行った。なお、アイソザイム分析は(株)エスアールエルにて外注依頼した。

4. 成績

1) 同時再現性・日差再現性

同時再現性は、ALPでCV 0.7~1.9% (Mean 73~234 U/L), LDでCV 0.5~0.6% (Mean 152~348 U/L) であった。日差再現性は、ALPでCV 1.6~2.9% (Mean 70

~231 U/L), LDでCV 0.8~1.0% (Mean 152~343 U/L) であった (Table 2)。

2) 希釈直線性

ALPは1,600 U/L, LDは2,600 U/Lまで原点を通る直線を認めた (Fig. 1)。

3) 定量限界

定量限界 (CV 5%点) はALPで11.4 U/L, LDで7.4 U/Lであった (Fig. 2)。

4) 正確性

(1) 実試料標準物質による評価

測定値の95%信頼区間がALP 151~163 U/L (Mean 157 U/L), LD 422~444 U/L (Mean 433 U/L) となった。この95%信頼区間内に認証値を含んでいた。

(2) 多数の患者試料を用いた比較対照法との方法間評価

ALPが回帰式 $y = 1.004x - 1.852$, 相関係数 $r = 0.9993$, LDが回帰式 $y = 0.975x - 2.613$, 相関係数 $r = 0.9998$ であった (Fig. 3)。

Table 2 Precision.

		ALP			LD		
		Low-C	High-C	Pooled serum	Low-C	High-C	Pooled serum
Within-run (n = 20)	Mean (U/L)	73	234	92	152	348	182
	SD (U/L)	1.4	1.5	1.0	0.9	1.6	0.8
	CV (%)	1.9	0.7	1.1	0.6	0.5	0.5
Between-day (n = 15)	Mean (U/L)	70	231	89	152	343	182
	SD (U/L)	1.9	3.6	2.5	1.5	2.6	1.7
	CV (%)	2.8	1.6	2.9	1.0	0.8	1.0

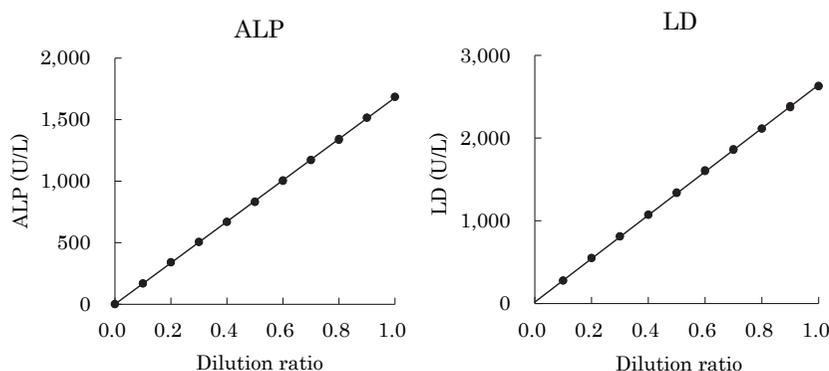


Fig. 1 Dilution linearity.

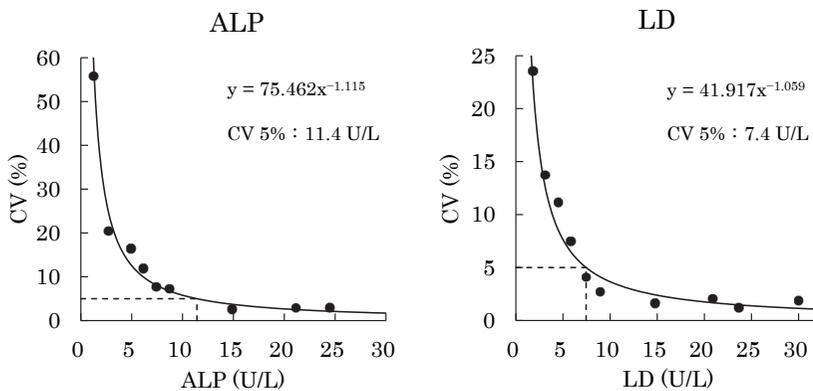


Fig. 2 Limit of quantitation.

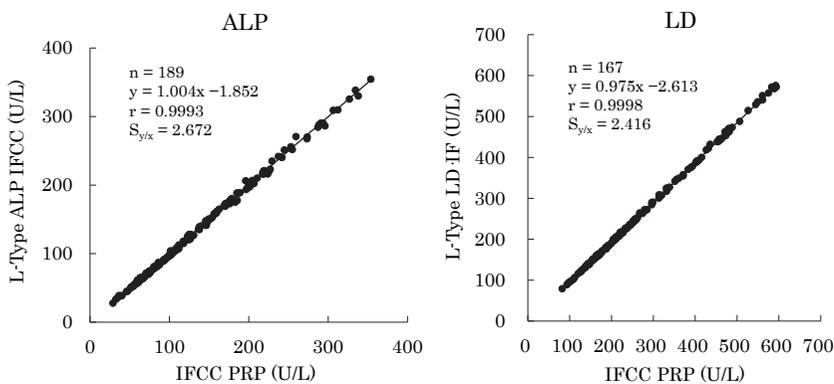


Fig. 3 Correlation between L-Type ALP IFCC/LD · IF and IFCC PRP.

5) 共存物質の影響

ALPはすべての共存物質において、今回検討した濃度では影響を認めなかった (Fig. 4)。LDは溶血ヘモグロビンで正の影響を受けたが、それ以外は影響を認めなかった (Fig. 5)。

6) 試薬安定性

ALPは経時的に相対値の低下を認めたものの、2週間は許容範囲内であった。LDにおいても2週間許容範囲内であった (Fig. 6)。

7) JSCC法との相関

ALPが回帰式 $y = 0.362x - 5.875$ 、相関係数 $r = 0.992$ 、LDが回帰式 $y = 1.028x - 4.301$ 、相関係数 $r = 0.997$ であった (Fig. 7)。

8) 相関乖離検体のアイソザイム分析

ALPでは回帰式の下側に乖離した検体 (A~D) はすべて小腸型ALP優位、上側に乖離した検体 (E~F) は

すべて胎盤型ALP優位であった。一方、LDでは検体 (G~K) すべてLD₅優位であった。

5. 考察

今回我々は2020年4月から全国で開始されるALP、LDのIFCC法への移行に向けて、IFCC法対応試薬であるLタイプワコー ALP IFCCおよびLタイプワコー LD-IFの基礎的性能評価を行った。

同時再現性、日差再現性は、各試料のCVがいずれもJSCCの定める精密さの許容誤差限界CV_A (ALP 3.9%, LD 3.4%)¹⁰⁾を下回っており、良好な結果であった。また、希釈直線性、定量限界の結果から、本試薬は十分な定量範囲を有していることが確認された。正確さについては2方法で検証を行った。常用酵素CRM-001dによる評価では、測定値の95%信頼区間に認証値が含まれていた。また、多数の患者試料を用いた比較対照法との方法間評価では、相

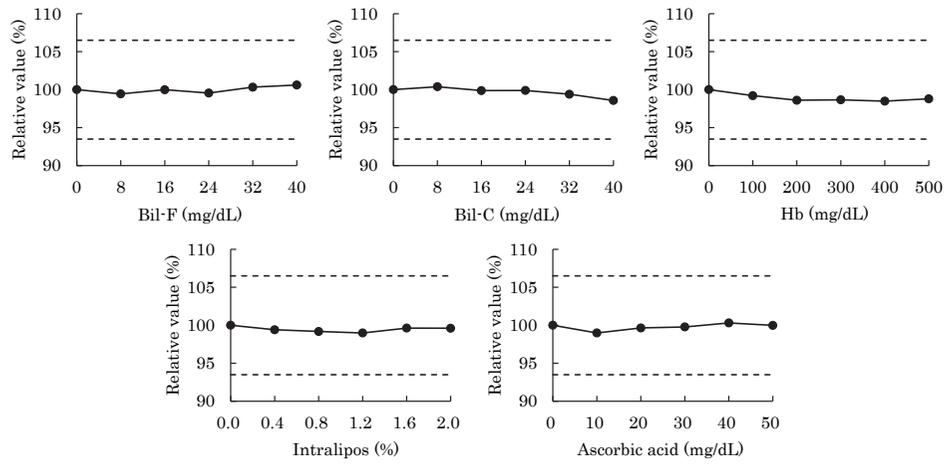


Fig. 4 Effects of interfering substances (ALP).

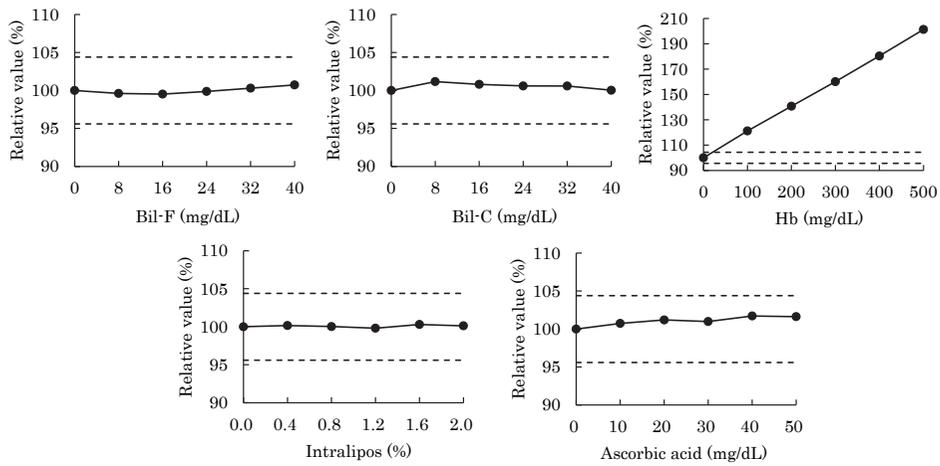


Fig. 5 Effects of interfering substances (LD).

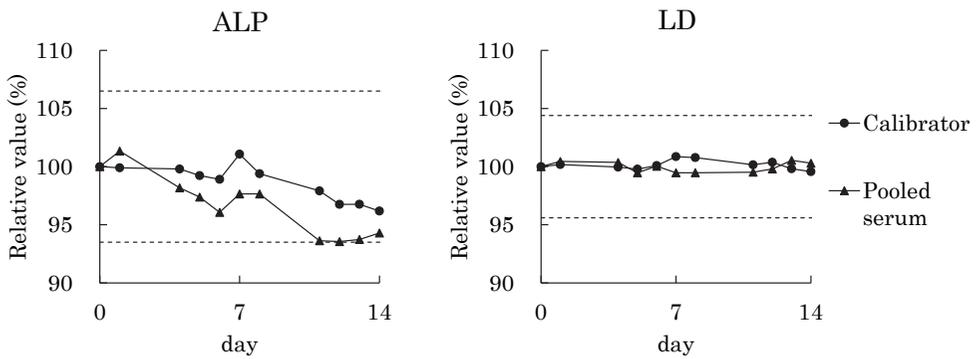


Fig. 6 Reagent stability.

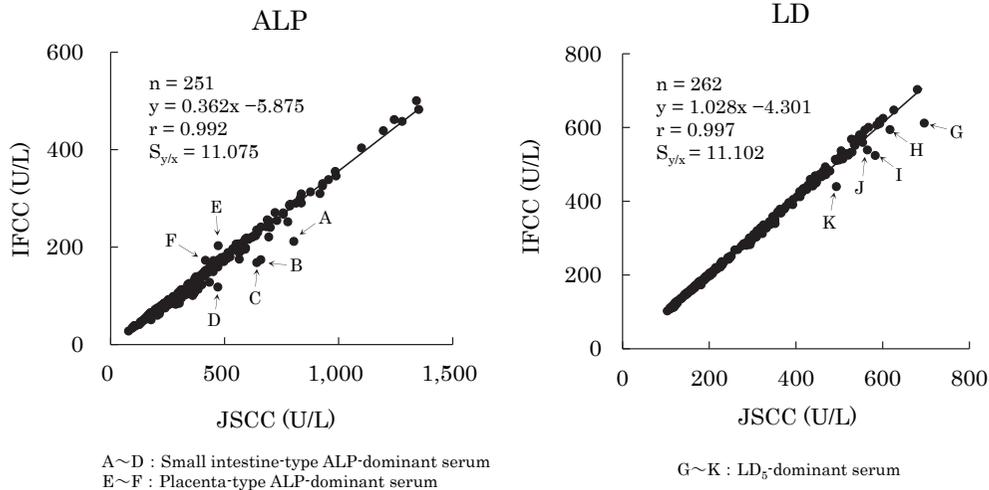


Fig. 7 Correlation between JSCC method and IFCC method.

関係数は良好であり、さらに比例系統誤差や一定系統誤差を認めなかったことから、本試薬の正確さは問題ないといえる。共存物質の影響では、当然ながら溶血へモグロビンでLDが正の影響を受けたが、それ以外の物質では影響を認めなかった。このことから、本試薬は良好な定量特性を有しているといえる。

試薬安定性については、ALPで相対値が経時的に低下した。これは、R1の緩衝液が強アルカリ [pH 10.2 (37°C)] に設定されているため、大気中の炭酸ガス吸収に伴うpHの変動が原因と考えられる。しかしながら、本試薬は開封2週間後であっても相対値の低下は許容範囲内に抑えられており、各施設での使用頻度を考えれば十分試薬を使い切れる日数であるため問題なしとした。LDも同様にアルカリ試薬 [pH 9.4 (37°C)] であるが、2週間ほとんど変動がなく、試薬安定性は良好であった。

JSCC法との相関ではALPで回帰式の傾きが0.362となり、IFCC法ではJSCC法と比較して全体の活性値が約1/3となった。これはそれぞれの緩衝液における反応性の違いによるところである。また、相関から乖離した検体のアイソザイム分析を行ったところ、回帰式の下側に乖離した検体 (A~D) はすべて小腸型ALP優位、上側に乖離した検体 (E~F) はすべて胎盤型ALP優位であった。BまたはO型の分泌型の場合、食後 (特に高脂肪食後) に疾患とは無関係に小腸型ALPが上昇すると報告されている⁹⁾が、IFCC法では小腸型ALPとの反応性が抑えられるよう設定されているため、これを軽減できると考える。一方LDは、回帰式の傾きが1.028でJSCC法と全体の活性値はほぼ同等であっ

た。また、相関から乖離した検体のアイソザイム分析を行ったところ、回帰式の下側に乖離した検体 (G~K) はすべてLD₅優位であった。LD₅優位となる急性肝炎等の肝疾患患者では、IFCC法ではわずかに低値となるため注意が必要である。

6. 結論

IFCC法対応試薬である「Lタイプワコー ALP IFCC」および「Lタイプワコー LD-IF」は良好な基本性能を有しており、日常検査に十分有用であることが確認できた。また、JSCC法との相関ではIFCC法のALPが約1/3の活性値になり、LDはほぼ一致した活性値が得られたが、両者ともアイソザイムによる反応性の違いから一部検体で乖離を認めた。今後IFCC法への切り替えの際に、両試薬における反応互換性について臨床側に十分な通知を行う必要があると考えられた。

本論文の内容は第66回日本臨床検査医学会学術集会にて発表した。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) 金井正光, 臨床検査法提要, 奥村伸生ほか編, 改定第33版, 金原出版株式会社; 東京, 2010; 516-520.

- 2) 浅井宏祐, 臨床検査ガイド2013~2014, 和田攻ほか編, 第2版, 株式会社文光堂;東京, 2013;122-123.
- 3) 日本臨床衛生検査技師会. 平成30年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書, 2019.
- 4) 山館周恒, 荒木秀夫, 山崎浩和. ALP, LDのJSCC常用基準法をIFCC標準化対応法へ. 東京都医学検査 2019;47:160-168.
- 5) 山館周恒, 山崎浩和, 荒木秀夫ほか. 血清アルカリホスファターゼ(ALP)活性測定のJSCC勧告法をIFCC標準測定法にトレーサブルな方法への変更に関する提案. 臨床化学 2017;46:138-145.
- 6) 山館周恒, 山崎浩和, 荒木秀夫. ALP, LDの常用基準法改定について~国際的なハーモナイゼーション~. 医療と検査機器・試薬 2019;42:411-416.
- 7) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会. 定量測定法のバリデーション算出用プログラム Validation-Support/Excel Ver.3.5. <http://jsc.jp.gr.jp/?page_id=1145> (参照2019.8.2).
- 8) Schumann G, Klauke R, Canalias F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 9:Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. Clin Chem Lab Med 2011;49:1439-1446.
- 9) Schumann G, Klauke R, Canalias F, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 3:Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase. Clin Chem Lab Med 2002;40:643-648.
- 10) 社団法人日本臨床衛生検査技師会 精度管理調査評価法検討・試料検討ワーキンググループ. 臨床検査精度管理調査の定量検査評価法と試料に関する日臨技指針. 2008;57:109-117.

Personal CGM と Professional CGM の較正精度に関する比較 —パイロットスタディー—

Comparison of Personal vs. Professional Continuous Glucose
Monitoring related to Calibration; pilot study

武石宗一 坪井宏樹

要旨 Personal CGMとProfessional CGMの較正精度に関する比較検討を行った。Personal CGMとProfessional CGMそれぞれの、較正に用いた血糖値 (BGc) とそのBGc前後のセンサーグルコース値 (SG) 96セットを横断的に検討した。BGcとその直近のSGの解離度を詳細に反映した指標CaI A, BGcがその直後のSGに与える影響を詳細に反映した指標CaI Bを新しく提唱し検討した。CaI BはProfessional CGMに比べPersonal CGMで有意に高値を認めた ($p < 0.001$)。BGcがその直後のSGに与える影響はProfessional CGMに比べPersonal CGMで大きい。CaI Bはリアルタイム較正の特性を反映する。

Key words Personal CGM, Professional CGM, Calibration, MARD

1. 緒言

リアルタイムに持続血糖モニタリング (continuous glucose monitoring: CGM) を行えるPersonal CGM (GUARDIAN CONNECT; Medtronic MiniMed, Northridge, CA, USA)¹⁾が、2018年12月から日本で使用可能となった。Personal CGMを使用することでHbA1c値や低血糖存在割合が有意に低下することが報告されている²⁻⁴⁾。さらにPersonal CGMを使用することで患者はリアルタイムに低血糖もしくは高血糖の傾向を把握することができるため、従来のCGMに比べて低血糖や高血糖をより回避することができる。加えて、レトロスペクティブに血糖変動を解析できるProfessional CGM (Medtronic iPro2; Medtronic MiniMed, Northridge, CA, USA)も、血糖変動指標に基づいて詳

細に血糖変動を理解するために重要な存在である⁵⁾⁶⁾。Professional CGMを使用することでHbA1c値を改善させることも報告されている⁷⁾⁸⁾。低血糖もしくは高血糖リスクをリアルタイムに把握することと、血糖変動指標を用いて血糖変動を詳細に解析することは、糖尿病の管理において両方とも重要である。

Professional CGM (iPro2) の平均絶対的相対的差異 (mean absolute relative difference: MARD = |較正に用いた血糖値の直近のセンサーグルコース値 - 較正に用いた血糖値| ÷ 較正に用いた血糖値 × 100) は11%⁹⁾、Personal CGMのMARDは約10%¹⁰⁾と報告されている。また、Professional CGMとpersonal CGMを同時装着した1型糖尿病患者における両CGMのMARDは有意差がなかったことが報告されている¹¹⁾。ただ、Professional CGMと違ってPersonal CGMでは、較正に用いた血糖値 (以下BGc) より前に測定されたセンサーグルコース値 (以下SG) はその後のBGcから影響を受けない。このことはBGcがそのBGc較正直後のSGに与える影響がProfessional CGMに比べPersonal CGMでより強まることに繋がる。この両CGMの違いが、わずかではあるかもしれないが、血糖変動の評価に影響する可能性が否定できない。また、2型糖尿病の血糖値の動態は1型糖尿病と異なる可能性があり、そのことが影響する可能性を含め、2型糖尿病患者に装着したProfessional CGMとPersonal CGMの精度に関してはよく知られていない。

Received Apr. 17, 2020; Accepted Jun. 26, 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ニタ子塚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

そこで今回我々は、BGc前後のSGの変動を評価することでPersonal CGMとProfessional CGMの較正に関する特性の違いを検討した。

2. 対象と方法

1) 研究デザインと対象患者選定

本研究は横断研究である。対象の選択基準は、Personal CGM (GUARDIAN CONNECT) もしくはProfessional CGM (Medtronic iPro2) を使用し、CGM装着2~5日目に毎食前+就寝前血糖値が測定されている2型糖尿病患者とし、選択基準を満たさない患者は除外した。

Personal CGMを使用した2型糖尿病患者6例とProfessional CGMを使用した2型糖尿病患者6例それぞれにおける、BGcとそのBGc前後のSG計96セット [CGM装着2~5日目 (4日間) に測定された毎食前+就寝前血糖値の6例ずつ分 (4×4×6)] を検討した。CGMは全例、装着日の13時に装着された。BGcは血糖自己測定器 (ONETOUCH UltraVue; LifeScan; Wayne, PA, US) で測定された。すべての患者においてCGM装着2~5日目の毎食前+就寝前に測定されたBGcで較正された。病棟看護師がBGcを測定しPersonal CGMを較正した。

また、模擬的に作成したBGcとそのBGc前後のSGを用いて検討を行った。

研究プロトコ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XI号, 承認日: 2018年11月30日), UMINに登録された (UMIN000035098)。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口頭同意を得た患者を本研究に登録した。

2) アウトカム

Absolute relative difference (ARD)¹²⁾ では直近の1つのSGとしか比較ができないため、BGcとその前後の直近のSGとの解離度を詳細に評価するために新しい指標 [calibration index (CaI) A] を提唱した。計算式を以下に示す。

$$\frac{|(SG \text{ just before } BGc(SGjb) - BGc) + (SG \text{ just after } BGc(SGja) - BGc)|}{2} = \text{calibration index (CaI) A.}$$

ARDでは理論上、リアルタイム較正の特徴である、BGcがその直後のSGに与える影響 (以下EBpS) を詳細に評価できないため、それを評価するために新しい指標 (CaI B) を提唱した。計算式を以下に示す。

$$\frac{|(SGja - SGjb) - [(SGjb - SG \text{ 15 min before } SGjb) / 3]|}{|SGjb - BGc|} = a \quad (もし分母 (|SGja -$$

BGc) が0であれば分母を1とした)

$$\sqrt{(a \times b)} = \text{CaI B.}$$

上記のaの式の目的はSGの変化速度が較正直前に比べ較正によりどう変化したかを評価することである。較正前のSGの変化速度として最適な評価時間を15分と定義した。そしてSGの変化速度を5分当たりの変化度として統一するため、15分間の変化度を3で除した。

'BGcとその前後の直近のSGとの解離度' と 'BGcがその直後のSGに与える影響' を総合的に評価するために CaI A + CaI B を CaI C と定義した。

SGjbとBGcの測定時間の差が3分30秒未満の時は、SGjaはそれ自身 (SGjaA) と定義し、3分30秒以上の時はSGjaはSGjaAの5分後に測定されたSG (SGjaB) と定義した。

BGcに最も近いSGを用いてARDを算出した¹²⁾。

3) 主要評価項目

CaI Bを、Personal CGM全96セットとProfessional CGM全96セットで比較した。

4) 副次評価項目

(1) CaI A, CaI C, ARDを、Personal CGM全96セットとProfessional CGM全96セットで比較した。

(2) Personal CGM全96セットとProfessional CGM全96セットをそれぞれBGcの中央値以上 (中央値以上群) と中央値未満 (中央値未満群) で2群に分け、中央値以上群と中央値未満群それぞれにおいて、両CGM間でCaI A, CaI B, CaI C, ARDを比較した。

以下の評価項目は、本研究の対象患者ではなく、下記の目的で模擬的に作成したデータで、実在した患者のデータではない。

(3) CaIの理論上の意義を検討する目的で模擬的に作成したBGcとそのBGc前後の20分間5分毎に測定されたSGから算出されたCaI A, CaI B, CaI C, ARDを比較した。

3. 統計解析方法

結果は中央値 (四分位範囲) で表し、Mann Whitney's U 検定, カイ二乗検定を用い、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。

4. 結果

1) 患者背景

患者背景をTable 1に示す。チアゾリジン薬, α -グルコシダーゼ阻害薬, SGLT2阻害薬の使用の有無は、Professional CGM群に比べPersonal CGM群で有意に多

Table 1 Baseline characteristics

Characteristic (n = 6)	Personal CGM	Professional CGM	p
N (Male / Female)	6 (2 / 4)	6 (3 / 3)	p ₂ = 0.56
Age, years	69.0 (60.8-72.8)	66.5 (62.0-78.5)	p ₁ = 0.81
Duration of diabetes, years	9.0 (2.3-14.3)	9.0 (2.8-10.0)	p ₁ = 0.87
BMI, kg/m ²	22.4 (21.6-23.1)	23.1 (22.1-25.4)	p ₁ = 0.63
HbA1c (NGSP), %	9.6 (9.1-10.3)	9.7 (8.7-10.2)	p ₁ = 0.87
Sulfonylurea agent, n (%)	0 (0)	0 (0)	p ₂ : cannot calculate
Metformin, n (%)	5 (83.3)	4 (66.7)	p ₂ = 0.51
Thiazolidinediones, n (%)	3 (50.0)	0 (0)	p ₂ = 0.046
α-glucosidase inhibitor, n (%)	3 (50.0)	0 (0)	p ₂ = 0.046
Insulin, n (%)	6 (100.0)	6 (100.0)	p ₂ : cannot calculate
DPP-4 inhibitor, n (%)	6 (100.0)	4 (66.7)	p ₂ = 0.12
GLP-1 receptor agonist, n (%)	0 (0)	0 (0)	p ₂ : cannot calculate
Rapid-acting insulin secretagogue, n (%)	0 (0)	0 (0)	p ₂ : cannot calculate
SGLT 2 inhibitor, n (%)	5 (83.3)	1 (16.7)	p ₂ = 0.02
Retinopathy, n (%)	0 (0)	1 (16.7)	p ₂ = 0.3
Nephropathy, n (%)	0 (0)	2 (33.3)	p ₂ = 0.12
Neuropathy, n (%)	0 (0)	0 (0)	p ₂ : cannot calculate

Data are shown as medians (interquartile range).

p₁: Mann-Whitney U-test, p₂: Chi-square test

CGM; continuous glucose monitoring, BMI; body mass index, HbA1c; glycosylated hemoglobin, DPP; dipeptidyl-peptidase, GLP; glucagon-like peptide, SGLT; Sodium glucose co-transporter

かった (Table 1)。

2) 主要評価項目

CaI BはProfessional CGMに比べPersonal CGMで有意に高値を認めた (p<0.001) (Table 2)。

3) 副次評価項目

(1) CaI A, CaI C, ARDはProfessional CGMとPersonal CGMで有意差を認めなかった (Table 2)。

(2) CaI A: 中央値以上群では両CGM間で有意差を認めなかったが, 中央値未満群ではPersonal CGMはProfessional CGMに比べ有意に低値を認めた (p=0.02)。CaI B: 中央値以上群, 中央値未満群とも, Personal CGMはProfessional CGMに比べ有意に高値を認めた (それぞれp<0.001)。

CaI C: 中央値以上群ではPersonal CGMはProfessional CGMに比べ有意に高値を認めたが (p=0.01), 中央値未満群では有意差を認めなかった。

ARD: 中央値以上群ではPersonal CGMはProfessional CGMに比べ有意に高値を認めたが (p=0.04), 中央値未満群では有意差を認めなかった (Table 3)。

(3) 副次評価項目③の結果をTable 4に示す。

5. 考察

本研究結果より, BGcがその直後のSGに与える影響はProfessional CGMに比べPersonal CGMで大きいことが示唆された。CaI Bはリアルタイム較正の特性を反映すると考える。

入院中の2型糖尿病患者におけるデータのため, 本研究結果のMARDの中央値が過去の報告⁹⁾¹⁰⁾と比べて低かった結果には, 血糖変動が比較的小さい状況で測定されたことが影響した可能性を推察する。

全セットをBGcの中央値以上と未満で2群に分けて検討した本研究結果を考察すると, CaI Aは, Personal CGMではBGcが高いほど値が高くなるがProfessional CGMではBGcの値によらずほぼ一定である, という可能性があり, ARDはProfessional CGMではBGcが低いほど値が高くなる可能性がある。CaI AはBGcとの解離度がBGcで除されていないためその点においてabsolute differences (AD)¹³⁾に類似した指標と考えることができ, そのことを踏まえCaI AとARDの結果を考察すると, Personal CGMではBGcとの解離度はBGc値に依存するがProfessional CGMでは依存しないという性質をもつ可能性がある。さらに, ARDがPersonal CGMではBGcが高いほど値が高くなる可能性がある本研究結果は, 本研究で使用した自己血糖測定器で測定されたBGcがSGより総じて値が高い方向に解離した結果と, Personal CGMでBGcがSGからより解離するほど, 較正アルゴリズムにてSGがBGcにより近づかなくなった結

Table 2 Sensor performance

(n = 96)	Personal CGM	Professional CGM	p
BGc, mg/dL	133.5 (115.0-156.0)	134.5 (115.5-164.5)	p = 0.69
CaI A	6.8 (3.0-12.1)	7.0 (3.5-13.3)	p = 0.47
CaI B	3.2 (1.3-4.5)	0.9 (0.6-1.3)	p < 0.001
CaI C	10.7 (4.8-16.0)	8.6 (4.6-14.7)	p = 0.32
ARD, %	5.6 (2.1-9.2)	5.2 (2.2-10.6)	p = 0.77

Data are shown as medians (interquartile range).

p: Mann-Whitney U-test

Primary endpoint parameters are represented in bold font.

BGc; capillary blood glucose level used to calibrate, CaI; calibration index, ARD; absolute relative difference

Table 3 Sensor performance in BGc < median or BGc > median

(n = 48)	BGc > median			BGc < median		
	Personal CGM	Professional CGM	p	Personal CGM	Professional CGM	p
BGc, mg/dL	156.0 (144.3-191.3)	165.0 (146.0-182.3)	p = 0.42	115.0 (106.8-124.0)	115.0 (104.0-129.3)	p = 0.75
CaI A	9.3 (4.4-14.5)	7.0 (2.5-11.1)	p = 0.17	5.0 (2.4-9.5)	8.0 (3.9-15.1)	p = 0.02
CaI B	3.5 (1.3-6.0)	1.0 (0.6-1.4)	p < 0.001	2.8 (1.1-3.9)	0.8 (0.6-1.1)	p < 0.001
CaI C	13.5 (6.9-20.2)	8.1 (4.6-12.6)	p = 0.01	8.1 (3.5-13.2)	8.9 (4.8-16.7)	p = 0.3
ARD, %	7.0 (2.0-9.7)	3.8 (1.4-7.0)	p = 0.04	5.1 (2.3-8.7)	7.0 (3.2-13.5)	p = 0.09

Data are shown as medians (interquartile range).

p: Mann-Whitney U-test

Table 4 The relationships between CaI A, CaI B, CaI C, and ARD using simulated glucose levels

	Glucose level, mg/dL						CaI A	CaI B	CaI C	ARD, %
	SG15b (7:10)	SG10b (7:15)	SG5b (7:20)	SGjb (7:25)	BGc (7:27)	SGja (7:30)				
Case 1	140	141	139	140	165	140	25	0	25	15.2
Case 2	140	139	141	140	165	160	15	10	25	15.2
Case 3	80	100	120	140	165	160	15	0	15	15.2
Case 4	135	115	95	75	65	55	0	0	0	15.4

The table shows a simulated BGc and simulated SGs measured every 5 minutes for 20 minutes before and after that BGc.

SG; sensor glucose level, SGjb; SG just before BGc, SGja; SG just after BGc, SG15b; SG 15 minute before SGjb, SG10b; SG 10 minute before SGjb, SG5b; SG 5 minute before SGjb

果を両方とらえた可能性がある。一方、CaI BはBGcの値によらずProfessional CGMに比べPersonal CGMで有意に高く、上述の両CGMの性質に影響されない点においてもCaI Bの万能性が示唆される。CaI Cの結果はCaI AとCaI Bの結果を足し合わせたものと考えられる。

Mean ARDはBGcとの解離度を評価するのに最も汎用されている指標であり⁹⁾¹⁰⁾、有用な指標であるが、較正精度を正確に評価できないケースが理論上存在する。模擬的に作成した、Table 4のCase 1と2の比較からわかるように、

CaI AはARDに比べBGcとの解離度を、CaI BはARDに比べBGcがその直後のSGに与える影響を、より正確に反映することがある。また、Table 4のCase 1と3の比較からわかるように、食前血糖値のようにBGc 前後のSGが安定しているケースと、食後のようにBGc 前後のSGが安定していないケースとで、BGcとの解離度がどう違うかを、CaI AはARDに比べより正確に反映できることがある。さらに、Table 4のCase 2と3の比較からわかるように、BGc 前後のSGが安定しているケースにおけるPersonal CGM様の較

正と、BGc 前後のSGが安定していないケースにおける Professional CGM様の較正とで、精度がどう違うかをARDが正確に反映しないことがある。Table 4においてBGc 前後のSGがCase 3と4の間で同等に不安定になるように構成したが、Case 4はCaI A, CaI B, CaI Cがすべて0になり、較正がほぼ完璧に近いものであった。しかしながら、そのCase 4でさえもARDは0ではなかった。このように、Professional CGM様の較正においてBGc 前後のSGが同等に不安定であっても、CaI AがARDに比べBGcとの解離度をより正確に反映することがある。以上より、ARDの1つの限界点として、BGcがそのBGcに最も近い1つのSGとしか比較されない点が挙げられる。その点において、CaIではBGcがそのBGc前後のSGと比較されるため、より詳細な評価が可能になると考える。一方、ARDの1つの利点として、CaIに比べ計算式がシンプルである点が挙げられる。

本研究結果から、CaI Bを用いてリアルタイム較正の特性が血糖変動評価に与える影響を把握することで、より正確な血糖変動評価が可能となると考える。ただ、本研究は以下の点において限界がある。第1に、対象患者数と較正件数が少ない。第2に、Personal CGMとProfessional CGMを同一患者に同時装着するデザインでなされておらず、両CGMの対象患者が異なっている。第3に、個々のエンライトセンサーの精度が同じでない可能性がある。第4に、食後の時間帯の較正精度が評価できていない。第5に、両CGMの較正アルゴリズムに関する検討ができない。第6に、CaIがARDに勝るメリットを理論上でしか評価できていない。第7に、較正前のSGの変化速度として最適な評価時間を15分と定義した根拠や、SGjaをSGjaAとSGjaBに定義する基準をSGjbとBGcの測定時間の差が3分30秒の時とした根拠を過去の報告から引用できず、独自に提唱している。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

- Carlson AL, Mullen DM, Bergenstal RM. Clinical Use of Continuous Glucose Monitoring in Adults with Type 2 Diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2017;19:S4-S11.
- 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.
- Haak T, Hanraire 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.
- Beck RW, Riddlesworth TD, Ruedy K, et al. Continuous Glucose Monitoring Versus Usual Care in Patients With Type 2 Diabetes Receiving Multiple Daily Insulin Injections: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2017;167:365-374.
- Fonseca VA, Grunberger G, Anhalt H, et al. CONTINUOUS GLUCOSE MONITORING: A CONSENSUS CONFERENCE OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY. *Endocr Pract* 2016;22:1008-1021.
- Danne T, Nimri R, Battelino T, et al. International Consensus on Use of Continuous Glucose Monitoring. *Diabetes Care* 2017;40:1631-1640.
- Kim SK, Kim HJ, Kim T, et al. Effectiveness of 3-day continuous glucose monitoring for improving glucose control in type 2 diabetic patients in clinical practice. *Diabetes Metab J* 2014;38:449-455.
- Sperling MA. Continuous subcutaneous insulin infusion and continuous subcutaneous glucose monitoring in children with type 1 diabetes mellitus: boon or bane? *Pediatr Diabetes* 2001;2:49-50.
- Rodbard D. Continuous Glucose Monitoring: A Review of Successes, Challenges, and Opportunities. *Diabetes Technol Ther* 2016;18:S3-S13.
- Christiansen MP, Garg SK, Brazg R, et al. Accuracy of a Fourth-Generation Subcutaneous Continuous Glucose Sensor. *Diabetes Technol Ther* 2017;9:446-456.
- Moser O, Pandis M, Aberer F, et al. A head-to-head comparison of personal and professional continuous glucose monitoring systems in people with type 1 diabetes: Hypoglycaemia remains the weak spot. *Diabetes Obes Metab* 2018;doi:10.1111/dom.13598.
- Reiterer F, Polterauer P, Schoemaker M, et al. Significance and Reliability of MARD for the Accuracy of CGM Systems. *J Diabetes Sci Technol* 2017;11:59-67.
- Bailey T, Bode BW, Christiansen MP, et al. The Performance and Usability of a Factory-Calibrated Flash Glucose Monitoring System. *Diabetes Technol Ther* 2015;17:787-794.

梅毒血清学的検査試薬「アキュラスオートRPR」および「アキュラスオートTP抗体」の基本性能に関する検討

The Evaluation of the Serological Test Reagent for Syphilis;
Accuras Auto RPR and Accuras Auto TP (Syphilis)-A.

佐藤秀信¹⁾ 村井良精¹⁾ 山田浩司¹⁾
浅沼康一¹⁾ 柳原希美¹⁾²⁾ 高橋 聡¹⁾²⁾

要旨 梅毒血清学的検査試薬アキュラスオートRPRおよびアキュラスオートTP抗体の基本性能について検討した。併行精度、室内精度、希釈直線性などの基本性能は良好な成績であった。ただし、アキュラスオートRPRにおいて、溶血や乳びにより測定値への影響を認めた。これらに該当する検体測定時には注意が必要であるが、測定前に検体の性状を確認することで誤判定を回避できると考えられた。また、患者検体1,000例を用いて比較対照試薬との判定結果を比較したところ、TP抗体検査において2例の判定乖離例を認めた。精査の結果、いずれも比較対照試薬の偽陽性であった。両試薬とも、基本性能に優れ、日常検査に有用であることが確認された。

1. はじめに

梅毒は *Treponema pallidum subspecies pallidum* (TP) によって引き起こされる感染症であり、我が国においてその患者数は増加傾向にある¹⁾。その診断には、身体的症状など臨床所見の確認に加え、血清学的検査が非常に重要な役割を担っている²⁾。梅毒血清学的検査は、脂質抗原を用いる Serologic Test for Syphilis (STS) 法と、梅毒病原体である TP を抗原として用いる TP 抗原法の2法がある。STS法は早期感染の検出や治療効果の判定に優れるが、生物学的偽陽性などのように非特異的な反応を認める。一方、TP抗原法は、特異性に優れるが治療後においても陽性と判定されるため治療効果を反映しな

いという欠点を有する³⁾。そのため、本邦におけるガイドライン⁴⁾では、診断時はSTS法によるスクリーニングで陽性の場合、TP抗原法にて確認検査を行うこと、さらに治療開始後はその効果判定にSTS法を用いることが推奨されている。また、我が国においては梅毒の無症状病原体保有者に対してSTS法で16倍以上又はそれに相当する抗体価を保有する場合には届出の義務がある⁵⁾ことから、それに対応する測定範囲が求められている。しかし、各社から販売されている試薬はすべてこれを満たしている訳ではなく、そのため手法での希釈によって測定される場合も少なくない。すなわち梅毒血清学的検査において、STS法は測定範囲が広いこと、またTP抗原法においては、より特異性が高いことが期待されて

Received Jun. 2, 2020; Accepted Jul. 6, 2020
Hidenobu SATO¹⁾, Ryosei MURAI¹⁾, Koji YAMADA¹⁾,
Kouichi ASANUMA¹⁾, Nozomi YANAGIHARA¹⁾²⁾,
Satoshi TAKAHASHI¹⁾²⁾

¹⁾ 札幌医科大学附属病院検査部

²⁾ 札幌医科大学医学部 感染制御・臨床検査医学講座

¹⁾ Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital.

²⁾ Department of Infection Control and Laboratory Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine.

〒060-8543 北海道札幌市中央区南1条西16丁目
TEL:011-211-6111(内線36490) FAX:011-622-8502
E-mail: s.hidenobu@sapmed.ac.jp
Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University, School of Medicine, South-1, West-16, Chuo-ku, Sapporo, 060-8543, Japan.
Tel: +81116112111 Ext. 36410; Fax: +81116228502;
E-mail: s.hidenobu@sapmed.ac.jp
Corresponding author: 佐藤秀信

いる。今回、これらの克服を目的とした検査試薬であるアキュラスオートRPRおよびアキュラスオートTP抗体の基本性能を検討した。

2. 材料および方法

1) 対象

2018年8月1日から2020年3月31日までに札幌医科大学附属病院において梅毒血清学的検査を行った入院および外来患者の血清を用いた。なお、本研究は、札幌医科大学附属病院臨床研究審査委員会で承認を受けて実施した（承認番号312-1161）。

2) 試薬および測定機器

検討試薬としてアキュラスオートRPRとアキュラスオートTP抗体（いずれも株式会社シノテスト）、比較対照試薬としてメディエース®RPR®とメディエース®TPLA®（いずれも積水メディカル株式会社）を用いた。いずれの試薬もすべて、日立7180形自動分析装置（株式会社日立ハイテク）を用いて測定した。また、共存物質の検討は、干渉チェック・Aプラスおよび干渉チェック・RFプラス（いずれもシスメックス株式会社）を、TP抗体検査の確認試験はTPLA中和試験用試薬（積水メディカル株式会社）およびFTA-ABSテスト-SG-KIT（株式会社日本凍結乾燥研究所）を用い、試薬の添付書に従った。

3. 成績

1) 併行精度

3濃度のプール血清を用いて検討試薬2試薬で20回測定した。変動係数はアキュラスオートRPRで1.4~3.2%、アキュラスオートTP抗体で0.7~1.4%と良好な成績であった（Table 1）。

2) 室内精度

3濃度のプール血清を初回キャリブレーション後、検討試薬2試薬で20日間3重測定した。変動係数はアキュラスオートRPRで2.6~4.6%、アキュラスオートTP抗体で1.3~3.7%と良好な成績であった（Table 2）。

3) プロゾーン試験

検討試薬2試薬を用いて各高濃度試料を生理食塩水にて2倍段階希釈し測定した。アキュラスオートRPRでは理論値230.4 R.U.、アキュラスオートTP抗体では理論値164.8 COIから測定値の低下を認めた。しかし測定値に対し、機器よりプロゾーン発生の警告が出されていた。また、アキュラスオートRPRでは理論値28.8 R.U.、アキュラスオートTP抗体では理論値20.6 COIより検体希釈による再測定を促す警告も出現した（Fig. 1）。

4) 検出限界

検討試薬2試薬において低濃度試料を用い、生理食塩水にて10段階希釈したものを10重測定した。2SD法に

Table 1 Within-run precision.

Accuras Auto RPR (n=20)				Accuras Auto TP (Syphilis)-A (n=20)			
	Low	Medium	High		Low	Medium	High
Mean (R.U.)	3.1	10.0	17.0	Mean (COD)	4.1	11.3	18.9
SD	0.07	0.32	0.24	SD	0.06	0.08	0.17
CV (%)	2.4	3.2	1.4	CV (%)	1.4	0.7	0.9

Table 2 Between-day precision.

Accuras Auto RPR (n=20)				Accuras Auto TP (Syphilis)-A (n=20)			
	Low	Medium	High		Low	Medium	High
Mean (R.U.)	3.2	9.3	15.4	Mean (COD)	4.2	11.5	19.6
SD	0.15	0.24	0.40	SD	0.08	0.43	0.26
CV (%)	4.6	2.6	2.6	CV (%)	1.9	3.7	1.3

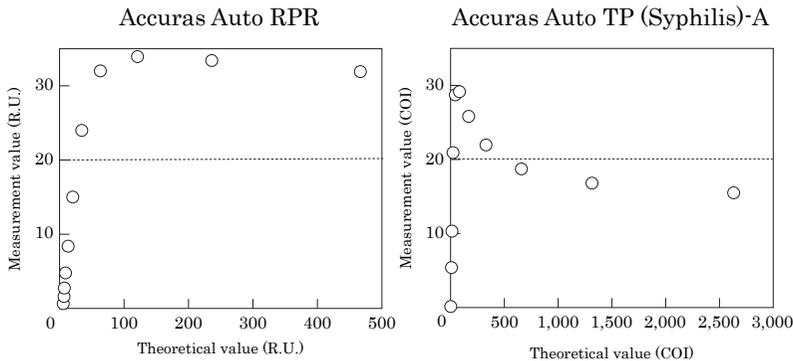


Fig. 1 Prozone phenomenon.

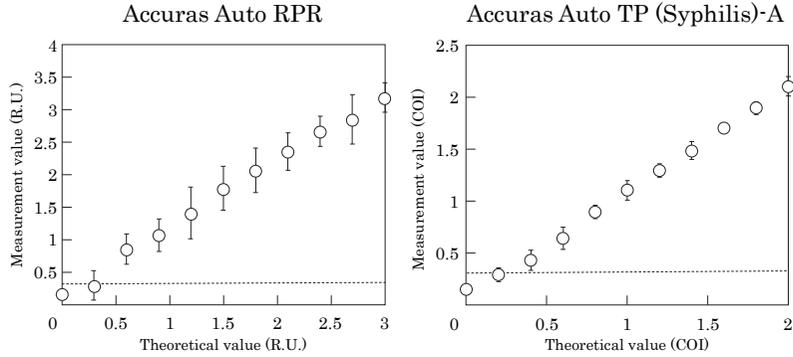


Fig. 2 Detection limit.

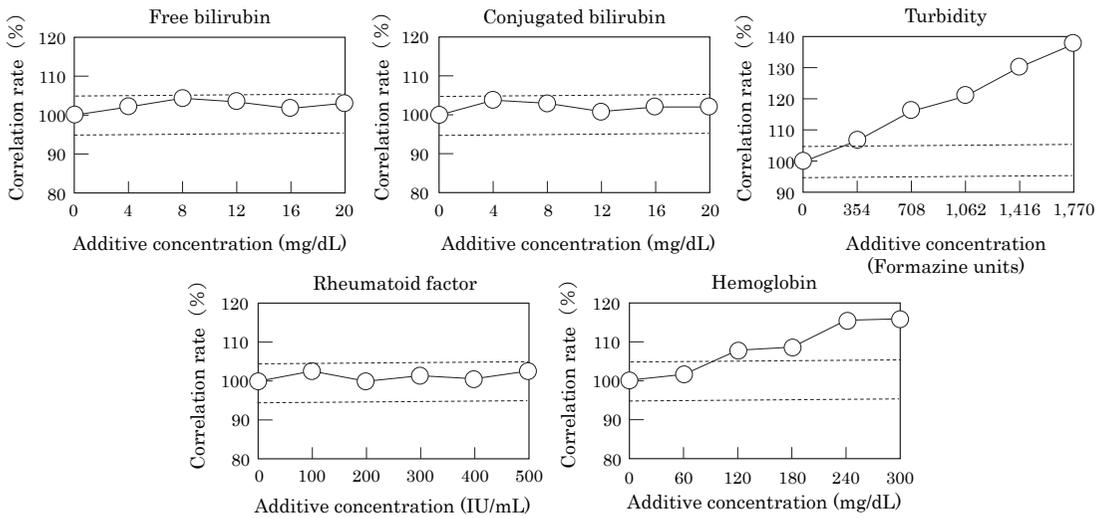


Fig. 3a Effects of coexisting materials on measurement in Accuras Auto RPR.

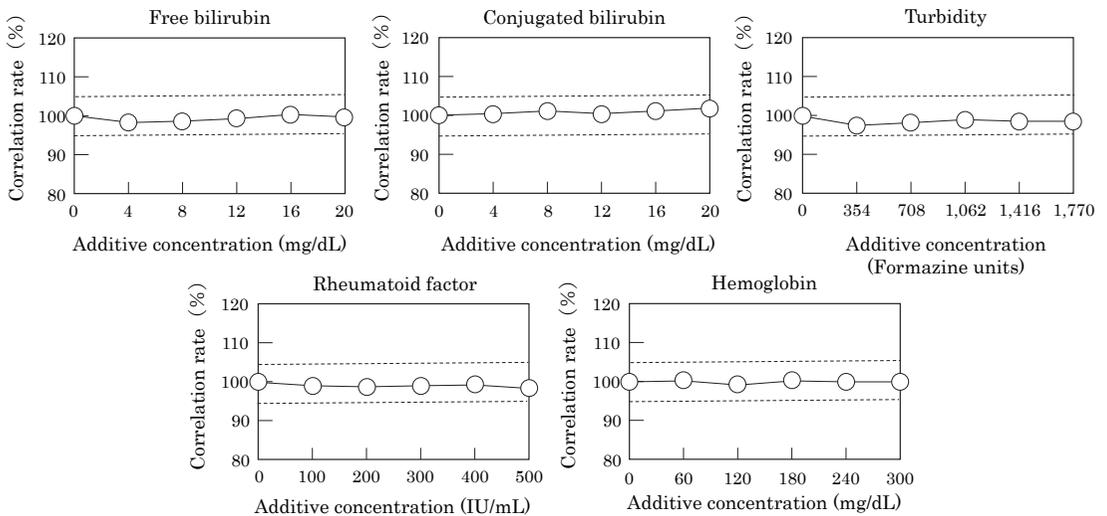


Fig. 3b Effects of coexisting materials on measurement in Accuras Auto TP (Syphilis)-A.

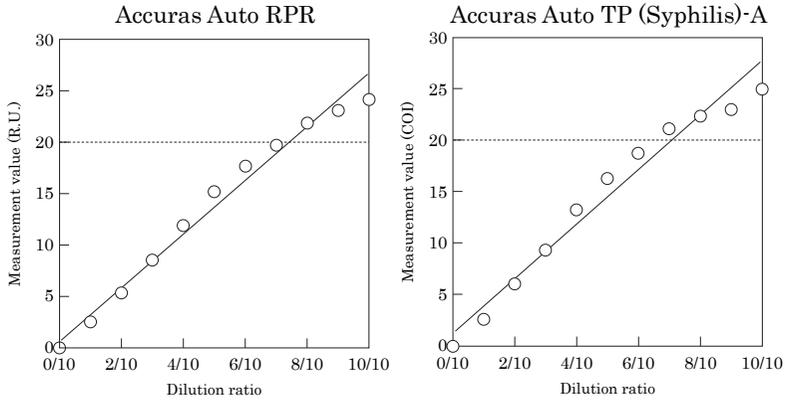


Fig. 4 Linearity test.

Table 3 Concordance rate between Accuras and Mediatec® in RPR and TPA test.

		Mediatec®RPR®		Total			Mediatec®TPLA®		Total
		+	-				+	-	
Accuras Auto RPR	+	7	0	7	Accuras Auto TP (Syphilis)-A	+	8	0	8
	-	0	993	993		-	2	990	992
Total		7	993	1,000	Total		10	990	1,000

Positive concordance rate 7/7 = 100%
 Negative concordance rate 993/993 = 100%
 Total concordance rate (7+993)/1000 = 100%

Positive concordance rate 8/8 = 100%
 Negative concordance rate 990/992 = 99.8%
 Total concordance rate (8+990)/1000 = 99.8%

Table 4 Confirmation test in two cases of discrepancy.

	Accuras Auto TP (Syphilis)-A ((+) ≥ 10.0 COI)	Mediatec® TPLA® ((+) ≥ 10.0 T.U.)	Absorption test ((+) ≥ 50%)	FTA-ABS
Case 1	0.0	20.8	4.3%	negative
Case 2	0.0	483.2	2.2%	negative

て評価を行ったところ、アキュラスオートRPRでは理論値0.84 R.U., アキュラスオートTP抗体では理論値0.43 COIであった (Fig. 2)。

5) 共存物質の影響

検討試薬2試薬において、干渉チェック・Aプラスおよび干渉チェック・RFプラスを用いてビリルビンFおよびビリルビンCは20 mg/dL, 乳びは1,770 Formazine turbidity units (FTU), Rheumatoid factor (RF) 因子は500 IU/mL, 溶血ヘモグロビンは300 mg/dLまで検討した。その結果、アキュラスオートRPRは乳び354 FTU, 溶血ヘモグロビン120 mg/dLより測定値に正の誤差を認めた。一方、アキュラスオートTP抗体では検討範囲内の濃度において、その影響を認めなかった (Fig. 3a, b)。

6) 希釈直線性

各高濃度試料を10段階希釈後、検討試薬2試薬を用いて3重測定した。アキュラスオートRPRでは実測値23.2 R.U.まで、アキュラスオートTP抗体では実測値23.2 COIまで良好な直線性を認めた (Fig. 4)。

7) 比較対照試薬との判定結果の比較

患者血清1,000例を用い、検討試薬2試薬と比較対象試薬との判定結果一致率をそれぞれ求めた。その結果、メ

ディエース®RPR®との一致率は100%であったが、メディエース®TPLA®との一致率は99.8% (陽性一致率100%, 陰性一致率99.8%) とメディエース®TPLA®のみ陽性を示した検体を2例認めた (Table 3)。この2例について、メディエース TPLA 中和試験およびFTA-ABS法による確認試験を行ったところどちらも陰性であった (Table 4)。

4. 考察

今回、我々はアキュラスオートRPRおよびアキュラスオートTP抗体の基本性能を検討した。併行精度、室内精度、プロブーン検出、検出限界および希釈直線性などの基本性能は良好であった。また、期待されていたアキュラスオートRPRの測定範囲も23.2 R.U.までと広いことから、本試薬の使用は希釈操作不要で測定可能となる検体の増加が見込まれ、検査コストの削減や正確な治療効果の判定が期待できる。しかし、アキュラスオートRPRにおいて乳び、および溶血ヘモグロビン添加時に測定値は正の影響を受けた。過去の報告では、対照試薬を含む他のSTS検査試薬においても乳びによる正の誤差を認めており⁵⁾⁶⁾、本試薬においても同様に注意が必要である。また、溶血ヘモグロビンの影響に関しては、120mg/dLと明らかな肉眼的な溶血を認める範囲から影響を認めた。すなわち、陽性を示した検体の脂質異常あるいは溶血の程度を確認することは、誤判定を回避する

ためにも重要であると考え。TP抗原法において、過去の報告⁷⁾にあるような希釈直線性の問題は本検討において認められず、実測値23.2 COIまで良好な直線性を認めた。さらに、対照試薬との相関性の検討でTable 3に示す対照試薬のみ陽性となった2例について解析を行った。陽性となった対照試薬専用の吸収試薬を用いて処理後に再測定を行ったところ、Table 4に示すように陽性判定基準である50%を超えず、FTA-ABS法においても陰性であった。以上より、対照試薬の偽陽性であると判定した。すなわち、過去の報告⁷⁾⁸⁾同様、本試薬の高い特異性が改めて確認された。この要因の一つとして、本試薬はTP抗原にリコンビナント抗原を用いている一方、対照試薬は精製抗原を用いていることに起因すると考えられる⁷⁾。

5. 結論

アキュラスオートRPRおよびアキュラスオートTP抗体は基本性能に優れ、とくにアキュラスオートRPRは広い測定範囲を持つこと、アキュラスオートTP抗体は高い特異性を持つことが特徴であり、いずれも日常検査に有用と考えられる。しかし、アキュラスオートRPRは乳びおよび溶血による正の誤差を受けることから、このような検体を測定する際には注意を要する。

本論文発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) 荒川創一, 有馬雄三, 大西 真. 梅毒: その増加の現状と正しい診断・治療について. 日本化学療法学会雑誌 2019;67:466-82.
- 2) Morshed MG. Current trend on syphilis diagnostics: issues and challenges. Adv Exp Med Biol 2014;808: 51-64.
- 3) 山根誠久. ONE POINT MEMO No.202 臨床検査ひとくちメモ. モダンメディア 2010;56:32-5.
- 4) 日本感染症学会 性感染症診断・治療ガイドライン2016委員会. 性感染症 診断・治療ガイドライン2016. 日本感染症学会誌 2016;27:No.1 Supplement.
- 5) 厚生労働省ホームページ. 感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について. <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-05-11.html> (2020年4月10日アクセス).
- 6) 今川絵里, 紺野沙織, 澤田可奈, ほか. 梅毒検査試薬「メディエースRPR」および「メディエースTPLA」の基本性能に関する検討. 日本臨床検査自動化学会誌 2011;36:374-9.
- 7) 高橋祐輔, 梅森祥央, 岡本晃光, ほか. 梅毒検査試薬「LASAYオートTPAb」および「LASAYオートRPR」の基本性能に関する検討. 日本臨床検査自動化学会誌 2013;38:214-20.
- 8) 小林一三, 和久井萌, 山本裕之, ほか. ラテックス凝集法によるリコンビナント抗原を用いた梅毒TP抗体試薬の検討. 医学検査 2014;63:745-52.
- 9) 伊藤敦巳, 新関紀康, 黒瀬 瞳, ほか. ラテックス凝集法による4種のTP抗体測定試薬の基本性能の評価と判定不一致検体の精査. 臨床病理 2015;63:25-31.

高感度 HBs 抗原測定試薬 「ルミパルスプレスト HBsAg-HQ」の性能評価

Performance Evaluation of High-Sensitivity HBs Antigen Immunoassay “Lumipulse Presto HBsAg-HQ”

重満千春¹⁾²⁾ 森本隆行¹⁾²⁾ 山崎真一¹⁾²⁾ 横崎典哉¹⁾

Abstract We conducted a performance evaluation of the high sensitivity HBs antigen immunoassay, Lumipulse Presto HBsAg-HQ (HBsAg-HQ). Within-run and between-day reproducibility were both favorable. Limits of quantitation were also considerably lower than the acceptance criteria, and our methods were 8–16 times more sensitive than the control methods. Moreover, our correlation data showed that our methods tend to higher than the control methods. While eight determination inconsistencies were confirmed, all of them tested positive as used our methods and were deemed as specific reactions. Our methods showed positive more rapidly for reactivated HBV than the control methods, and we also confirmed control test-negative/HBsAg-HQ test-positive cases with resolved HBV infection group; these results suggest that our method provides a particularly useful avenue for identifying de novo hepatitis cases. Effects of specimen contamination were tested given the highly sensitive nature of HBsAg-HQ, but no effect was observed—all samples that tested negative were confirmed to be negative.

Key words Lumipulse, high sensitivity, HBs Antigen, HBsAg-HQ, CLEIA

1. はじめに

HBs 抗原は B 型肝炎ウイルス (HBV) の表面に存在する抗原であり、血中には Dane 粒子のほかに中空粒子、小型球形粒子、管状粒子として存在している。従来は HBV 感染の診断マーカーとして測定されていたが、近年は予後や治療効果判定に HBs 抗原定量値が有用とされ¹⁾²⁾、HBV 持続感染者に対する抗ウイルス療法の長期目標は「HBs 抗原消失」とされている³⁾。また、HBV は HBs 抗原が陰性化した後も肝細胞内に HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) として残存するため、HBV キャリアのみならず HBV 既往感染者においても免

疫抑制や化学療法により HBV が再活性化し肝炎 (de novo 肝炎) を発症することがあり、劇症肝炎例も報告されている。厚生労働省の肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究班では「免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策ガイドライン」(以下ガイドライン、現在は日本肝臓学会肝炎診療ガイドライン作成委員会が編集)を作成し、HBs 抗原のスクリーニング検査は高感度の測定法を用いて検査することが望ましいとしている³⁾。

今回われわれは、全自動免疫発光測定装置「ルミパルス Presto II」を用いて、化学発光酵素免疫測定法を原理とした高感度 HBs 抗原測定試薬「ルミパルスプレ

Received May. 11, 2020; Accepted Jul. 14, 2020
Chiharu SHIGEMITSU¹⁾²⁾, Takayuki MORIMOTO¹⁾²⁾,
Shinichi YAMAZAKI¹⁾²⁾, Michiya YOKOZAKI¹⁾

¹⁾ 広島大学病院検査部
Department of clinical laboratory, Hiroshima
University Hospital

²⁾ 広島大学病院診療支援部
Department of Clinical Practice and Support,

Hiroshima University Hospital
〒734-8551 広島県広島市南区霞 1 丁目 2-3
1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima,
734-8551 Japan
連絡責任者：重満千春
TEL：082-257-5550
E-mail：shiba929@hiroshima-u.ac.jp

トHBsAg-HQ」の性能評価を行ったので報告する。

2. 対象検体と測定法

1) 対象検体

広島大学病院検査部に提出された患者検体99例および、HBV既往感染者検体51例を対象とした(保存検体)。なお、本検討は広島大学疫学倫理審査の承認を得て施行した(承認番号第E-509)。

2) 評価試薬

ルミパルスプレストHBsAg-HQ(以下PRESTO, 富士レリオ株式会社)

3) 測定装置

ルミパルスPresto II(富士レリオ株式会社)

4) 測定原理と特長

本試薬は2ステップサンドイッチ法を採用した化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)を原理としている。

キュベットに処理液と抗HBs抗体結合フェライト粒子と検体を分注、攪拌し第一反応を行う。B/F分離後アルカリフォスファターゼ標識抗HBs抗体を分注、攪拌し第二反応を行う。B/F分離後に化学発光基質AMPPDを分注、攪拌し酵素反応を行う。酵素による基質の分解で生じる発光量を求め、検量線より検体中のHBs抗原濃度を求める。

本法は界面活性剤を含む処理液によりHBV粒子や小型球型粒子等を破壊し、粒子膜の外側エピトープを認識するHBs抗体に加えて、粒子膜の内側エピトープを認識するHBs抗体も採用してHBs抗原を捕捉している。その

ため、escape変異などの影響を受けにくいという特長があり、陽性判定基準値0.005 IU/mLと高感度化を達成している⁴⁾。

5) 対照試薬

- (1) アーキテクトHBsAg QT・アボット(現行試薬)(以下ARCHI, アボットジャパン株式会社)
- (2) HISCL HBsAg試薬(以下HISCL, シスメックス株式会社)

評価試薬と対照試薬の仕様はTable 1に示す。

6) その他の試薬

- (1) HBs抗原抑制試験用試薬: ルミパルスプレストHBsAg-HQ抑制試薬(富士レリオ株式会社)
- (2) HBs抗体: アーキテクト オーサブ・アボット(アボットジャパン株式会社)
- (3) HBe抗原: アーキテクト HBeAg・アボット(アボットジャパン株式会社)
- (4) HBe抗体: アーキテクト HBeAb・アボット(アボットジャパン株式会社)
- (5) HBc抗体: ルミパルスプレストHBcAb-III(富士レリオ株式会社)
- (6) HBV-DNA: コバス TaqMan HBV「オート」v2.0(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)

3. 検討内容

1) 再現性

LPコントロール・HBsAg(陰性1・陽性2濃度, 富士レリオ)およびプール検体(2濃度)計5種類の試料を使

Table 1 Product summary

	評価試薬	対照試薬 1 (現行法)	対照試薬 2
販売名	ルミパルスプレスト HBsAg-HQ	アーキテクトHBsAg QT・アボット	HISCL HBsAg試薬
販売元	富士レリオ	アボットジャパン	シスメックス
測定装置	ルミパルス Presto II	Architect i2000SR	HISCL 2000i
検体サンプリング方式	ディスプレイチップ方式	プローブ方式	ディスプレイチップ方式
測定原理	CLEIA	CLIA	CLEIA
	2step sandwich assay (検体処理有り)	2step sandwich assay	2step sandwich assay
使用抗体(固相/標識)	モノクロー2種/モノクロー2種	モノクロー2種/ポリクロー	モノクロー多種/モノクロー多種
検体量	90 µL	75 µL	20 µL
判定基準	陰性<0.005 IU/mL≤陽性	陰性<0.05 IU/mL≤陽性	陰性<0.03 IU/mL≤陽性
測定範囲	0.001~150 IU/mL 自動希釈可	0.00 ~250 IU/mL (手希釈)	0.00 ~2500 IU/mL 自動希釈可
反応時間	20 min	30 min	17 min

用した。各試料を、同時再現性は連続10回測定し、日差再現性は1日2回測定を5日間繰り返す、変動係数 (CV) を求めた。

2) 感度試験

①検出限界 (Limit of Detection ; LoD)

低濃度試料の希釈系列を作製し、0濃度キャリブレーションと各試料を各々10回連続測定し±3SD法で評価した。

②定量限界 (Limit of Quantitation ; LoQ)

低濃度試料の希釈系列を作製し、各々10回連続測定して得られた平均測定値と変動係数 (CV) で近似曲線を作成、測定値CVが10%となる定量限界を求めた。

③希釈による感度比較試験

HBs抗原低濃度陽性3試料をHBs抗原およびHBs抗体陰性プール検体を用いて2n希釈し、PRESTOおよびARCHIで同時2重測定し、感度および変動係数 (CV) を比較した。

3) 相関性

99例の検体について、対照法である2法と定量及び定性の相関性を検討した。判定不一致例についてはHBs抗体添加による抑制試験を実施した。また、ルーチン検査時の他関連マーカーも参考にして評価した。

4) HBV既往感染者群での有用性検証

免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策での有用性を検証する目的で、HBV既往感染者群 (現行法ARCHI HBs抗原陰性かつHBc抗体陽性、HBs抗体陰性～低値陽性例) を51例抽出してPRESTOの有用性を検証した。

5) 検体コンタミネーションの影響検証

高感度ゆえ、検体コンタミネーションのリスクが心配されるため、採血から結果出力までの工程で高濃度検体からのコンタミネーションの有無を確認した。

以下が当院検査部感染症検査の運用である。

(1) 採血：感染症項目専用採血管を用いて採血

テルモ ベノジェクトII フィルムシール栓タイプ VP-AS104K / 青 / 採血量 4 mL / 15.6 × 100 mm / サイズ 10 mL

(2) 血清分離：遠心機にて3000rpmで10分遠心

(3) 開栓：遠心機内の検体を1本ずつ取り出し、人の手で採血管のシール剥し

(4) ラックセット：シールを剥した採血管を測定用検体ラックに人の手で1本ずつセット

※感染症項目は他の項目とは別採血管 (親検体) で測定、搬送および分注機は未使用

(5) 測定：各測定装置で測定

検証には以下の試料を使用した。

試料A：高濃度検体 (約20万IU/mLの精製HBs抗原液) を実際の採血管にて規定量の採血量4 mLを吸引後、転倒混和する。

試料B：陰性検体の代用として検体希釈液を4 mL分注したチューブを24本準備する。

試料A・Bを上記②～⑤の運用で測定する。

試料Bの中央に試料Aを並べ1セット (25テスト) とし、3日間で計16セット (400テスト) 測定し影響を確認した。

4. 結果

1) 再現性

同時再現性は、陰性試料は全て0.001 IU/mL未満 (陰性) を示し、陽性試料の変動係数は1.4～2.4%であった。日差再現性は、陰性試料は全て0.001 IU/mL未満 (陰性) を示し、陽性試料の変動係数は1.0～4.2%であった (Table 2)。

2) 感度試験

(1) 検出限界 (LoD)

±3SD法で評価した結果、検出限界は0.00088IU/mLであった (Fig. 1)。

(2) 定量限界 (LoQ)

測定値CVが10%となる定量限界は、0.00097 IU/mLであった (Fig. 2)。

(3) 希釈による感度比較試験

PRESTOはARCHIより8～16倍高感度であった。陽性域の変動係数比較では、ARCHIの0.0～28.3%に対し、PRESTOは0.0～10.9%であった。感度差があるためARCHI陽性域に限定して同一試料範囲で比較すると、ARCHIの0.0～28.3%に対しPRESTOは0.0～3.6%と、PRESTOではカットオフ近辺のデータにおいても、良好な結果が得られた (Table 3)。

Table 2 Reproducibility

Within-Run (n=10)	LP control・HBsAg			Pool serum	
	Level1 (Negative)	Level2	Level3	L	H
Mean(IU/mL)	0.001	0.176	25.398	5.054	57.683
SD	0.0000	0.0029	0.4371	0.0728	1.3573
CV(%)	0.0	1.7	1.7	1.4	2.4

Between-Day (n=2 x 5days)	LP control・HBsAg			Pool serum	
	Level1 (Negative)	Level2	Level3	L	H
Mean(IU/mL)	0.001	0.189	28.575	33.638	94.786
SD	0.0000	0.0021	0.2977	1.4003	2.2382
CV(%)	0.0	1.1	1.0	4.2	2.4

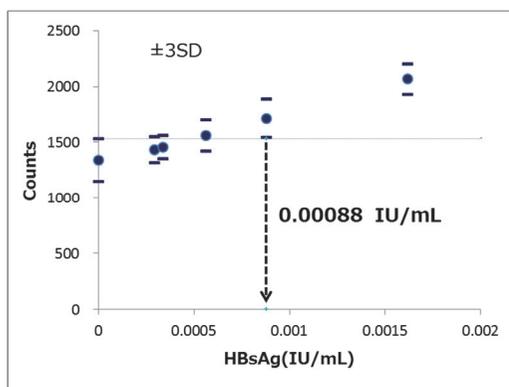


Fig. 1 Limit of Detection (LoD)

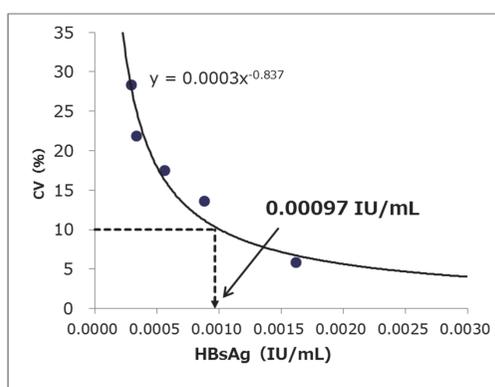


Fig. 2 Limit of Quantitation (LoQ)

Table 3 Comparison of sensitivity by dilution

		(IU/mL)											CV of positive area	
sample①	Dilution	x1	x2	x4	x8	x16	x32	x64	x128	x256	x512	x1024	Min	Max
ARCHI	n.1	4.61	1.69	0.81	0.43	0.24	0.07	0.04	0.04	0.00	0.00	0.00		
	n.2	4.31	1.41	0.73	0.41	0.18	0.10	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00		
	Mean	4.46	1.55	0.77	0.42	0.21	0.09	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00		
	CV	4.8%	12.8%	7.3%	3.4%	20.2%	25.0%	--	--	--	--	--	3.4%	25.0%
PRESTO	n.1	4.394	1.731	0.878	0.438	0.220	0.121	0.058	0.029	0.015	0.007	0.004		
	n.2	4.464	1.744	0.854	0.445	0.224	0.115	0.057	0.028	0.014	0.008	0.004		
	Mean	4.429	1.738	0.866	0.442	0.222	0.118	0.058	0.029	0.015	0.008	0.004		
	CV	1.1%	0.5%	2.0%	1.1%	1.3%	3.6%	1.2%	2.5%	4.9%	9.4%	--	0.5%	9.4%
													16times difference	
sample②	Dilution	x1	x2	x4	x8	x16	x32	x64	x128	x256	x512	x1024	Min	Max
ARCHI	n.1	1.18	0.40	0.20	0.10	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
	n.2	1.26	0.37	0.25	0.10	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
	Mean	1.22	0.39	0.23	0.10	0.05	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
	CV	4.6%	5.5%	15.7%	0.0%	28.3%	--	--	--	--	--	--	0.0%	28.3%
PRESTO	n.1	0.761	0.278	0.134	0.070	0.036	0.018	0.009	0.005	0.003	0.001	<0.001		
	n.2	0.785	0.280	0.140	0.071	0.036	0.018	0.009	0.005	0.002	0.001	<0.001		
	Mean	0.773	0.279	0.137	0.071	0.036	0.018	0.009	0.005	0.003	0.001	<0.001		
	CV	2.2%	0.5%	3.1%	1.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	--	--	0.0%	3.1%
													8times difference	
sample③	Dilution	x1	x2	x4	x8	x16	x32	x64	x128	x256	x512	x1024	Min	Max
ARCHI	n.1	1.91	1.01	0.57	0.27	0.14	0.04	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00		
	n.2	1.99	1.03	0.60	0.27	0.12	0.06	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00		
	Mean	1.95	1.02	0.59	0.27	0.13	0.05	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00		
	CV	2.9%	1.4%	3.6%	0.0%	10.9%	28.3%	--	--	--	--	--	0.0%	28.3%
PRESTO	n.1	1.551	0.796	0.396	0.197	0.101	0.050	0.026	0.013	0.007	0.003	0.002		
	n.2	1.568	0.775	0.399	0.198	0.101	0.050	0.025	0.013	0.006	0.003	0.002		
	Mean	1.560	0.786	0.398	0.198	0.101	0.050	0.026	0.013	0.007	0.003	0.002		
	CV	0.8%	1.9%	0.5%	0.4%	0.0%	0.0%	2.8%	0.0%	10.9%	--	--	0.0%	10.9%
													8times difference	

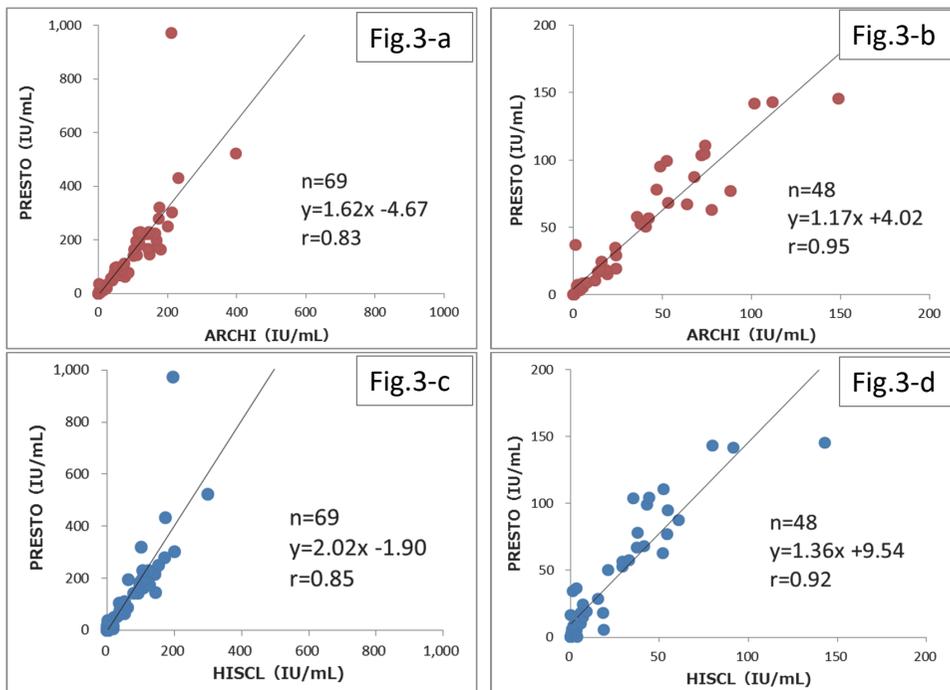


Fig.3-a. all positive samples (n=69)
 Fig.3-b. Within measurement range (n=48)
 Fig.3-c. all positive samples (n=69)
 Fig.3-d. Within measurement range (n=48)

Correlation between ARCHI and PRESTO
 Correlation between ARCHI and PRESTO
 Correlation between HISCL and PRESTO
 Correlation between HISCL and PRESTO

Fig. 3 Correlation between methods of positive samples

3) 相関性

(1) 定量相関性 (Fig. 3)

99例中3法とも陽性検体69例の相関性は、ARCHIとの比較では回帰式 $y=1.62x - 4.67$ $r=0.83$ (Fig. 3-a), HISCLとの比較では $y=2.02x - 1.90$ $r=0.85$ (Fig. 3-c), 3法とも測定レンジ内の48例の相関性は、ARCHIとの比較では $y=1.17x+4.02$ $r=0.95$ (Fig. 3-b), HISCLとの比較では $y=1.36x+9.54$ $r=0.92$ (Fig. 3-d)と本法が高値傾向を示した。3法とも陽性ではあるが大きく乖離した例が2例確認された。1例目は、ARCHI 210 IU/mL, HISCL 195 IU/mL, PRESTO 972 IU/mLであったが、検体量不足により原因解析はできなかった。2例目はARCHI 0.97 IU/mL, HISCL 3.11 IU/mL, PRESTO 36.807 IU/mLであった。これについてはPRESTOの希釈試験を実施したが問題となる結果はみられなかった。

(2) 定性一致率

ARCHIおよびHISCLとの99例における定性一致率

(Table 4) では、計8例の判定不一致が認められた (Table 5)。8例ともPRESTOは陽性であり、PRESTO単独陽性4例、ARCHI単独陰性2例、HISCL単独陰性2例であった。検体量不足の1例(A)を除く7例についてPRESTOの抑制試験(HBs抗体添加による確認試験、基準: 50% ≤ 陽性)を実施したところ、いずれも78%以上の抑制率が得られ「陽性」が確認された。PRESTO単独陽性4例(A~D)については、A~CはARCHIが0.03~0.04 IU/mLと高めの陰性を示し、HB関連マーカーにおいては、AはHBe抗体陽性、CはHBe抗原が陽性、DはHBV-DNAが感度以下のシグナル検出であった。症例Bについては時系列データを示す (Table 6)。59歳 女性 子宮頸癌の患者で手術前検査としてHBs抗原を検査したがARCHI (現行法、基準値0.05 ≤ 陽性) では0.03 IU/mLと陰性判定だった。13日後にがん摘出術を施行し、約1ヶ月後化学療法前のHBVスクリーニング検査でARCHI HBs抗原は0.05 IU/mLと陽転化した。更に5日後に実施したHBV-DNA検査も陽性を呈し、HBV

Table 4 Correlation of Qualitative results

		ARCHI		
		+	-	total
PRESTO	+	69	6	75
	-	0	24	24
	total	69	30	99

match rate : 93.9 %

		HISCL		
		+	-	total
PRESTO	+	69	6	75
	-	0	24	24
	total	69	30	99

match rate : 93.9 %

		ARCHI		
		+	-	total
HISCL	+	67	2	69
	-	2	28	30
	total	69	30	99

match rate : 96.0 %

Discrepancy of the results 8 cases

PRESTO single positive 4 cases
 ARCHI single negative 2 cases
 HISCL single negative 2 cases

Table 5 Eight discrepancy results in confirmation test and Hepatitis B virus related markers

Patient ID	HBsAg(IU/mL)			PRESTO Confirmation test		Hepatitis B virus related markers etc
	ARCHI	HISCL	PRESTO	Inhibition rate %	Judgment	
	0.05≤+	0.03≤+	0.005≤+	50≤+		
A	0.04	0.01	0.106		Not tested※	HBeAb(+), HBVDNA(not detected)
B	0.03	0.00	0.042	86%	positive	Data before the operation, More detailed data available in Table 6
C	0.03	0.01	0.060	90%	positive	HBeAg(+), HBVDNA(not detected)
D	0.01	0.00	0.030	78%	positive	HBVDNA <2.1 detected
E	0.01	0.05	0.204	94%	positive	HBeAb(-)
F	0.03	0.07	0.173	81%	positive	HBeAb(+), HBVDNA(not detected)
G	0.53	0.02	0.465	85%	positive	HBeAb(+), HBVDNA(not detected)
H	0.11	0.02	0.112	83%	positive	HBVDNA(not detected)

※Not tested due to the limited sample volume

感染既往からの再活性化症例と判断された。患者は肝臓内科にコンサルトされ、核酸アナログ投与下での化学療法が施行された。本検討では、手術前検査の段階で、PRESTOは0.042 IU/mL（基準値0.005≤陽性）、抑制試験での抑制率86%と陽性判定、HISCLは0.00 IU/mL（基準値0.03≤陰性）と陰性判定であった

4) HBV 既往感染者群での評価試薬の有用性検証

HBV 既往感染者（現行法 ARCHI HBs 抗原陰性かつ HBe 抗体陽性、HBs 抗体陰性～低値陽性例）51 例中 PRESTO では 3 例が陽性を呈した。抑制試験の結果、1 例

は抑制率0%で非特異反応の判定であったが、2例は76%と79%で特異反応（陽性）の判定であった。2例の測定値は0.018 IU/mL、0.022 IU/mLと ARCHI では基準値未満の高感度領域の検体であった（Table 7）。

5) 検体コンタミネーションの影響確認

約20万IU/mLの高濃度試料と検体希釈液を日常検査の運用で16セット（計400テスト）測定した結果、検体希釈液の測定値は全て陰性判定であり、コンタミネーションによる偽陽性は確認されなかった。

Table 6 Time series data of Patient B

59Y Female cervical cancer
(HBV reactivation case)

Patient ID B	date	JAN.18	JAN.31	FEB.22	FEB.27	APR.11	MAY.8	JUNE.19	
	Judgment criteria	before operation	operation	before chemotherapy	additional inspection	Consultation with a hepatologist			
HBsAg (ARCHI) (IU/mL)	0.05 ≤ +	0.03 -		0.05 +	0.10 +	Chemotherapy under nucleic acid analog administration			
HBsAb (mIU/mL)	10.0 ≤ +			5.3 -					
HBcAb (C.O.I.)	1.0 ≤ +			200.0 +					
HBeAg (S/CO)	1.0 ≤ +	HISCL : 0.00 -			0.24 -				
HBeAb (IHN%)	50.0 ≤ +	PRESTO : 0.042 +			98.2 +				
HBV-DNA (LC/mL)	2.1 ≤ +				2.3 +	3.1 +	3.6 +	2.8 +	

Table 7 Three discrepancy results in HBV infected anamnestic 51 person

Patient ID	HBsAg				HBsAb	HBcAb
	ARCHI	PRESTO	PRESTO Confirmation test		ARCHI	PRESTO
	IU/mL		Inhibition rate %	Judgment	mIU/mL	C.O.I.
	0.05 ≤ +	0.005 ≤ +	50 ≤ +		10.0 ≤ +	1.0 ≤ +
I	0.00	0.018	76%	positive	0.0	165.5
J	0.00	0.006	0%	negative	4.1	55.1
K	0.00	0.022	79%	positive	0.2	178.1

5. 考察

今回われわれは、高感度HBs抗原定量試薬『ルミバルスプレスト HBsAg-HQ』の性能を評価し、他社試薬との比較検討や検体コンタミネーションの影響を検証した。

同時再現性は3%以下、日差再現性は5%以下であった。定量限界 (CV 10%) は0.00097 IU/mLと判定基準0.005 IU/mLを大きく下回る良好な結果が得られた。希釈による感度比較では対照試薬に比較し8倍から16倍の感度差が確認され、カットオフ近辺の高感度領域検体の変動係数も良好な結果が得られた。

患者検体99例における相関性においては、対照試薬に比べ大きく高値に乖離した例がみられた。本法は検体処理と使用している抗体の特性から、変異やHBs抗体の影響を受けにくい特長がある。今回の乖離の原因が使用している抗体や測定系の差によるものかなどの解析については今後の課題である。

定性一致率では8例で本法陽性／他法陰性の判定不一致

が認められた。抑制試験や他のHBV関連マーカーの結果から、いずれも本法の特異的反応と推察された。本法単独陽性の症例Bは、子宮頸癌の手術前検査で現行法HBs抗原は陰性だったが、約1ヶ月後の化学療法前のスクリーニング検査で陽転化した。その後追加検査を実施し肝臓内科へコンサルトされたが、本法は手術前検査の段階で「陽性」であり、本法で測定できていれば早い段階で肝臓内科へコンサルトができていたこととなる。

de novo肝炎対策における有用性検証のためHBV既往感染群を評価した結果、51例中3例の陽性例が確認された。1例は偽陽性の可能性が高かったが2例は特異的反応であり、その測定値は0.018 IU/mL、0.022 IU/mLと高感度領域のため対照試薬では検出することができず、本法の有用性が確認された。

ガイドラインでは、HBs抗原をスクリーニング検査し、陰性の場合はHBs抗体およびHBc抗体を検査することでHBV感染既往の有無を確認するフローとなっている。しかし、診療科によっては抗体検査の実施率が低いことが報告

されている⁵⁻⁶⁾。また、既に治療中の場合は抗体価が低下している場合などがあり、リスク回避のために最初のHBs抗原スクリーニングの検出感度は重要と考えられる。HBV再活性化症例では、本法とHBV-DNAが同時に陽転化した例も報告されており⁸⁾、今後の臨床的有用性の報告が期待される。

HBs抗原測定試薬の臨床ニーズは高感度が望まれている一方で、数十万IU/mLという高濃度検体が存在しうるため高感度化するほど検体コンタミネーションのリスクを伴う。本法の測定装置「ルミパルスPresto II」の検体サンプリングはディスプレイプルチップ方式であるが、採血から結果出力までの全体の工程での影響有無を検証するため、実際の採血管を使用し日常検査の運用にあわせて検体コンタミネーションの影響を確認した。約20万IU/mLの高濃度試料と陰性試料を3日間計400テスト測定した結果、陰性試料は全て陰性の結果が得られ、検体コンタミネーションの影響は認められなかった。当院の検査室では、感染症検査用の採血管は搬送ラインや自動開栓機は使用せず、他の検体への飛散が無いよう細心の注意を払いながら1本ずつ手で開栓を行う運用にてリスク回避ができていたことが確認された。

6. 結語

「ルミパルスプレストHBsAg-HQ」の再現性、定量限界、対照試薬との希釈による感度比較は良好であった。カットオフ近辺の高感度検体の再現性も優れており信頼できる試薬と言える。HBV既往感染者群でも高感度である本法の有用性が確認された。実際にHBV再活性化した症例において対照試薬よりも早期に陽性が確認されたことにより、HBV再活性化による肝炎対策にも有用性が高い検査法であると考えられた。また、当院の検査室の運用において検

体コンタミネーションのリスクは十分に回避ができており、高感度試薬導入も問題のないことが確認された。

本研究結果の要旨は日本臨床検査自動化学会第50回大会において発表した。

COI：本研究は富士レジオ株式会社を受託研究経費により施行された。

文 献

- 1) 田中榮司, 松本晶博, 鈴木義之ほか. 核酸アナログ薬中止に伴うリスク回避のための指針2012-厚生労働省「B型肝炎の核酸アナログ薬治療における治療中止基準の作成と治療中止を目指したインターフェロン治療の有用性に関する研究」の報告-. 肝臓 2012;53:237-242
- 2) 西口修平. HBs抗原の測定法と臨床的意義. 肝臓 2014;55:310-324
- 3) 日本肝臓学会肝炎診療ガイドライン作成委員会編. B型肝炎治療ガイドライン第3.1版. 2019年3月
- 4) 青柳克己. 高感度HBs抗原測定試薬「ルミパルスHBsAg-HQ」の開発. 臨床化学 2018;47:268-280
- 5) 沼田泰尚, 佐々木基, 石上敬介ほか. 当院におけるステロイド投与におけるB型肝炎再活性化への対応の状況と再活性化例への検討. 肝臓2018;59:Supplement(1) A323
- 6) 的野智光, 永原欄, 松木由佳子ほか. 当院におけるde novo B型肝炎による再活性化の実態. 肝臓2018;59:Supplement(1) A493
- 7) 浦田幸朋, 竹本啓伸, 中村吉秀ほか. 間接リウマチにおけるB型肝炎の適切なスクリーニング時期. 消化器内科. 2013;57:591-599
- 8) 田中靖人. ウイルス性肝炎最新治療～C型肝炎の克服とB型肝炎の再興～. 臨床病理 2016;64:211-218

フィブリノゲン測定における凝固点下限チェック設定の有用性 ～フィブリノゲン偽低値の検出ツール～

Usefulness of Checking Coagulation Point Lower Limit in Fibrinogen Measurement
～ Fibrinogen False Low Detection Tool ～

下村大樹 嶋田昌司 松尾収二 上岡樹生

要旨 全自動血液凝固分析装置コアプレスタ2000は、aPTTのアーリーリアクションエラー対策として凝固点下限チェック機能を有している。当院では当該機能をFbgにも設定することにより、Fbgが偽低値を示した5症例を経験した。TC試薬による5症例の測定値は26～135mg/dLで、反応曲線が2相性あるいは直線的で凹凸を有する形状であった。それらの検体をCG試薬で測定したところ、187～324 mg/dLと大幅に高く、通常みられるシグモイド曲線の形状であった。凝固点下限チェック機能はaPTT以外の項目にも応用することにより、測定値の検証ツールになることが示唆された。

Key words fibrinogen, clotting point lower limit check, early reaction error

はじめに

フィブリノゲン (Fibrinogen : Fbg) はトロンビンの作用によりフィブリンに転換する血栓形成の中心的役割を担う蛋白で、出血あるいは血栓傾向のスクリーニング検査として用いられている。フィブリノゲン濃度測定法には、トロンビン時間法 (Clauss法) とプロトロンビン時間 (prothrombin time : PT) 同時測定法 (PT-derived法) があり¹⁻²⁾、測定装置の原理としては光学的方法が多く用いられている。光学的方法の留意点として、アーリーリアクションエラーによる凝固点の誤検出がある。活性化部分トロンボプラスチン (activated partial thromboplastin time: aPTT) のアーリーリアクションエラーは、本来の凝固反応が後にあるにもかかわらず、凝固反応初期の緩やかな散乱光の上昇を凝固反応と捉えて凝固点を検出するため、本来よりも短い凝固時間が算出される (Fig. 1)。光学的反応にて凝固点を求める血液凝固分析装置には、それぞれアーリーリアクションエラーを防ぐための機能が搭載されており、コアプレスタ

2000 (積水メディカル社) では凝固点下限チェック機能が該当する。

当院では、aPTT以外にPTおよびフィブリノゲン (Fibrinogen:Fbg) にも凝固点下限チェックを設定し、各測定における光学的反応の良否に利用している。今回、Fbgの偽低値がみられた5症例をもとに、その有用性について報告する。

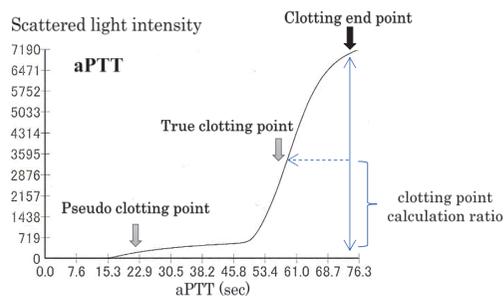


Fig. 1 The case that caused an early reaction error

Received Jun. 26, 2020; Accepted Aug. 5, 2020
Daiki SHIMOMURA, Masashi SHIMADA, Shuji MATSUO, Mikio KAMIOKA
天理よろづ相談所病院 臨床検査部
Department of Laboratory Medicine, Tenri Hospital

〒632-8552 奈良県天理市三島町200
200 Mishima-cho, Tenri, Nara 632-8552, Japan.
Corresponding author : 下村大樹
Tel : 0743-63-5611 (内線7441)
E-mail : dshimomura@tenriyoroze.jp

2. 材料および方法

1) 凝固点下限チェック機能

コアプレスタ2000は、凝固時間法を用いる測定項目に対し、項目マスタの反応過程画面にて凝固点下限チェック機能を有し、処理値（秒数：sec）とプロファイル値（散乱光強度）をそれぞれ4ポイントまで設定できる（Fig. 2a）。凝固点が設定値を下回った場合には異常反応として捉え、測光時間を自動延長することによって再度凝固点を計測する。その後、散乱光強度が再上昇して新たな凝固点が検出されれば、適切な測定値が得られ、正常終了する。しかし、新たな凝固点が検出されなければ“イジヨウP”が表示される（Fig. 2b）。当院におけるFbgの凝固点下限チェックは、処理値とプロファイル値をそれぞれ8.0と300、200.0と300と設定している。これにより、測光時間8~200secの間に凝固点の散乱光強度が300を下回った場合に凝固点下限チェックが機能す

る（Fig. 3）。この設定は、当院で日常業務に用いているトロンボチェックFib（L）試薬（TC）（Sysmex）に適用している。なお、コアプレスタ2000における凝固点の検出は精密なプログラムにより散乱光強度の上昇割合が一定になった時点を凝固終了点とし、凝固終了点からの割合（非公開）で凝固点を算出している（Fig. 1）。

2) フィブリノゲン濃度と最大散乱光強度の相関性

対象は、2019年8月にFbg測定の依頼があり、“イジヨウP”をはじめとするデータアラームが表示されなく、TC試薬を用いたFbg濃度100 - 600 mg/dLを示したクエン酸Na加血漿 37検体を無作為に抽出した。抽出した検体はエッペンドルフチューブに分注し、-75℃に保存した。測定時に37℃5分間で溶解し、Clauss法の試薬であるTC試薬とコアグピアFbg試薬（CG）（積水メディカル）にてFbg濃度を測定し、両者の相関性ならびにFbg濃度と最大散乱光強度の相関性を調べた。

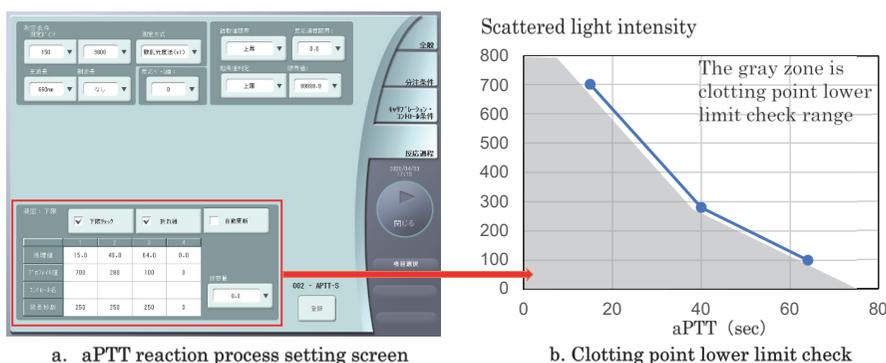


Fig. 2 aPTT reaction process setting screen and clotting point lower limit check
 Fig. 2a. aPTT reaction process setting screen
 Fig. 2b. Clotting point lower limit check



Fig. 3 Fibrinogen reaction process setting screen

3) Fbgに“イジョウP”が付いた5症例の検索

2019年4月から11月の期間でTC試薬を用いたFbg測定にて“イジョウP”が表示され、Fbg濃度低値の要因を認めなかった5症例について、それらのクエン酸Na加血漿をCG試薬で測定し、フィブリノゲン濃度ならびに凝固曲線を比較した。また、5症例の疾患および投薬について調査した。

3. 結果

1) フィブリノゲン濃度と最大散乱光強度の相関性

TC試薬とCG試薬のFbg濃度の相関は $rs=0.983$ と良好、回帰直線は $y=1.21x - 16.83$ であり、CG試薬が1.0~1.3倍高い値を示した (Fig. 4)。TC試薬のFbg濃度と最大散乱光強度の相関性 ($rs=0.800$) (Fig. 5a) およびCG試薬のFbg濃度と最大散乱光強度の相関性 ($rs=0.924$) はいずれも良好であった (Fig. 5b)。

2) Fbgに“イジョウP”が付いた5症例の検索

TC試薬を用いた5症例 (No.①~⑤) のFbgは、それ

ぞれ135, 112, 26, 106, 174 mg/dLで、反応曲線が2相性あるいは直線的で凹凸を有する形状であり、通常みられるシグモイド曲線の形状と明らかに異なった (Fig. 6)。凝固終了点に近似する最大散乱光強度はそれぞれ341, 331, 338, 278, 325と低く、凝固点の散乱光強度が300を下回ったため、“イジョウP”が表示された。それらをCG試薬で測定すると、それぞれ244, 324, 187, 223, 282 mg/dLとTC試薬に比べ1.6~7.2倍高く (Fig. 4a), 反応曲線がシグモイド状であり、“イジョウP”は表示されなかった。散乱光強度はそれぞれ1390, 1450, 1552, 1048, 3250とTCの3.8~10倍であった。

5症例のFbg濃度と最大散乱光強度の比較において、TC試薬ではFbg濃度に比べ最大散乱光強度が低かった (Fig. 5a)。一方、CG試薬には大きな乖離を認めなかった (Fig. 5b)。

5症例の基礎疾患および投与薬剤はいずれも異なっていた。症例①は“イジョウP”が表示された時期が2週間の期間に提出された検体のみであり、その前後に提出さ

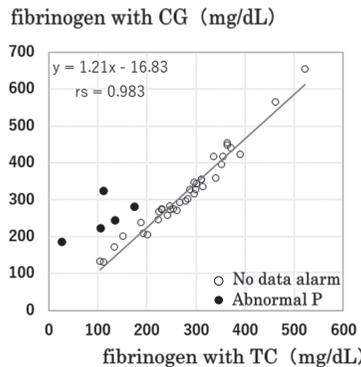


Fig. 4 Correlation of fibrinogen concentration

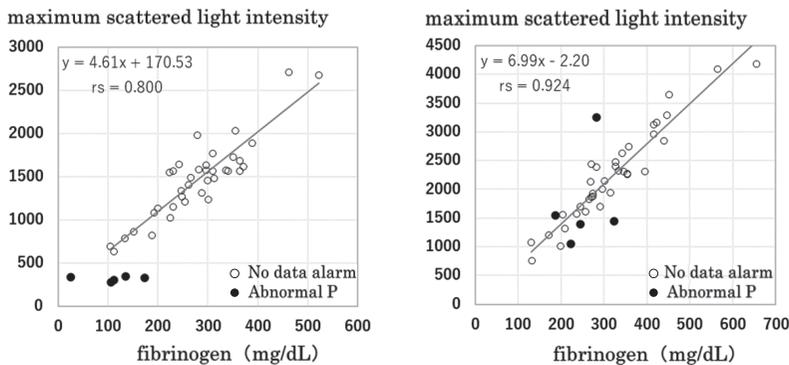


Fig. 5 Correlation between fibrinogen concentration and maximum scattered light intensity

Fig. 5a. TC reagent

Fig. 5b. CG reagent

れた検体はシグモイド状の凝固曲線で“イジヨウP”が表示されなかった。症例⑤は入院後5日の間に提出された検体のみに“イジヨウP”が付き、それ以降はシグモイド状の凝固曲線であった。なお、2症例の“イジヨウP”が表示された期間においても投与薬剤の一致を認めなかった。

4. 考察

Fbgの測定において、大部分の施設で採用されているClauss法は、緩衝液にて希釈した血漿に一定過剰量のトロンビンを添加した後、フィブリンが析出するまでの時間が

血漿中のフィブリノゲン濃度に依存することを利用している。光学的方法を原理とする血液凝固分析装置は、フィブリンが析出する間の血漿の濁りを散乱光あるいは透過光にて計測し、光量の変化から凝固終了点を捉え、凝固時間を算出している。今回我々は、Fbgのフィブリン析出の光量変化が異常なFbg偽低値症例をコアプレスタ2000のアーリーリアクションエラー対策機能を用いて検出できることを報告した。

aPTT測定時のアーリーリアクションエラーの原因は、検体中のC反応性蛋白(C-reactive protein:CRP)かつ超低

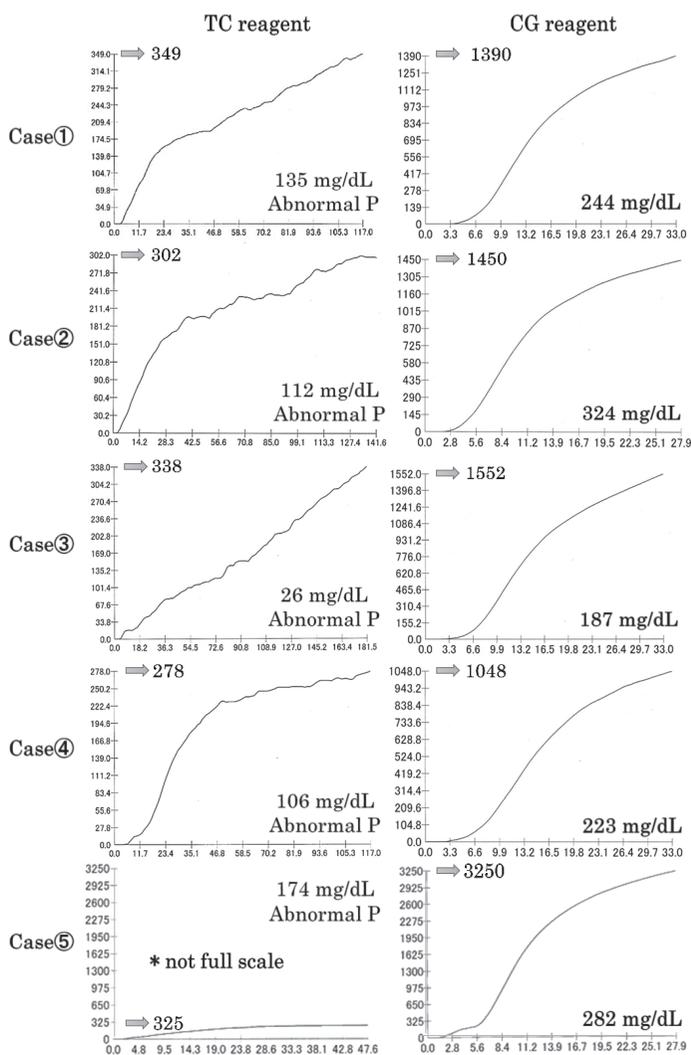


Fig. 6 Clotting reaction curve
 (➡) maximum scattered light intensity

密度リポ蛋白質 (very low-density lipoprotein : VLDL) がaPTT測定時の試薬由来のカルシウム依存的に凝集して濁りを発生させるためであると解釈されている³⁻⁴⁾。以前に我々は、PTの測定結果が、94secと短縮したワルファリン服用患者検体に遭遇した。International Normalized Ratio (INR)は0.83であった。凝固反応過程の最大散乱光強度が低かったことから、用手法で再測定したところ、PT 45.0secと延長し、INRは4.58であった。血液凝固分析装置によるPTが短縮した要因として、アーリーリアクションのような異常反応による散乱光強度の上昇を推測した。これより、aPTTと同様に光学的方法にて測定されるPT、Fbgにも異常な反応が起こる可能性があるため、凝固点下限チェックを設定した。Fbgの設定値は、TC試薬を用いた場合にFbg 100 mg/dLの最大散乱光強度が600前後であるため、その半数である凝固点は非常に低い散乱光強度であり、円滑に反応が進んでいないと考え、測定範囲内の秒数間(8~200sec)で300に設定した。

2つのFbg試薬において、Fbgに“イジョウP”が付いた5症例の反応曲線を見ると、TC試薬で2相性あるいは直線的で凹凸を有する形状であり、通常みられるシグモイド状と大きく異なった。一方、CG試薬では5症例いずれもがシグモイド状でTC試薬に比べ濃度が1.6~7.2倍高く、TC試薬による反応が異常であることが示唆された。Clauss法では、試薬や緩衝液のpH、NaCl、Ca²⁺およびトロンビン濃度がフィブリン重合反応に影響することが知られている⁵⁾。さらに、フィブリノゲン異常症の一部において、試薬中のNaCl濃度の差異によりFbg濃度に乖離を生じることが報告され、異常Fbg KyotoIV (B β 鎖111Ser欠損)におけるTC試薬、MDAフィブリクイック試薬 (Biomérieux) およびDadeトロンビン試薬 (Dade Behring) を用いた試薬のFbg濃度は、それぞれ89、156、106mg/dLを示したことが報告されている⁵⁻⁶⁾。今回、“イジョウP”が表示された5症例においても、データアラームがなかった検体に比べ、両試薬間のFbg濃度に大きな差を認めたことからFbg異常症が疑われた。しかし、Fbg抗原量ならびに遺伝子解析が未実施であるため、異常症の検証はできていない。また、症例①と⑤は“イジョウP”が表示され散乱光強度が低かったのが一定期間のみで、それ以外の期間ではシグモイド状の凝固曲線であったため、異常症の判断は困難であった。近年、Clauss法における凝固波形解析からフィブリノゲン異常症を鑑別する新たな方法が報告され⁷⁾、フィブリノゲン異常症の早期鑑別に期待される。

当院の検査システムにおいて、Fbgの確認基準 (技師が測定値を承認する基準値) は100 mg/dL以下としている。“イジョウP”が表示された5症例のうち4症例は、凝固点下

限チェックの設定をしなければ自動承認され、臨床に報告された可能性がある。Fbg濃度が基準値範囲内にあるにもかかわらず、低値と判断されれば、何らかの不必要な治療が施されたかもしれない。これより、凝固点下限チェック機能はaPTTのみでなく他の項目にも応用することにより、測定値の検証ツールになることが示唆された。

なお、今回は単一の測定装置で2試薬のみの検討であり、他の分析装置ならびにトロンビン試薬での検証ができていない。今後、それらの装置・試薬における測定への影響ならびに検証ツールについて検討する必要がある。

5. 結語

フィブリノゲンにおける凝固点下限チェックの設定は、フィブリノゲン偽低値を検出する有用なツールであり、フィブリノゲン測定が円滑に進んでいないことを発見する糸口になることを示した。

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) Clauss A. Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol.* 1957; 17:237-246.
- 2) Rossi E, Mondonico P, Lombardi A, et al. Method for the determination of functional (clottable) fibrinogen by the new family of ACL coagulometers. *Thromb Res.* 1988;52:453-68.
- 3) Dempfle CE, Borggreffe M. The biphasic transmittance waveform: an early marker of sepsis in patients with neutropenia. *Thromb Haemost.* 2008; 100:146-8.
- 4) Smith EY, Charles LA, Van Cott EM. Biphasic activated partial thromboplastin time waveform and adverse events in non-intensive care unit patients. *Am J Clin Pathol.* 2004; 121:138-41.
- 5) 奥村伸生, 寺澤文子, 廣田雅子ほか. フィブリノゲン, 検査と技術. 2008;36:707-715.
- 6) 中西加代子, 森尚子, 石田敦巳ほか. 変異フィブリノゲン Kyoto IV (B β 鎖コイルドコイル領域Ser111欠損)の発見と文献的考察. *日本検査血液学会雑誌.* 2006;7:394-400.
- 7) Suzuki A, Suzuki N, Kanematsu T, et al. Clot waveform analysis in Clauss fibrinogen assay contributes to classification of fibrinogen disorders. *Thromb Res.* 2019;174:98-103.

IFCC法に対応した新規ALPアイソザイム活性染色試薬 （クイックEP ALP-IF）に関する検討

A Study on a Novel ALP Isozyme Activity Staining Reagent (Quick EP ALP-IF)
Compatible with IFCC Method

高橋美記子¹⁾ 三田村貴史¹⁾ 町田邦光¹⁾ 坪井五三美²⁾ 星野 忠³⁾

要旨 IFCC法のALP活性測定における各ALPアイソザイム活性の反応性が適合した新規のALPアイソザイム活性染色試薬（クイックEP ALP-IF試薬）が開発されたことから、再現性、相関性と基準範囲について検討を行った。その結果、再現性はCVが7.3%以下と電気泳動法としては良好であった。相関性は各ALPアイソザイム分画値の相関係数が0.97以上と良好であった。ただし、新規試薬で測定したALP5分画は現行試薬よりも約30%低値傾向を示した。健常者348名から求めた各ALP分画の基準範囲は現行試薬と近似した値であった。ALP5分画値は男女において有意な性差を認めなかったが、血液型に関してはA・AB型群よりもB・O型群が高いという有意差（ $p<0.01$ ）を認めた。

Key words Alkaline phosphatase (ALP), Japan Society of Clinical Chemistry (JSCC), International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), ALP isozyme

1. はじめに

アルカリホスファターゼ（Alkaline phosphatase, ALP; EC 3.1.3.1）は生体の細胞膜に広く分布し、アルカリ側のpHでさまざまなリン酸化合物を分解する酵素である。糖蛋白であるALP分子には、蛋白構造や糖鎖修飾の違いから高分子肝型ALP（ALP1）、肝型ALP（ALP2）、骨型ALP（ALP3）、胎盤型ALP（ALP4）、小腸型ALP（ALP5）の5数種類アイソザイムが血中に存在する¹⁾。

日本臨床化学会（Japan Society of Clinical Chemistry, JSCC）のALP常用基準法は、リン酸供与体基質とし

て2-ethylaminoethanol (EAE) が選ばれ、各ALPアイソザイムの反応性がほぼ均一と言われている²⁾。一方、日本とアジアのごく一部地区を除く世界の多くの国では国際臨床化学連合（International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC）が推奨するリン酸供与体基質としては350 mmol/Lの2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) を用いた測定試薬で測定されている³⁾。現在のJSCC勧告法準拠試薬は1994年に勧告法の測定温度のみを37℃としたものが検査室で使用されている⁴⁾。しかし、血液型においてB、O型のSe (Fut2) が分泌型のヒトでは、疾患とは無関係に脂肪食摂取後、ALP5が20~30%程度上昇することが問題点と

Received Jun. 30, 2020; Accepted Aug. 25, 2020
Mikiko TAKAHASHI¹⁾, Takashi MITAMURA¹⁾,
Kunimitsu MACHIDA¹⁾, Isami TSUBOI²⁾, Tadashi
HOSHINO³⁾

¹⁾株式会社ビー・エム・エル総合研究所 第二検査部
血清検査課

〒350-1101 埼玉県川越市の場1361-1

BML General Laboratory, Special chemistry
department, Serology section, BML Inc, 1361-1,
Matoba, Kawagoe-shi, Saitama 350-1101

²⁾株式会社ビー・エム・エル総合研究所 第二検査部

BML General Laboratory, Special chemistry
department, BML Inc

³⁾東邦大学 理学部 臨床検査技師課程

〒274-8510 千葉県船橋市三山2-2-1

Clinical Laboratory Program, Faculty of Science, Toho
University, 2-2-1, Miyama, Funabashi-shi, Chiba 274-
8510

Corresponding author : 町田邦光

TEL : 049-232-0548 FAX : 049-232-0456

E-mail : Kunimitsu_Machida@bml.co.jp

して指摘されていた⁵⁾。一方、IFCCからは2011年に緩衝液のpHの安定化を考慮してAMPの濃度を750 mmol/Lとし、測定温度を37℃に変更したIFCC標準測定法が提示された⁶⁾。

そこでJSCCの酵素・試薬専門委員会では2012年にALP活性測定法をJSCC法からAMP濃度が750 mmol/LのIFCC法への変更に関するプロジェクトが設立されて活動が始まった。そして、2017年にその活動結果が報告され⁷⁾、2018年11月には検査関連44団体に対してALP活性測定法をIFCC法に変更する件についてパブリックコメントが求められた。その集計結果は2019年2月にJSCCのホームページに掲載され⁸⁾、JSCCの理事会とALPプロジェクトは2020年4月1日にALP活性測定法を現行のJSCC法からIFCC法に変更するが、移行までの暫定期間を1年として2021年3月31日までに終了するという結論に至った。

これに伴い、電気泳動法を用いたALPアイソザイム分析の染色試薬についてもJSCC法と各ALPアイソザイム活性の反応性がほぼ一致している現行の染色試薬⁹⁾からIFCC法と各ALPアイソザイムの反応性が適合した新規の染色試薬について2018年10月から開発が始められ、2019年3月には新規の染色試薬の開発に成功した¹⁰⁾。今回は、現行染色試薬と新規染色試薬についての比較検討成績と新規染色試薬を用いて求めた各ALPアイソザイム分画値の基準範囲について報告する。

2. 試料および方法

A. 試料

基礎的検討には、当社にALPアイソザイム検査の依頼があった残検体を連結不可能な状況とした224件の血清検体を用いた。ALPアイソザイム分画の基準範囲は、当社の健康診断受診者で同意書が得られ、かつ労働衛生安全法に基づく定期健康診断検査結果¹¹⁾をもとに産業医が健常と判断した348名（男：156名、女：192名）の血清検体を用いた。

B. 方法

1) ALP活性測定

ALP活性測定試薬は、JSCC法対応試薬としてLタイプワコー ALP・J（富士フィルム和光純薬）とIFCC法対応試薬としてLタイプワコー ALP IFCC（富士フィルム和光純薬）を用いた。キャリブレーションはJCCLS認証標準物質である常用参照標準物質（CRM 001d）を使用した。分析装置はJCA-BM 8600（日本電子）を用いてメーカー指定のプロトコールに従い分析した。

2) ALPアイソザイム分析

ALPアイソザイム活性染色試薬は、基質として3-indoxyl phosphate disodium salt、溶解液は2-amino-2-methyl-1, 3-propanediol緩衝液を用いたクイック ALP (QG) 試薬（以下、現行試薬：ヘレナ研究所）と基質として5-bromo-3-indolylphosphate-p-toluidine salt、溶解液は2-amino-2-methyl-1-propanol緩衝液を用いたクイック EP ALP-IF 試薬（以下、新規試薬：ヘレナ研究所）を使用した。ALPアイソザイム分析の支持体はアガロースゲルのクイックジェル ALP（ヘレナ研究所）を用い、230 V、23分、15℃の条件で電気泳動を行った。酵素活性染色は先に示したALPアイソザイム活性染色試薬を用いて、反応温度45℃、24分インキュベートしてnitroblue tetrazoliumで呈色させたホルマザン色素を570nmで測定した。なお、ALPアイソザイム分析の全行程は全自動電気泳動装置エバライザ2（ヘレナ研究所）を用いた。

3) 統計処理

統計ソフトはJMP Ver.14（SAS Institute Inc.）を用いた。

3. 成績

1) 再現性試験

各ALPアイソザイム分画の再現性試験は、ALP1～ALP5を含むプールした2検体を用いた。なお、日差再現性の試料は冷蔵保存して測定を行った。その結果、同時再現性（n=16）のCVは0.9～5.8%、日差再現性（n=5の10日）のCVは1.3～7.3%であったが、いずれも電気泳動法としては良好な結果であった（Table 1, 2）。

2) 相関性試験

224検体を用いて相関試験をおこなった結果、各ALPアイソザイム分画の相関係数は、0.973～0.996と良好であった。回帰式はALP1分画では $y=1.05x+0.53$ 、ALP2分画は $y=0.90x+6.74$ 、ALP3分画は $y=1.05x+1.33$ であった。一方、ALP5分画は $y=0.71x-0.36$ と現行試薬よりも新規試薬は約30%低値であった（Fig. 1）。

3) ALPアイソザイム分画の基準範囲

当社の健康診断受診者で同意書が得られ、かつ健常者と判断された348名（男：156名、女：192名）を用いて求めた新規試薬の各ALPアイソザイム分画値の基準範囲は、ALP1分画では0.1～4.7%、ALP2分画は32.6～73.1%、ALP3分画は23.1～63.0%、ALP5分画は0.2～17.6%であった（Table 3）。また、各ALPアイソザイム分画値のヒストグラムをFig. 2に示したが、中央値はALP1分画で0.8%、ALP2分画は56.2%、ALP3分画は38.4%、ALP5分画は1.5%であった。なお、統計処理はJMP Ver.14ソフトを使用してノンパラメトリック法を用いて計算した。

Table 1 Parallel run precision

Sample1	ALP1	ALP2	ALP3	ALP5
Mean(%)	10.7	71.5	13.8	4.0
SD(%)	0.50	0.62	0.36	0.20
CV(%)	4.7	0.9	2.6	4.9
Sample2	ALP1	ALP2	ALP3	ALP5
Mean(%)	6.0	57.1	33.5	3.4
SD(%)	0.32	0.75	0.82	0.20
CV(%)	5.3	1.3	2.5	5.8

(n=16)

Table 2 Reproducibility

Sample1	ALP1	ALP2	ALP3	ALP5
Mean(%)	10.6	73.5	12.0	3.9
SD(%)	0.48	0.94	0.48	0.28
CV(%)	4.6	1.3	4.0	7.3
Sample2	ALP1	ALP2	ALP3	ALP5
Mean(%)	6.0	55.1	34.8	4.1
SD(%)	0.33	0.93	0.92	0.26
CV(%)	5.5	1.7	2.7	6.4

(n=10)

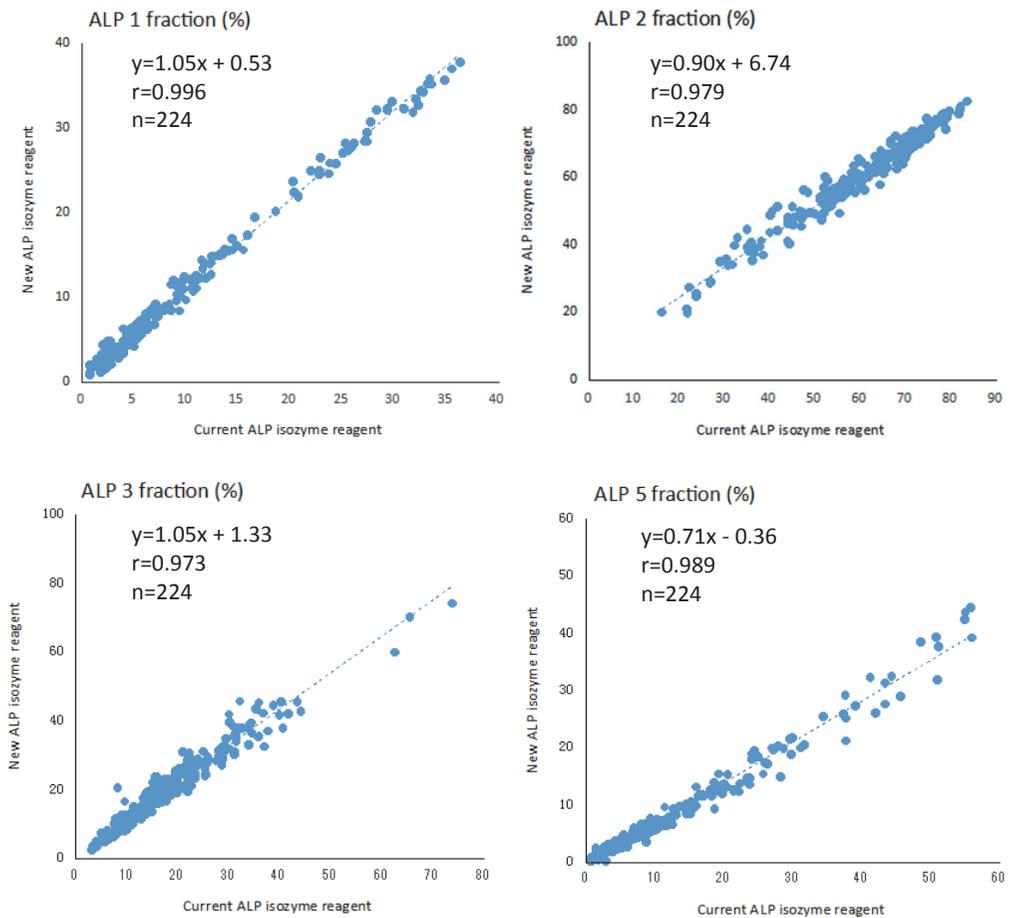


Fig. 1 Correlation between current ALP isozyme reagent and new ALP isozyme reagent

Table 3 Reference range of ALP isozymes fraction

Fraction	Current reagent	New reagent (n=348)	New reagent (n=216)*
ALP1(%)	0	0.1~4.7	0.0~5.3
ALP2(%)	36~74	32.6~73.1	36.6~69.2
ALP3(%)	25~59	23.1~63.0	25.2~54.2
ALP5(%)	0~16	0.2~17.6	0.0~18.1

* : It is quoted by a maker attachment document.

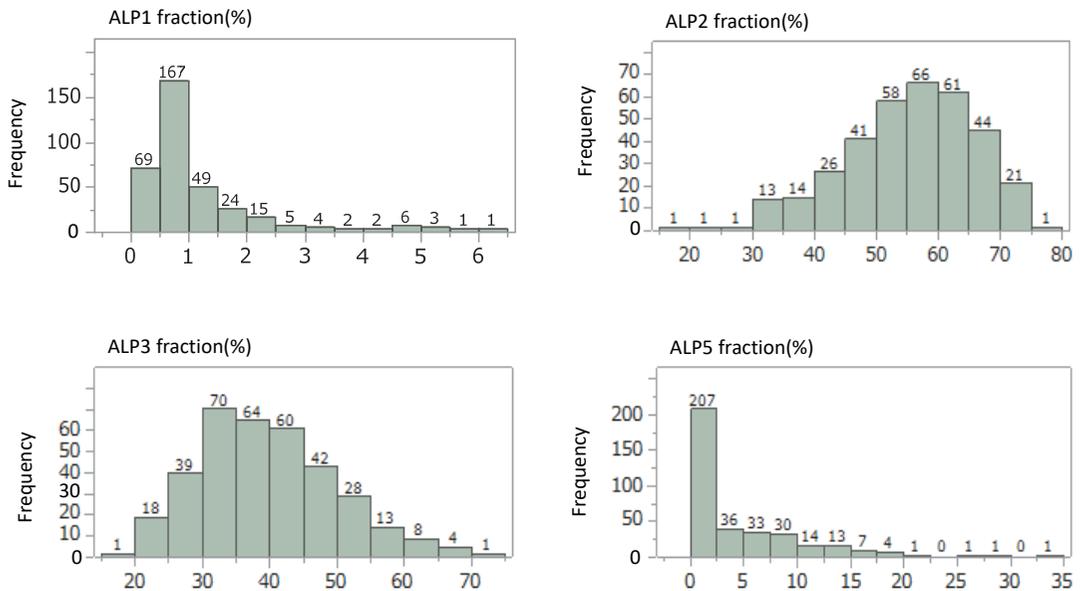


Fig. 2 Frequency distribution of ALP isozymes fraction
The standard range was calculated with the healthy persons using Quick EP ALP-IF reagent (n=348).

4) ALP5分画の性差および血液型別の比較

ALP5分画値で男（中央値：1.4%），女（中央値：1.5%）と男女間に有意差な性差を認めなかった。一方，血液型に関してはA・AB型群（中央値：0.9%）よりもB・O型群（中央値：6.1%）が高値であるという有意差（p<0.01）を認めた（Fig. 3）。

4. 考察

IFCC法のALP活性測定試薬を用いて測定したALPアイソザイム活性値との反応性が適合したALPアイソザイム活性染色試薬が開発されたことから，再現性および相関性と348名の健常者を対象とした各ALPアイソザイム分画の基準範囲を求める検討を行った。

その結果，再現性試験では検討に用いた試料のALPアイソザイム分画の中で約4%と最も分画値が低かったALP5分画でCVが7.3%以下と電気泳動法としては良好な結果を得た。相関性試験については各ALPアイソザイム分画の相関係数は0.973以上といずれも良好であった。回帰直線の傾きはALP1, 2, 3分画は0.90~1.05と現行試薬と大きな差異は認められなかったが，ALP5分画は0.71と現行試薬に比べて約30%低値傾向を示した。なお，新規試薬を開発する際にJSCC法試薬とIFCC法試薬を用いて測定した小腸由来のヒト臓器酵素標品（ALP5酵素標品）の活性値はJSCC法試薬での値を1.00とした時，IFCC法試薬では0.65と約35%低かった成績とほぼ致していた¹⁰⁾。当社における現行試薬の基準範囲は添付文書に記載されている数値を用

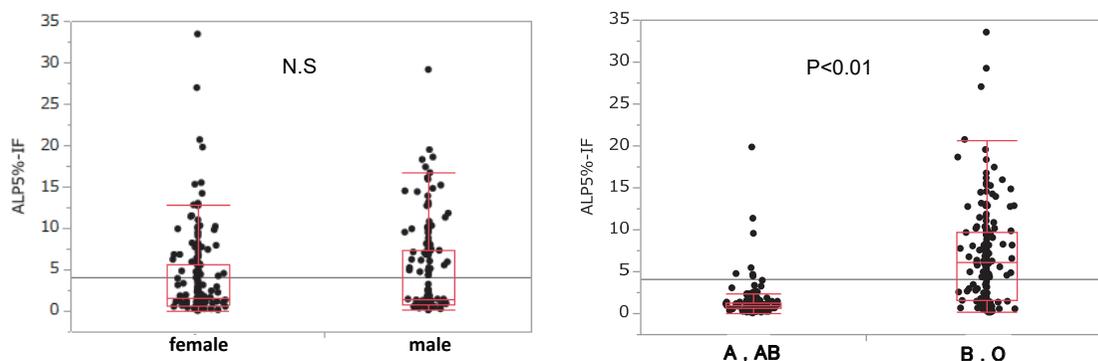


Fig. 3 Comparison for sex differences and the blood type of ALP 5 fraction
The range was calculated with the healthy persons using Quick EP ALP-IF reagent (n=348).

いているが、当時はシステム上の制約から小数点以下は示していない。しかし、新規試薬の基準範囲は添付文書¹²⁾に従って小数点第1位まで表示するとともに、今回からALP1分画を表示することになった。ALP1分画は当社に依頼がある多くの検体で検出されていること、今回の健診結果からも上限値として5%程度まで認められたことから、この新規試薬からALP1分画について基準範囲を示すことは妥当であると考えられた。また、ALP5分画の基準範囲は相関成績から新規試薬は現行試薬に比べて約30%程度低くなることを予想したが、今回の基準範囲の検討成績では現行試薬と近似した値を示し、一見矛盾した結果のように思われた。しかし、電気泳動法を用いてALPアイソザイム分画値と骨型ALPを定量的に同時測定できるクイックジェルALP試薬（骨型）の添付文書中のALP5分画の基準範囲は男性0.0~25.7%、女性0.0~22.6%と記載されており¹³⁾、男女のALP5分画の基準範囲の上限値に今回の相関試験から求めたALP5分画における回帰式の傾き0.71を乗ずると、男性で18.2%、女性で16.0%と算出され、我々が新規試薬を用いて求めたALP5分画の基準範囲上限値である17.6%とほぼ一致した。また、新規試薬のメーカー添付文書に記載のあるALP5分画の基準範囲上限値の18.1%とも近似していた¹²⁾。従って、ALP5分画についてはALPアイソザイム分画の基準範囲算出に用いた母集団に含まれる血液型のB、O型でSe (Fut2) が分泌型のヒトが含まれる頻度によって異なることが示唆された¹⁴⁾。更に、ALP5分画について性差および血液型について有意差検定を行ったところ、性差については有意差を認めなかったが、血液型についてはA・AB型群よりもB・O型群が高いという有意差を認めた。この結果から、ALPアイソザイム分画値の基準範囲は血液型別で示す必要があるという意見もあるが、現状ではALP活

性値において血液型別の基準範囲が示されていないことから、今後は臨床医側の意見も踏まえて学会レベルで論議する必要があると考えられた。

2020年4月1日からALP活性測定は現行のJSCC法試薬からIFCC法試薬に変更されるが、2021年3月31日までの移行期間が設けられていることから1年間は両試薬が混在して存在し、診療に携わる臨床医、検査を担当する臨床検査部の混乱が少なからず予想される。仮に、ALP活性検査はIFCC法測定試薬を用いて測定し、ALPアイソザイム検査は従来からの現行試薬で測定した場合は、ALP5は過大に、ALP2、ALP3は過小に評価されることになり、ALP活性測定試薬とALPアイソザイム染色試薬のミスマッチから得られた検査成績が臨床判断に誤りを招く可能性があると考えられる。従って、ALP活性測定がIFCC法に変更された場合は、IFCC法とALPアイソザイムの反応性が適合した新規のALPアイソザイム染色試薬を用いて測定する必要がある。また、近年はALPアイソザイム検査を外部委託する施設が増えていることから、検査担当者は新規のALPアイソザイム染色試薬について十分な認識を持つことが重要であると考えられた。

5. 結論

IFCC法のALP活性測定に各ALPアイソザイムの反応性が適合したALPアイソザイム活性染色試薬（クイックEP ALP-IF試薬）が開発されたことから検討を行ったが、再現性、相関性はいずれも良好な結果を得た。現行試薬と新規試薬の大きな違いはALP5の反応性が異なることにあるが、ALP活性測定法と同様に新規試薬で測定したALP5分画は現行試薬よりも約30%低値傾向を示した。また、我々が新規試薬を用いて算出した基準範囲はメーカー添付文書

の基準範囲とも近似していた。

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) 深津俊明：最新 酵素・アイソザイム検査—検査法とその臨床的意義 アルカリホスファターゼ (ALP). 臨床病理レビュー 2001;27-35.
- 2) 日本臨床化学会：ヒト血清中酵素活性測定法の勧告法—アルカリホスファターゼ (ALP) —. 臨床化学 1990;19:209-227.
- 3) International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Expert Panel on Enzyme: IFCC method for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzyme. Part 5. IFCC Method for Alkaline Phosphatase. IFCC Document Stage 2. Draft 1. Clin Chem Clin Biochem 1983;21:731-748.
- 4) 日本臨床化学会：血清中の酵素活性測定標準化の推進に関する指針 指針 I 日本臨床化学会常用基準法 (JSCC 常用基準法). 臨床化学 1994;23:335-340.
- 5) 松下 誠, 菰田二一：アルカリ性ホスファターゼ活性測定における脂肪食の影響と血液型との関係. 臨床病理 2011;59:923-929.
- 6) International Federation of Clinical Chemistry (IFCC): IFCC primary reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of enzymes at 37 °C. Part 9: reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. Clin Chem Lab Med 2011;49:1439-1446.
- 7) 日本臨床化学会 酵素・試薬専門委員会：血清アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定のJSCC勧告法をIFCC標準測定法にトレーサブルな方法への変更に関する提案. 臨床化学 2017;46:138-145.
- 8) 日本臨床化学会. パブリックコメント「血清アルカリホスファターゼ (ALP) 常用基準法改訂に関する意見の募集について」に対する報告書. http://jscc-jp.gr.jp/file/pdf/alp_jscc.pdf (2020年03月05日アクセス)
- 9) 星野 忠, 宮下真一, 山舘周恒, 他. 全自動電気泳動装置エパライザ2を用いたALPアイソザイム活性染色法とALP活性測定法との整合性に関する検討. 日本臨床検査自動化学会誌 2013;38:83-86.
- 10) 星野 忠, 飛山理絵, 宮下真一, 他. IFCC法に対応した新規ALPアイソザイム活性染色試薬の開発. 臨床化学 2019;48(Supp.1):252
- 11) 厚生労働省：労働安全衛生法第66条・労働安全衛生規則第44条
- 12) クイックEP ALP-IF 試薬添付文書 第1版：2020年6月 (ヘレナ研究所)
- 13) クイックジェル ALP 試薬 (骨型) 添付文書 第6版：2018年9月改訂 (ヘレナ研究所)
- 14) 松下 誠, 入野 勤, 神山清志, 他. 血清アルカリ性ホスファターゼ活性と血液型との関係. 臨床化学 2001;30:217-222.

全自動臨床検査システム STACIA による 自己抗体検査試薬の性能評価

Evaluation of STACIA for Autoantibodies Test

谷澤李紗 下坂浩則 小野佳一 矢富 裕 保田奈緒美

要旨 本検討では自己抗体検査試薬ステイシアMEBLux (医学生物学研究所:MBL社)の基礎性能評価を行い、エリア (サーモフィッシュャーダイアグノスティックス社)との判定一致率を検討した。再現性, 希釈直線性, 定量限界は概ね良好な成績であったが, 共存物質の影響試験ではIgGの影響が確認された。判定一致率は試薬の特性などがあり考慮する必要がある。また, 検体保存に関しても -20℃にて保存することが推奨される。

Key words antibody, CLEIA, STACIA

1. はじめに

膠原病は, 多彩な臓器障害と免疫異常を特徴とする疾患で, 自己抗体が高頻度に検出される。これらの自己抗体は, 特定の疾患や病態と密接に関連するものが多く, 診断補助, 病型分類, 予後予測, 治療効果判定などに有用とされており, 自己抗体を疾患の初期段階で検出し早期に治療開始することで重症化を防止, 進行の遅延化を可能とする。自己抗体の測定法としては酵素免疫測定法 (ELISA法) が広く臨床に用いられてきたが, 測定に2~3時間を要することから診察前検査は困難であった。

今回, 全自動臨床検査システムSTACIA (LSIメディアエンス, 以下STACIA)を用いて, 化学発光酵素免疫測定法 (以下CLEIA法)を原理とし, 短時間で測定が可能となった自己抗体検査試薬 (医学生物学研究所: MBL社)の性能評価を行ったので報告する。

2. 材料および方法

1) 対象

本院検査部に自己抗体検査が提出された合計843例の患者血清を使用した。測定項目は抗dsDNA抗体 (以下dsDNA), 抗ssDNA抗体 (以下ssDNA), 抗U1-RNP抗体 (以下RNP), 抗Sm抗体 (以下Sm), 抗SS-A/Ro抗体 (以下SS-A), 抗SS-B/La抗体 (以下SS-B), 抗MPO-ANCA抗体 (以下MPO-ANCA), 抗PR3-ANCA抗体 (以下PR3-ANCA) 及び抗ミトコンドリアM2抗体 (以下M2)の全9項目である。なお本研究は東京大学医学部附属病院検査部と医学生物学研究所 (以下MBL社)との共同研究にて行い, 東京大学大学院医学研究科・医学部倫理委員会の承認を得て実施した (審査番号: 333-148)。

2) 検討試薬および測定原理

検討試薬 (以下ステイシア)は「ステイシアMEBLuxテストdsDNA」 (以下ステイシアdsDNA), 「ステイシアMEBLuxテストssDNA」 (以下ステイシアssDNA), 「ステイシアMEBLuxテストRNP」 (以下ステイシアRNP), 「ステイシアMEBLuxテストSm」 (以下ステイシアSm), 「ステイシアMEBLuxテストSS-A」 (以下ステイシアSS-A), 「ステイシアMEBLuxテストSS-B」 (以下ステイシアSS-B), 「ステイシアMEBLuxテストMPO-ANCA」 (以下ステイシアMPO-ANCA), 「ステイシアMEBLuxテストPR3-ANCA」 (以下ステイシアPR3-ANCA) 及び「ステイシアMEBLuxテストミトコンド

Received Jun. 12, 2020; Accepted Sep. 23, 2020
Risa TANIZAWA, Hironori SHIMOSAKA, Yoshikazu ONO, Yutaka YATOMI, Naomi YASUDA
東京大学医学部附属病院検査部
〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1
Department of Clinical Laboratory, The University of Tokyo Hospital (7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan)
Corresponding author: Risa Tanizawa
Tel: 03-3815-5411
E-mail: tanizawar-lab@h.u-tokyo.ac.jp

リアM2」(以下ステイシアM2) (全てMBL社)を用いた。各試薬はCLEIA法を原理とする。また、測定装置としてSTACIAを使用した。STACIAはサンプリングから結果出力までの所要時間が約19分である。各試薬の添付文書に記載されているカットオフ値をTable 1A、測定範囲をTable 1Bに示す。

3) 対照試薬

本検討における対照試薬(以下エリア)としては、いずれも蛍光酵素免疫測定法(以下FEIA法)を原理とする「エリアdsDNA」,「エリアssDNA」,「エリアU1-RNP」,「エリアSm」,「エリアSS-A/Ro」,「エリアSS-B/La」,「エリアMPO-ANCA」,「エリアPR3-ANCA」及び「エリアミトコンドリアM2」(以下エリアM2) (全てサーモフィッシュャーダイアグノスティック社)を使用した。測定機器は全自動蛍光酵素免疫測定装置「ファディア250」(サーモフィッシュャーダイアグノスティック社、以下ファディア)を用いた。サンプリングから結

果出力まで所要時間は約2時間である。各試薬のカットオフ値はTable 1Cに示す。

4) 検討内容

- (1) 再現性

各項目において、3濃度の患者血清を各20重測定し同時再現性を行った。また、2濃度の患者血清を1日2回、5日間測定し日差再現性を行った。
- (2) 希釈直線性

各項目において、3濃度の患者血清を専用希釈液で段階希釈して行った。
- (3) 定量限界

各項目の低値の患者血清11例を測定してprecision fileを作成し、測定値のCV10%以下の精度で測定可能な最小濃度を定量限界とした。
- (4) 共存物質の影響

免疫グロブリン及びリウマトイド因子(RF)のヒト血清を対象検体に添加し、dsDNA、SS-A、MPO-

Table 1 Details of each reagent

A. Cutoff value of STACIA

	-	+
dsDNA (IU/mL)	≦12.0	>12.0
ssDNA (AU/mL)	≦25.0	>25.0
RNP (U/mL)	<10.0	≧10.0
Sm (U/mL)	<10.0	≧10.0
SS-A (U/mL)	<10.0	≧10.0
SS-B (U/mL)	<10.0	≧10.0
MPO-ANCA (U/mL)	<3.5	≧3.5
PR3-ANCA (U/mL)	<3.5	≧3.5
M2 (Index)	<7.0	≧7.0

B. Measuring range of STACIA

dsDNA (IU/mL)	1.2 ~ 400.0
ssDNA (AU/mL)	2.0 ~ 800.0
RNP (U/mL)	2.0 ~ 550.0
Sm (U/mL)	1.0 ~ 600.0
SS-A (U/mL)	1.0 ~ 1200.0
SS-B (U/mL)	1.0 ~ 1000.0
MPO-ANCA (U/mL)	1.0 ~ 300.0
PR3-ANCA (U/mL)	1.0 ~ 350.0
M2 (Index)	1.5 ~ 800.0

C. Cutoff value of Elia

	-	±	+
dsDNA (IU/mL)	<10.0	10.0 ~ 15.0	>15.0
ssDNA (U/mL)	<7.0	7.0 ~ 10.0	>10.0
RNP (U/mL)	<3.5	3.5 ~ 5.0	>5.0
Sm (U/mL)	<5.0	5.0 ~ 10.0	>10.0
SSA (U/mL)	<7.0	7.0 ~ 10.0	>10.0
SSB (U/mL)	<7.0	7.0 ~ 10.0	>10.0
MPO-ANCA (U/mL)	<3.5	3.5 ~ 5.0	>5.0
PR3-ANCA (U/mL)	<2.0	2.0 ~ 3.0	>3.0
M2 (U/mL)	<7.0	7.0 ~ 10.0	>10.0

A. Measured value of antibodies(dsDNA,SS-A,MPO-ANCA and M2) using additional serum

		dsDNA (IU/mL)	SS-A (U/mL)	MPO-ANCA (U/mL)	M2 (Index)
additional serum	IgG	0.3	0.3	≦0.1	0.2
	IgA	1.0	0.3	≦0.1	0.3
	IgM	0.6	0.1	≦0.1	0.1
	RF	5.0	0.4	≦0.1	5.2

B. Effects of interference substance using human serum

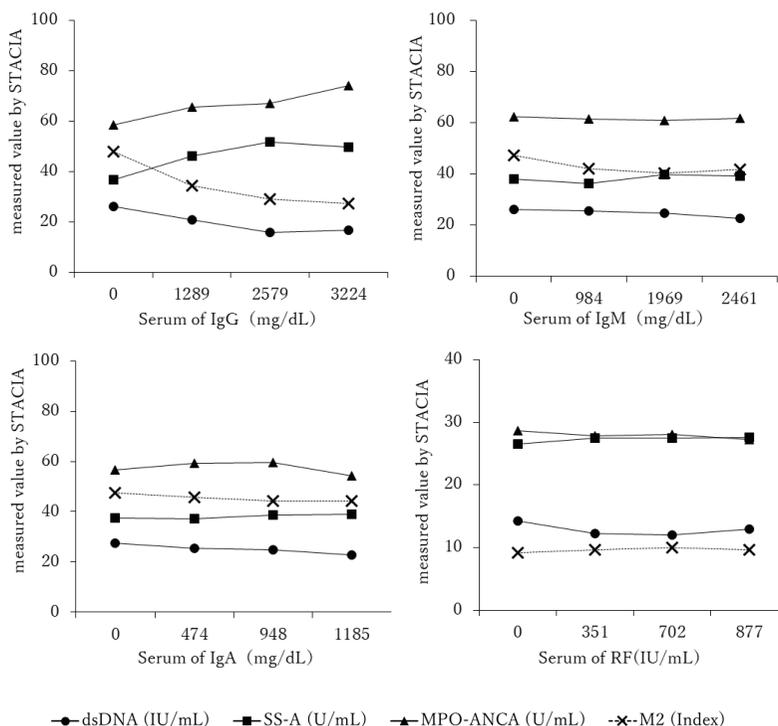


Fig. 1 Effects of interference substance.

ANCA 及び M2 について影響を確認した。添加血清は、IgG : 6448 mg/dL (悪性リンパ腫, IgG- κ), IgM : 4922 mg/dL (悪性リンパ腫, IgM- λ), IgA : 2370 mg/dL (多発性骨髄腫, IgA- κ), RF : 1754 IU/mL (関節リウマチ) を使用した。添加血清の各自己抗体値を Fig. 1A に示す。

(5) 相関

各試薬の測定範囲内の検体について、エリアとの相関性及び判定一致率を検討した。ステイシアの判定は「陽性、陰性」であるのに対し、エリアの判定は「陽性、疑陽性、陰性」であるため、エリアの疑陽性は陰性に含め

て判定一致率を算出した。

さらに、判定不一致となった検体について精査を行った。a) ステイシア:陽性/エリア:陰性検体は MBL 社, b) ステイシア:陰性/エリア:陽性検体はサーモフィッシャーダイアグノスティック社に精査を依頼した。

a) ステイシアによる再測定、間接蛍光抗体法 (IFA)、試薬で用いられる抗原を添加し測定値の低下を確認する阻害試験、二重免疫拡散法 (DID 法)、免疫沈降法 (IP 法) を行い、これらの試験で陽性となったものは抗体特異反応とした (確認試験陽性)。また、試薬で使用されている抗原未感作粒子 (Blank 粒子)

Table 2 Within-run and Between-day precision

		Within-run			Between-day	
		Low	Middle	High	Low	High
dsDNA	Mean (IU/mL)	22.7	100.9	302.2	16.1	299.1
	SD (IU/mL)	1.5	8.5	29.5	1.7	27.4
	CV (%)	6.5	8.4	9.8	10.7	9.2
ssDNA	Mean (AU/mL)	28.5	245.7	648.8	17.2	609.1
	SD (AU/mL)	2.1	14.7	21.7	1.1	21.6
	CV (%)	7.5	6.0	3.3	6.5	3.6
RNP	Mean (U/mL)	11.5	102.3	377.8	12.0	406.0
	SD (U/mL)	0.5	3.2	31.6	0.9	23.6
	CV (%)	4.7	3.2	8.4	7.4	5.8
Sm	Mean (U/mL)	10.9	181.5	530.9	11.4	535.8
	SD (U/mL)	0.5	7.5	27.2	0.7	29.3
	CV (%)	4.5	4.1	5.1	6.5	5.5
SS-A	Mean (U/mL)	29.3	356.9	924.2	198.3	737.1
	SD (U/mL)	0.8	23.4	70.8	6.5	51.0
	CV (%)	2.7	6.5	7.7	3.3	7.0
SS-B	Mean (U/mL)	20.0	192.5	915.2	101.9	807.9
	SD (U/mL)	0.8	8.1	38.3	3.4	54.7
	CV (%)	4.2	4.2	4.2	3.3	6.6
MPO-ANCA	Mean (U/mL)	4.6	101.4	172.9	4.9	182.2
	SD (U/mL)	0.2	6.1	10.5	0.3	13.5
	CV (%)	4.3	6.0	6.1	6.8	7.4
PR3-ANCA	Mean (U/mL)	27.2	140.5	243.8	29.4	181.6
	SD (U/mL)	1.5	9.7	19.2	2.0	11.9
	CV (%)	5.6	6.9	7.9	6.7	6.5
M2	Mean (Index)	15.1	126.1	305.6	15.1	334.3
	SD (Index)	0.7	5.5	17.2	0.9	13.9
	CV (%)	4.6	4.3	5.6	6.0	4.2

との反応性を確認し、この試験が陽性となったものは非特異反応とした(確認試験陰性)。確認試験の内容は項目で異なる。

- b) 阻害試験, Western Blot法(WB法), キャプチャー法ELISA試薬を用いたWieslab ELISA法, IFAを行い、これらの試験が陽性となったものは抗体特異反応とした(確認試験陽性)。また、エリア試薬の架橋剤として使用されているStreptavidinに対する抗体を検出するStreptavidin抗体確認試験が陽性となったものは非特異反応とした(確認試験陰性)。確認試験の内容は項目で異なる。

6) 検体保存安定性

3濃度の患者血清(検体1:37.2 IU/mL, 検体2:12.3 IU/mL, 検体3:6.2 IU/mL)を冷蔵(2~8℃)と冷凍

保存(-20℃)に分け、30日目までのdsDNAの保存安定性を確認した。

3. 成績

1) ステイシアの性能評価

(1) 再現性

全項目で変動係数(CV%)が10%以下となった。また、日差再現性は全ての項目でCVが15%以下となった(Table 2)。

(2) 希釈直線性

理論値の±20%以内の範囲を直線性良好とした時、dsDNAは301.1 IU/mL, ssDNAは574.4 AU/mL, RNPは373.5 U/mL, Smは509.9 U/mL, SS-Aは1053.5 U/mL, SS-Bは724.0 U/mL, MPO-ANCAは282.0 U/mL, PR3-

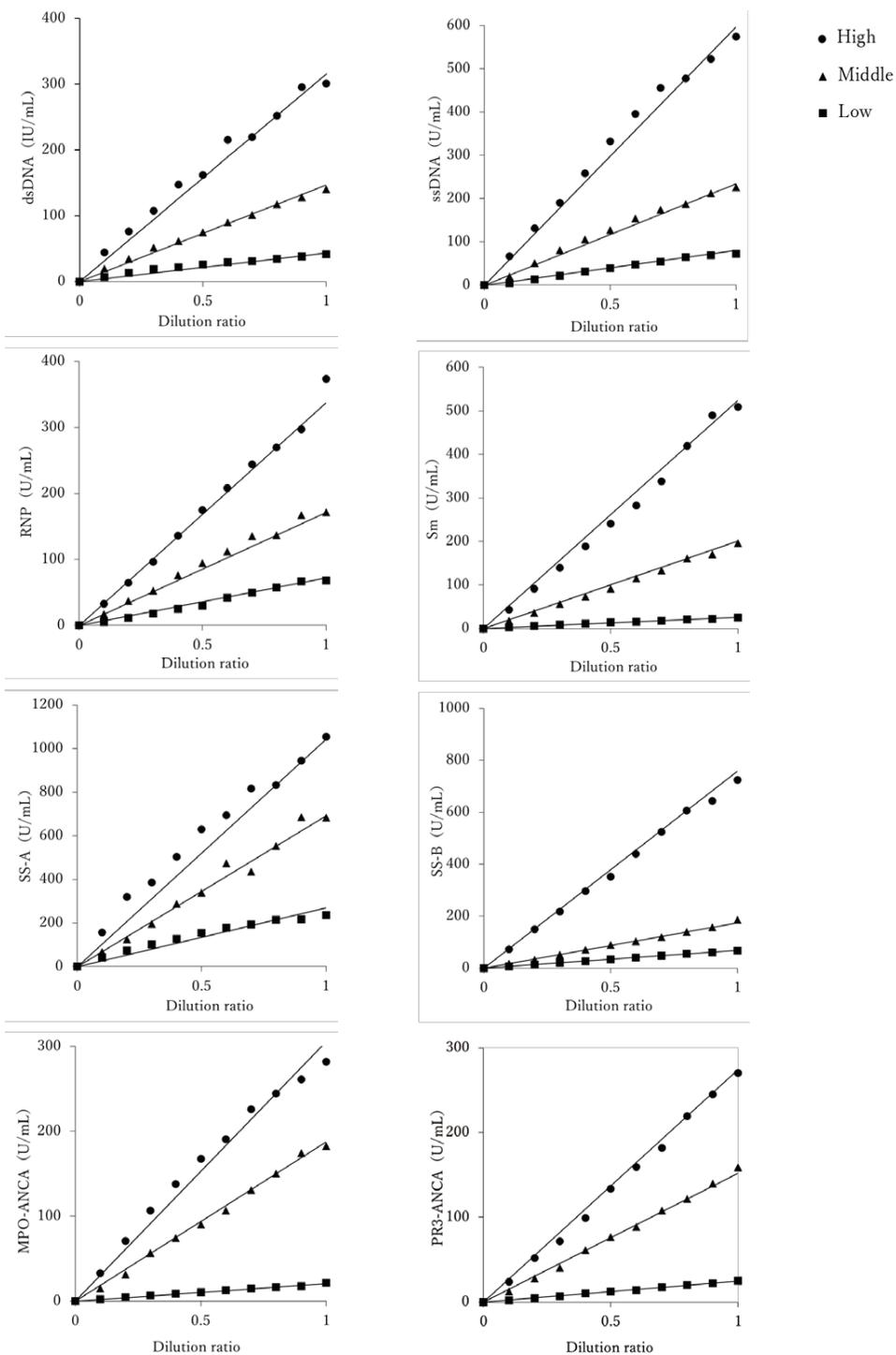


Fig. 2 Linearity-of-dilution

Table 3 Concordance rate between STACIA and Elia , sensitivity and specificity of STACIA.

		Elia dsDNA		Total
		Positive	Negative	
STACIA	Positive	26	2	28
dsDNA	Negative	15	41	56
Total		41	43	84
Concordance rate		80.0%		
Positive conformity ratio		63.4%		
Negative conformity ratio		95.3%		

		Elia ssDNA		Total
		Positive	Negative	
STACIA	Positive	45	4	49
ssDNA	Negative	9	19	28
Total		54	23	77
Concordance rate		83.1%		
Positive conformity ratio		83.3%		
Negative conformity ratio		82.6%		

		Elia RNP		Total
		Positive	Negative	
STACIA	Positive	62	11	73
RNP	Negative	11	49	60
Total		73	60	133
Concordance rate		83.5%		
Positive conformity ratio		84.9%		
Negative conformity ratio		81.7%		

		Elia Sm		Total
		Positive	Negative	
STACIA	Positive	25	4	29
Sm	Negative	15	78	93
Total		40	82	122
Concordance rate		84.4%		
Positive conformity ratio		62.5%		
Negative conformity ratio		95.1%		

		Elia SS-A		Total
		Positive	Negative	
STACIA	Positive	84	2	86
SS-A	Negative	12	15	27
Total		96	17	113
Concordance rate		87.6%		
Positive conformity ratio		87.5%		
Negative conformity ratio		88.2%		

		Elia SS-B		Total
		Positive	Negative	
STACIA	Positive	20	7	27
SS-B	Negative	10	67	77
Total		30	74	104
Concordance rate		83.7%		
Positive conformity ratio		66.7%		
Negative conformity ratio		90.5%		

		Elia MPO-ANCA		Total
		Positive	Negative	
STACIA	Positive	59	8	67
MPO-ANCA	Negative	7	24	31
Total		66	32	98
Concordance rate		84.7%		
Positive conformity ratio		89.4%		
Negative conformity ratio		75.0%		

		Elia PR3-ANCA		Total
		Positive	Negative	
STACIA	Positive	45	15	60
PR3-ANCA	Negative	7	34	41
Total		52	49	101
Concordance rate		78.2%		
Positive conformity ratio		86.5%		
Negative conformity ratio		69.4%		

		Elia M2		Total
		Positive	Negative	
STACIA	Positive	47	1	48
M2	Negative	5	24	29
Total		52	25	77
Concordance rate		92.2%		
Positive conformity ratio		90.4%		
Negative conformity ratio		96.0%		

ANCAは270.2 U/mLまでの直線性を確認した (Fig. 2)。

M2は定性項目であるため希釈直線性試験を行わなかった。

(3) 定量限界

dsDNAは1.1 IU/mL, ssDNAは0.9 AU/mL, RNPは0.9 U/mL, Smは1.1 U/mL, SS-Aは0.6 U/mL, SS-Bは0.4 U/mL, MPO-ANCAは0.4 U/mL, PR3-ANCAは0.5 U/mL, M2は0.1 Indexであった。

(4) 共存物質の影響

検討した4項目全てにおいてIgGを添加した際に測定値への影響が認められ, 0濃度添加時を100%とした測定値の変化率は最大でdsDNAでは40%減少, SS-Aは41%増加, MPO-ANCAは26%増加, M2では43%減少であった (Fig. 1B)。

2) ステイシアとエリアの相関

(1) 相関

dsDNAの相関が最も高く $r=0.895$, $y=1.01x+14.6$ であったが, 各項目において測定方法間でばらつきが認められた (Fig. 3)。

(2) 判定一致率

エリアとの陰性/陽性一致率はステイシアPR3-ANCAが最も低く78.2%, ステイシアM2が最も高く92.2%であった (Table 3)。

(3) 乖離検体の精査

検体量不足で解析ができなかった検体の記載は省略する。

a) ステイシア:陽性/エリア:陰性

確認試験の結果をTable 4Aに示す。ステイシア:陽性/エリア:陰性は54件であった。dsDNAの乖離検体2例はいずれもフルオロnDNAテスト (MBL社)を用いたIFAが陽性であった。

ssDNAの乖離検体4例は阻害試験において阻害が認められた (阻害試験:陽性)。

RNPの確認試験ではDID法 (ENAテスト-1; MBL社)を実施し, DID法陰性例についてIP法で確認を行った。乖離検体11例はいずれかの方法で陽性となった。

Smの確認試験では, DID法 (ENAテスト-1)を実施し, DID法陰性例について阻害試験を行い, さらに阻害試験陰性の検体に対しIP法による確認を行った。乖離検体のうち解析できた3例について, 2例はDID法及びIP法で陽性が確認された。1例はステイシア再測定で陰性 (8.4 U/mL), DID法も陰性であり, 検体量不足のためその後の精査が実施できなかった。

SS-Aの確認試験ではDID法 (ENAテスト-2; MBL社), 阻害試験を実施し, 乖離検体2例はいずれ

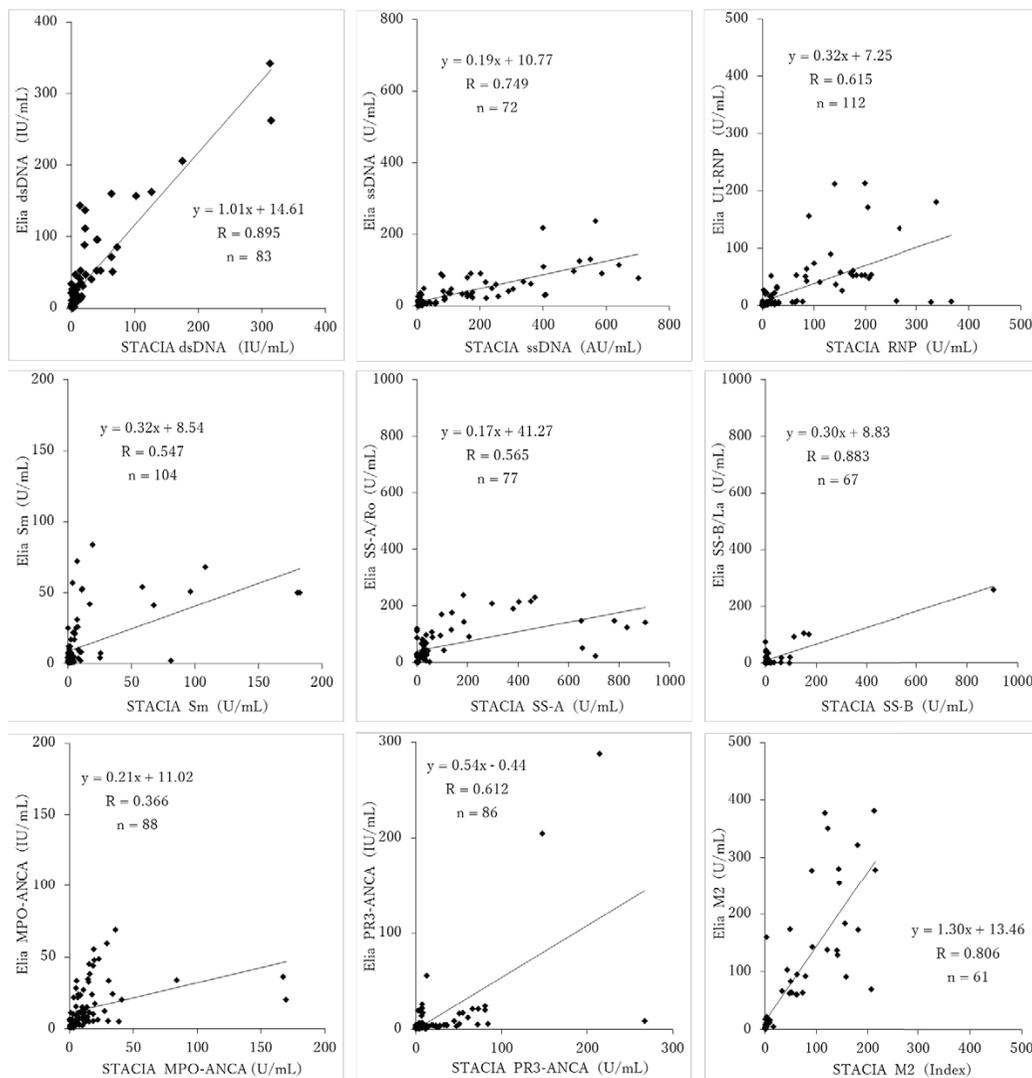


Fig. 3 Correlation between STACIA and Elia.

も阻害試験が陽性であった。

SS-Bについて、SS-Aの確認試験と同様に行った。乖離検体のうち解析できた4例について、3例は阻害試験が陽性であり、1例はステイシア再測定で陰性(6.7 U/mL)、DID法も陰性であり、検体量不足のためその後の精査が実施できなかった。

MPO-ANCAの確認試験では、IFAと阻害試験を行い、阻害試験陰性の検体についてBlank粒子との反応性確認を行った。乖離検体8例について、1件はIFA陽性であったが、阻害試験が陰性であり、Blank粒子と

の反応性が確認された。6件はIFA陽性、阻害試験ではある程度の阻害が認められ、Blank粒子との反応性も確認されなかった。ステイシア再検値が陰性(3.1 U/mL)、IFAも陰性であり、検体量不足のためその後の精査が実施できなかった検体は1件であった。

PR3-ANCAについて、MPO-ANCAの確認試験と同様に行った。乖離検体15例のうち14例はIFAと阻害試験のいずれかの方法で陽性となり、1例はIFA陰性、阻害試験にて概ね阻害が確認されたが目安の阻害率に達せず、Blank粒子との反応性も確認されなかつ

Table 4 The results of confirmation tests for discordant samples between STACIA and Elia.

A. STACIA : Positive / Elia : Negative

dsDNA					
No.	STACIA	Elia	IFA		
1	14.5	13.2	+		
2	35.1	12.1	+		
ssDNA					
No.	STACIA	Elia	Inhibition Test		
3	99.8	8.2	+		
4	31.3	5.3	+		
5	57.2	6.1	+		
6	42.8	7.8	+		
RNP					
No.	STACIA	Elia	DID	IP	
7	31	4.2	+	n.d.	
8	15.8	4.8	+	n.d.	
9	25.9	4.5	+	n.d.	
10	≥550	4.3	+	n.d.	
11	14.2	4.2	+	n.d.	
12	10.5	3.1	+	n.d.	
13	18.3	3.4	-	+	
14 ^W	10.4	2.0	-	+	
15	12.4	3.4	-	+	
16	23.1	4.1	-	+	
17	23.6	2.9	-	+	
Sm					
No.	STACIA	Elia	DID	Inhibition Test	IP
18	80.9	2.2	+	Sample shortage	-
19	25.7	7.3	-	+	+
20 ^W	10.3	8.3	-	Sample shortage	+
SS-A					
No.	STACIA	Elia	DID	Inhibition Test	
21	49.0	2.3	±	+	
22	35.6	7.2	-	+	
SS-B					
No.	STACIA	Elia	DID	Inhibition Test	
23	11.6	8.6	-	+	
24	13.8	4.7	-	+	
25	20.9	1.4	±	+	
26 ^W	10.2	4.0	-	Sample shortage	

MPO-ANCA					
No.	STACIA	Elia	IFA	Inhibition Test	Response to blank particle
27	10.2	2.4	+	-	+
28	38.7	5.0	+	±	-
29	5.2	2.8	+	±	-
30	7.8	2.7	+	±	-
31	3.5	2.1	+	±	-
32	7.0	4.1	+	±	-
33	12.2	4.7	+	±	-
34 ^W	3.8	3.1	-	-	Sample shortage
PR3-ANCA					
No.	STACIA	Elia	IFA	Inhibition Test	Response to blank particle
35	11.8	1.2	+	+	n.d.
36	11.0	1.7	+	+	n.d.
37	6.2	2.2	+	+	n.d.
38	7.0	1.7	+	+	n.d.
39	11.6	0.6	+	+	n.d.
40	9.8	1.5	+	+	n.d.
41	8.1	1.5	+	+	n.d.
42	5.0	1.1	-	+	n.d.
43	4.6	1.0	-	+	n.d.
44	26.8	2.1	+	±	-
45	24.0	1.9	+	±	-
46	27.1	2.1	+	±	-
47	10.5	2.5	+	±	-
48	9.9	1.3	+	±	-
49	4.5	1.1	-	±	-
M2					
No.	STACIA	Elia	IFA	Inhibition Test	
50	15.9	5.0	-	+	

Positive : +, Negative : -
n.d. : No Date
※Re-examination by STACIA : Negative

B. STACIA : Negative / Elia : Positive

dsDNA					
No.	STACIA	Elia	Inhibition Test		
1	3.3	17.7	+		
2	2.1	25.7	+		
3	0.6	21.6	+		
4	4.5	20.2	+		
5	2.2	22.3	+		
6	2.1	26.5	+		
7	7.5	19.8	+		
8	6.6	46.9	+		
9	5.4	27.8	+		
10	10.2	15.8	+		
11	8.7	25.9	+		
12	0.6	33.7	+		
13	6.3	17.3	+		
14	2.6	20.2	+		
15	10.7	31.4	+		
ssDNA					
No.	STACIA	Elia	Inhibition Test	Streptavidin antibody	
16	22.2	48.6	+	n.d.	
17	16.8	11.4	+	n.d.	
18	10.9	11.3	+	n.d.	
19	20.8	12.6	+	n.d.	
20	2.6	14.5	+	n.d.	
21	14.1	31.5	+	n.d.	
22	4.4	27.2	+	n.d.	
23	9.8	21.8	+	n.d.	
24	10.5	36.0	-	-	
RNP					
No.	STACIA	Elia	WB&Elia RNP A/C/70k	Inhibition Test	
25	7.0	23.0	+	n.d.	
26	7.7	22.0	+	n.d.	
27	9.7	7.7	+	n.d.	
28	2.2	27.0	+	n.d.	
29	5.4	20.0	+	n.d.	
30	9.1	6.7	+	n.d.	
31	4.9	24.0	+	n.d.	
32	7.3	21.0	+	n.d.	
33	0.7	8.0	+	+	
34	0.8	5.9	+	+	
35	0.8	5.9	+	±	
Sm					
No.	STACIA	Elia	WB SmD	Inhibition Test	Streptavidin antibody
36	1.8	12.0	+	n.d.	n.d.
37	3.0	≥120	+	n.d.	n.d.
38	7.1	72.0	+	n.d.	n.d.
39	6.2	25.0	+	n.d.	n.d.
40	2.2	17.0	+	n.d.	n.d.
41	4.8	17.0	+	n.d.	n.d.
42	3.4	57.0	+	n.d.	n.d.
43	5.0	22.0	-	+	n.d.
44	5.3	21.0	-	+	n.d.
45	7.1	31.0	-	+	n.d.
46	3.9	22.0	-	+	n.d.
47	0.2	25.0	-	+	n.d.
48	7.7	26.0	-	+	n.d.
49	0.5	12.0	-	-	+
50	1.4	12.0	-	-	-
SS-A					
No.	STACIA	Elia	Elia Ro52	Elia Ro60	
51	0.5	≥240	+	-	
52	0.4	19.8	+	-	
53	0.3	119.3	+	-	
54	0.3	31.5	+	-	
55	0.5	28.9	+	-	
56	0.4	111.5	+	-	
57	1.9	23.4	+	-	
58	0.6	87.0	+	-	
59	0.7	21.6	+	-	
60	0.4	36.3	+	-	
61	4.9	21.8	-	+	
62	5.8	14.5	±	-	
SS-B					
No.	STACIA	Elia	WB SS-B		
63	1.4	18.1	+		
64	0.4	18.3	+		
65	0.4	20.9	+		
66	2.4	21.7	+		
67	5.5	19.3	+		
68	4.9	16.8	+		
69	0.5	21.8	+		
70	1.7	20.0	+		
71	1.1	20.8	+		

MPO-ANCA				
No.	STACIA	Elia	Wieslab ELISA	Inhibition Test
72	3.4	22.1	+	n.d.
73	1.1	11.0	+	n.d.
74	0.1	6.1	-	+
75	1.8	6.7	-	+
76	0.1	6.8	-	+
77	≥0.1	5.6	-	+
78	2.9	10.4	-	+
PR3-ANCA				
No.	STACIA	Elia	Wieslab ELISA	Inhibition Test
79	0.1	4.4	+	n.d.
80	1.3	4.7	+	n.d.
81	1.4	3.1	+	n.d.
82	2.5	3.9	+	n.d.
83	2.7	19.6	+	n.d.
84	0.3	4.0	-	+
85	0.3	4.4	-	+
M2				
No.	STACIA	Elia	IFA	Inhibition Test
86	0.3	17.5	-	+
87	3.5	21.4	-	+
88	4.4	19.7	-	+
89	3.0	12.3	-	+
90	3.3	159.6	Stomach+ Liver+ Kidney+	n.d.

Positive : +, Negative : -
n.d. : No Date

たことから、弱陽性を否定できない結果であった。

M2の乖離検体1例については、フルオロAID-1テスト(MBL社)を用いたIFAは陰性であったが、阻害試験において阻害が認められた。

b) ステイシア:陰性/エリア:陽性

確認試験の結果をTable 4Bに示す。ステイシア:陰性/エリア:陽性は91件であった。

dsDNAの乖離検体15例はいずれも阻害試験で阻害が認められた。

ssDNAの乖離検体9例のうち8例において阻害試験で阻害が認められたが、他1例では阻害試験が陰性、Streptavidin抗体確認試験も陰性であった。

RNPの確認試験では、WB法でU1-RNPに特徴的な抗原タンパク質(A, C, 70 kDa)に対する抗体の存在を確認し、さらに、Elia RNP A/C/70kを用いてエリアU1-RNPの構成タンパク質(A, C, 70 k)に対する抗体の検出試験を行った。この確認試験では、WBとEliaの不一致例に対して阻害試験を行い抗体の有無を確認した。その結果、乖離検体11例はいずれかの方法で陽性となった。

Smの確認試験では、WB法を行い、WB法で抗体が確認できなかった検体に対して阻害試験を実施し

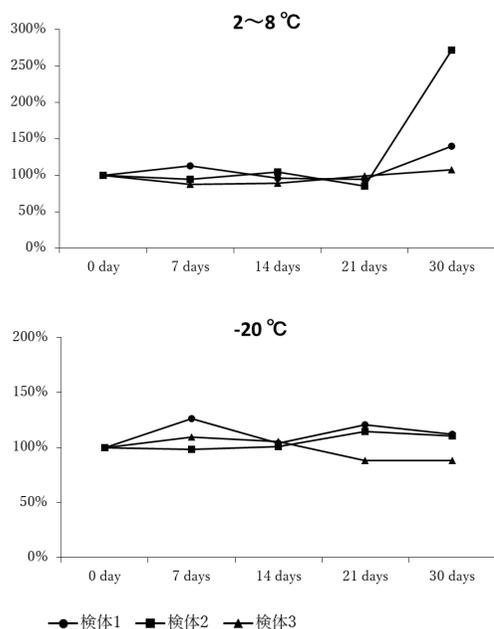


Fig. 4 Storage stability on dsDNA.

た。乖離検体15例のうち13例で抗Sm抗体が確認された。両試験共に陰性であった2例に関して、Streptavidin抗体確認試験を行ったところ1例が陽性であった。

SS-Aの確認試験では、EliA SS-A 52/60を用いて、エリアSS-Aに含まれる抗原タンパク質（52 kDa, 60 kDa）に対する抗体を測定した。乖離検体12例のうち11例ではSS-Aの52 kDa及び60 kDaに対する抗体が確認された。他1例ではEliA Ro52が疑陽性（±）であったが、エリアSS-Aが陽性でありSS-A陽性を否定できない結果であった。

SS-BではWB法を実施し、乖離検体のうち解析できた9例全てで抗体が確認された。

MPO-ANCAの確認試験では、キャプチャー法ELISA試薬を用いたWieslab ELISA法を行い、陰性検体に阻害試験を実施した。乖離検体7例を検査したところ、いずれかの方法で陽性となった。

PR3-ANCAはMPO-ANCAと同様の確認試験を行い、乖離検体7例はいずれかの方法で陽性となった。

M2の確認試験では、ラット肝・腎・胃切片を用いたIFAを行い、IFA陰性検体に対して阻害試験を実施した。乖離検体5例はいずれかの検査で陽性となっ

た。

3) dsDNAの保存安定性

冷凍保存では値に大きな変化は見られなかった。冷蔵保存では検体2で値の大きな変動が確認され、21日目から30日目の間で最大171%の増加が認められたが、検体1では最大40%の増加、検体3では最大13%の減少であった(Fig. 4)。

4. 考察

今回検討したステイシア試薬の9項目は、同時・日差再現性はいずれも良好であった。希釈直線性については、残余検体量の制約があり測定上限値までの確認ができていない項目もあるが、概ね良好であった。定量限界はメーカーが設定している測定下限値（Table 1B）に近い性能が確認できた。共存物質の影響試験は、検体量の問題から4項目のみの検討となったが、検討4項目全てでIgG高値ヒト血清の影響が認められた。今回、検討に使用した免疫グロブリン血清はM蛋白が検出されており、IgGのM蛋白が測定過程で何らかの影響を与えている可能性が考えられる。その他、試薬に使用している固相担体や抗体・抗原に反応する物質が測定系に干渉していることも考えられるが¹⁾、今回の検討では複数の検体を用いての確認ができなかったため、同様の現象が起きるのかの検証ができず、原因解明はできなかった。しかしながら、dsDNAは全身性エリテマトーデス（SLE）の疾患活動性のモニタリングにも用いられることより、IgGのM蛋白が認められるような場合には偽低値となる可能性もあり、注意が必要である。また、本検討ではRFの影響は確認されなかったが、丹野らの報告²⁾では、「M2高値陽性例において、RFの添加による負の影響が認められた」とあり、干渉チェックRFプラス及びヒト血清添加時に影響が確認されている。より高値の検体で検討を行った場合、IgA、IgM及びRFの影響が確認された可能性があるが、今回は追加で高値検体を用いた検討は行うことはできなかった。

ステイシアとエリアの相関はdsDNAが最も良好であるが（ $r=0.895$ ）、測定方法間にはばらつきが認められ、相関性は乏しいと考えられる。判定一致率については最も低いPR3-ANCAで78.2%であり、概ね良好な結果が得られたが、測定方法間での判定不一致が散見された。ステイシアとエリアの乖離検体について確認試験を実施し、陽性の場合には各自抗体の特異反応とした（確認試験陽性）。阻害試験の基準については明確な数値を決めるエビデンスが無いため、目安の阻害率に達しないがある程度の阻害が認められた症例（±）についても確認試験陽性とした。解析できた乖離例のうちステイシア：陽性と確認試験の結果が一致した症例は、全50例中46例であった。不一致例にはカットオフ

値付近の差異と考えられる症例 (Table 4AのNo. 20, No. 26, No. 34), Blank 粒子と反応した症例 (Table 4AのNo. 27) が挙げられる。Table 4AのNo. 27について, MPO-ANCA 確認試験のIFAで抗体が検出されているが阻害試験が陰性, Blank 粒子との反応が確認されたため, 総合的に判断して非特異反応と考えられた。一方, エリア:陽性と確認試験の結果が一致した症例は, 全90例中87件であった。不一致例には架橋剤Streptavidinと反応した症例 (Table 4BのNo. 49), 他物質との非特異反応と考えられる症例 (Table 4BのNo. 24, No. 50) が挙げられる。

乖離の原因として, 阻害試験やその他の確認試験の結果から, 試薬に使用している抗原の種類の違いが挙げられる。また, ステイシア陽性/エリア陰性は50例に対してエリア陽性/ステイシア陰性が90例であり, ステイシア陰性が多く確認されたことから, ステイシアの測定反応時間はエリアよりも短く, 抗体の結合が不十分であった可能性も考えられる。使用抗原や測定時間の違い以外にも, 試薬の組成や測定系に由来する乖離が考えられる。ステイシアdsDNAとMESACUP2-dsDNAの検討を行った西山らの報告³⁾では, 洗浄液の塩濃度の違いを乖離の原因に挙げている。ステイシアで使用する洗浄液はMESACUPで使用するものよりも約2倍塩濃度が高く, 塩濃度の高い測定環境では低親和性の抗体は抗原と結合できなくなり, 高親和性の抗体が選択的に測定され, ステイシアdsDNAの測定値が低値または陰性化するという。本検討ではエリアとの比較であるが, ステイシアdsDNAの陰性例 (エリアdsDNA陽性) が多く確認されており, この乖離例に対する確認試験では多くの症例で陽性判定となり, エリア法の測定結果が目的の抗原抗体反応によるものであることが示唆されたことより, 今回のdsDNAの乖離に関しても洗浄液の濃度差が原因である可能性が考えられる。また, SS-Aの乖離原因に関して, エリアSS-AはRo60及びRo52の抗体を検出するのに対して, ステイシアSS-Aはシェーングレン症候群に対する特異性を優先しているため抗Ro60抗体のみが検出可能である。このため, Ro52の抗体が存在する症例ではエリアでは陽性, ステイシアでは陰性となる可能性がある。さらに, ステイシア試薬に使用されている磁性粒子 (Table 4AのNo. 27) やエリア試薬の架橋剤Streptavidin (Table 4BのNo. 49) と反応する物質の存在により, 偽陽性となった症例も確認された。このように, それぞれの測定方法・試薬の特性により, 不一致検体が認められることがあり注意が必要である。

dsDNAの検体保存安定性については, 冷凍保存では30日目までの安定性が確認されたが, 冷蔵保存では21日目以降にdsDNA測定値の上昇が確認された。今回, 大きな値の変動が確認された検体 (検体2) では, 0日目の測定値が123 IU/mLであったが, 30日目では333 IU/mLと上昇しており, 0日目と比較して171%の変動であった。検体1でも40%の変動が確認されており, 検体によって変動幅に差異はあるが, 保存検体でdsDNAを測定する場合は, このことに留意して検査を行う必要があると考える。

5. 結論

CLEIAを用いた全9項目のステイシア試薬の性能評価を実施した。再現性や希釈直線性, 定量限界の結果は概ね良好であったが, IgG型M蛋白の影響の可能性が示唆された。エリアとの比較に関して, ステイシアの測定値と乖離する検体が確認され, 使用する機器や試薬によって測定方法や使用抗原が異なるため, 相関や一致率が低くなる事が考えられる。それぞれの試薬の特性を考慮することが重要であり, 試薬変更の際には臨床側への説明が必要である。

しかし, 本試薬は「全自動臨床検査システムSTACIA」への搭載により, 測定時間が約19分と大幅に短縮されることで, 診察前検査が可能となり迅速な診断への貢献が期待される。

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

- 1) 川崎芳正, イムノアッセイにおける測定系妨害物質の分析, 機器・試薬, 2017;40(3):212-216
- 2) 丹野瑞木, 谷合麻紀子, 樽井俊介ほか, 新しい抗ミトコンドリア抗体検出試薬ステイシアMEBLuxテストミトコンドリアM2の基礎性能及び臨床的有用性の検討, 医学と薬学, 2012;67(3):485-495
- 3) 西山進, 浅沼浩子, 塩川美穂ほか, 新しい抗2本鎖DNA抗体測定試薬「ステイシアMEBLuxテストdsDNA」の基礎性能と臨床的有用性の検討, 医学と薬学, 2013;69(4):689-698
- 4) 岡田潤, 中川敬仁, 掛川真弓ほか, 抗DNA抗体測定試薬「ステイシアMEBLuxテストdsDNA」の臨床的有用性の検討, 医学と薬学, 2013;70(3):651-658

新規自動分析装置コバス pro<503>による ALB, Ca, Mg およびTG項目の測定性能および搭載機能の有用性評価

Evaluation of ALB, Ca, Mg and TG Measurement Performance and Usefulness of Built-in Functions using the New Automatic Analyzer, “cobas pro<503>”.

田中真輝人¹⁾ 梅森祥央¹⁾ 高橋祐輔²⁾
遠藤輝夫²⁾ 浅沼康一¹⁾ 高橋 聡^{1,3)}

要旨 新規自動分析装置「コバス pro<503>」の開発に伴い、ALB, Ca, MgおよびTG項目の測定性能と、本装置搭載機能の有用性を評価した。正確さおよび精密さは日本臨床化学会の示す評価基準を満たし、また、試薬安定性の大幅な向上が確認された。しかし、TGにおいて、溶血ヘモグロビンおよび乳糜の添加で正、抱合型ビリルビンあるいはアスコルビン酸で負の干渉を認めた。機器評価により、超音波洗浄機能およびオートキャリブレーション機能の有用性が実証され、精密さの向上はもちろん、日常検査業務の効率・省力化やコストの低減をもたらすと考えられた。

Key words cobas pro<503>, cap piercing, ultra sonic cleaning, carry-over, auto calibration

1. はじめに

生化学検査は、血液や尿・穿刺液などの試料中に含まれる成分の分析により、全身状態の把握や疾病の診断に有用な情報を提供する。現在の生化学検査の大部分は自動分析装置を用いて実施されており、精密さや迅速性が担保されていることが特に重要である。また、新規自動分析装置の性能を評価することは我々臨床検査技師の責務である。

近年、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社（以下、ロシュ）が、コバス pro<503>（以下、c503）を開発した。c503は、試薬安定性の向上、キャリーオーバーの低減および検量線の自動補正を目的に、キャップ

ピアッシング方式、超音波洗浄機能やオートキャリブレーション（以下、Auto cal）機能をそれぞれ備えている。また、機器動作中の試薬架設も可能であり、精密さの向上や検査業務の効率・省力化をもたらすだけでなく、検査結果報告遅延の回避にも寄与すると考えられる。

そこで今回、c503によるALB, Ca, MgおよびTG試薬における測定性能と、本装置搭載機能の有用性を評価したので報告する。

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

Received Feb. 19, 2020; Accepted Oct. 15, 2020
Makito TANAKA¹⁾, Yoshifumi UMEMORI¹⁾, Yusuke TAKAHASHI²⁾, Teruo ENDOH²⁾, Koichi ASANUMA¹⁾, Satoshi TAKAHASHI^{1,3)}

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, Hokkaido 060-8543, Japan)

²⁾ 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, Hokkaido 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
Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital, Japan (291, South-1, West-16, Chuo-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8543, Japan)

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

した、残存血清およびヘパリンリチウム加血漿を用い、顕著な溶血、乳糜を呈する試料は対象から除外した。なお、本検討は、当院臨床研究審査委員会の承認（整理番号：302-172）を受け、観察研究として実施した。

2) 測定機器、試薬および原理

ALB, Ca, MgおよびTGの測定には、それぞれc503の専用試薬である「コバス システム-Gコバス試薬 ALB Gen.2」(BCG法),「コバス システム-Gリキテック Ca II」(NM-BAPTA法),「コバス システム-Gリキテック Mg II」(キシリジブルー法),「コバス システム-Gコバス試薬 TRIGL」(遊離グリセロール非消去酵素法)を用い、c503(いずれもロシュ)で測定した。比較対照には、各項目の汎用試薬である「LタイプワコーALB-BCP」(BCP改良法, 富士フイルム和光純薬株式会社),「セロテック」Ca-AL」(アルセナゾⅢ法, 株式会社セロテック),「セロテック」Mg-L」(酵素法, 株式会社セロテック),「デタミナー-L TG II」(遊離グリセロール消去酵素法, 日立化成ダイアグノスティックス・システムズ株式会社)を使用し,「LABOSPECT 008」(株式会社日立ハイテック)で測定を行った。

3) 測定機器の特徴

c503における最大の特徴は、Auto Cal機能である。本機能は、ロシュのマスター機と施設機との装置間差およびマスター機で解析した各試薬ロットの情報から検量線の自動補正を行うため、施設機で新ロット試薬を架設した時に較正の必要がない。すなわち、ロシュのマスター機で得た当該項目における全試薬ロットの較正情報と各試薬ロット間差が、cobas linkを介し施設機に随時配信される。次に、施設機とマスター機における特定ロット

試薬の各較正情報から、装置間差を求める。試薬ロット変更時には、以上の試薬ロット間差と装置間差から、施設機での較正を仮定した際の吸光度が算出され、検量線が自動補正される。

また、キャップピアッシング方式の採用により試薬のクローズド化が促進され、試薬安定性が大幅に向上している。さらに、検体プローブの超音波洗浄を生化学項目で500、電解質項目では150回の分注後、項目指定時、クロット検知時あるいは装置停止時に実施することで、検体間キャリーオーバーの低減やプローブメンテナンスの頻度減少をもたらす。

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ナル算出用プログラム Validation-Support-V3.5¹⁾を用いた。

3. 検討方法および成績

1) 正確さ

正確さは日本臨床化学会の指針に基づき評価した。すなわち、IRMMの「ERM-DA470k/IFCC」,ReCCSの「JCCRM 321-8」および「JCCRM 224-13」を5重測定した。その平均値と各標準物質の認証値との差(バイアス)を求め、それが各項目の「±認証値×B_A(analytical bias:%)」の値以内であるか確認した²⁾。ただし、MgはB_Aが示されておらず、TGはB_Aが上限である5%を超えるため、B_Aは5%として計算した。その結果、いずれの項目もバイアスは±認証値×B_A(%)の値以内であった(Table 1)。

2) 併行精度

各項目2濃度のプール試料をそれぞれ20回連続測定した

Table 1 Trueness.

Sample	Certified value	Expanded uncertainty	mean value	Bias	±(Certified value×B _A %)	
ALB (g/dL)	ERM-DA470k/IFCC	3.72	0.12	3.67	-0.05	±0.05
Ca (mg/dL)	JCCRM 321-8 M	10.4	0.11	10.4	0.0	±0.1
	JCCRM 321-8 H	12.4	0.13	12.4	0.0	±0.1
Mg (mg/dL)	JCCRM 321-8 M	2.03	0.02	2.06	0.03	±0.10
	JCCRM 321-8 H	2.98	0.03	3.02	0.04	±0.15
TG (mg/dL)	JCCRM 224-13	131.9	1.6	135.2	3.3	±6.6

*Analytical bias

Table 2 Repeatability

	(n=20)							
	ALB (g/dL)		Ca (mg/dL)		Mg (mg/dL)		TG (mg/dL)	
	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High
Mean	3.51	4.79	8.71	10.90	1.99	2.83	108	292
SD	0.02	0.02	0.04	0.05	0.01	0.01	0.56	2.00
CV (%)	0.46	0.38	0.43	0.47	0.44	0.45	0.52	0.68

Table 3 Intermediate precision.

	(n=30)							
	ALB (g/dL)		Ca (mg/dL)		Mg (mg/dL)		TG (mg/dL)	
	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High
Mean	3.55	4.84	8.76	10.80	1.99	2.85	108	276
SD	0.04	0.04	0.06	0.15	0.01	0.02	0.91	6.82
CV (%)	1.09	0.81	0.72	1.39	0.59	0.56	0.85	2.47

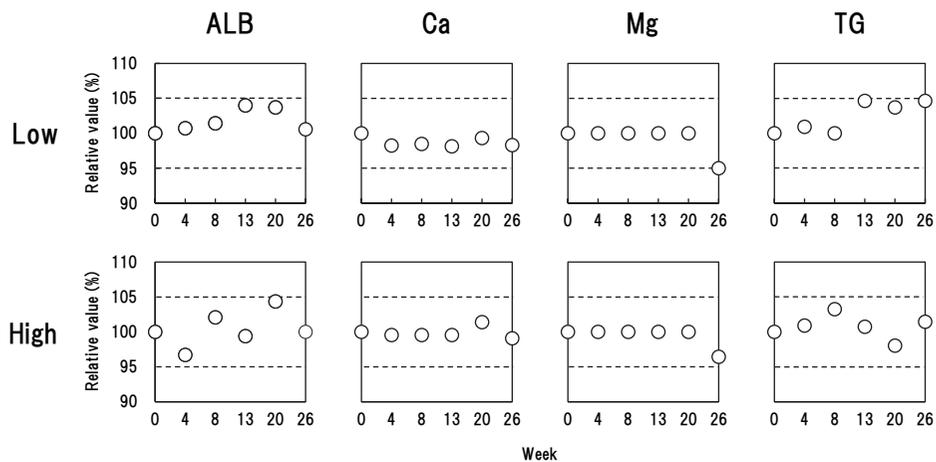


Fig. 1 Reagent stability.

Dotted line : $\pm 5\%$ of the value on the first day.

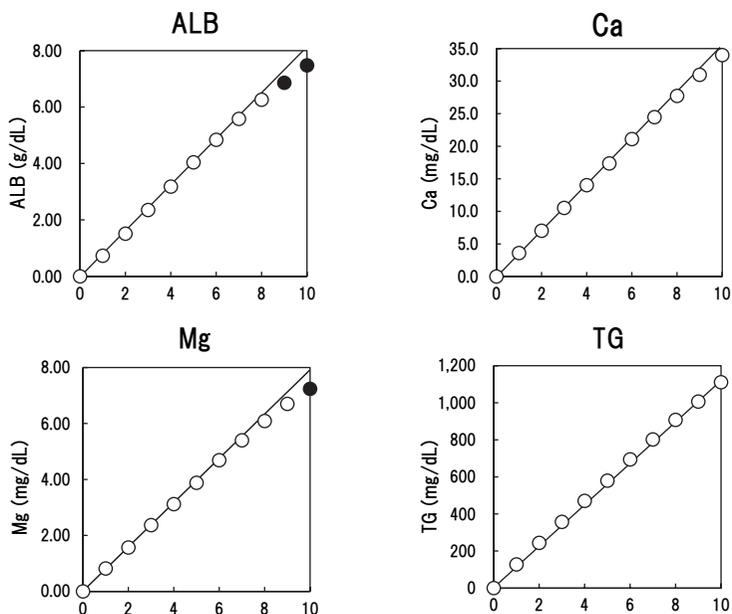


Fig. 2 Dilution linearity.

● : Average value without linearity.

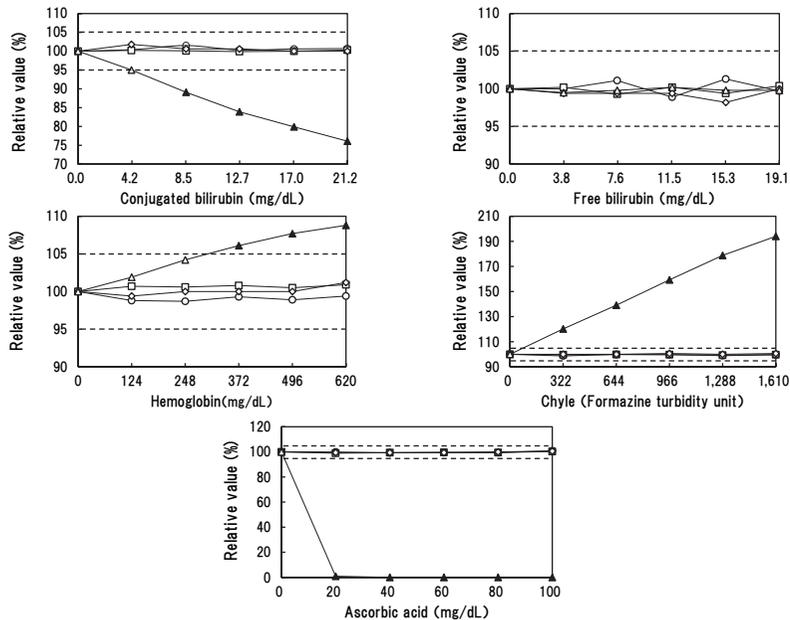


Fig. 3 Effects of interference substances.
 ○ : ALB □ : Ca ◇ : Mg △ : TG
 Dotted line : ± 5% of the value without addition.

ところ、変動係数 (以下, CV) は0.38~0.68%であった (Table 2)。

3) 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c503専用キャリブレーター (以下, C.fas) にて較正を行った。その結果、各項目の総合CVは最大でも2.47%であった (Table 3)。

4) 試薬安定性

室内再現精度に続いて、同様の試料を試薬の性能保証期間である26週目まで、任意の時点で1日2回測定した。初日の値±5%を超えた場合を影響ありとすると、いずれの項目も26週目まで測定値は安定していた (Fig. 1)。

5) 希釈直線性

希釈直線性を検討するため、各項目の高値試料を生理食塩水で10段階希釈後3重測定した。ALBの高値試料は、ロシュから提供された約7 g/dLのリコンビナントヒトアルブミン水溶液を用いた。また、CaおよびMgはハイレベルチェック・Sプラス、TGはハイレベルチェック・TG (いずれもシスメックス株式会社) を添付文書に従い溶解後、Caは約35 mg/dL、Mgは約8 mg/dL、TGは約1,200 mg/dL

になるように希釈調製した。直線性の評価は、まず、各希釈系列の測定値の中で数点 (2/10から5/10) を用いて作成した回帰式を用いて各系列の理論値を算出した。次に、理論値に対する測定値の偏差率を算出し、5%以内である範囲を直線性ありと判断した。その結果、ALBは6.26 g/dL、Caは34.0 mg/dL、Mgは6.70 mg/dL、TGは1,111 mg/dLまで直線性が得られた (Fig. 2)。

6) 共存物質の影響

各項目について基準範囲中央値付近濃度に調製したプール試料を用意し、5段階濃度の抱合型および非抱合型ビリルビン、自家調製溶血ヘモグロビン、乳糜、アスコルビン酸をそれぞれ添加後3重測定することで共存物質の影響を確認した。共存物質未添加時の測定値±5%を超えた場合を影響ありとした。その結果、ALB、CaおよびMgは抱合型ビリルビン21.2 mg/dL、非抱合型ビリルビン19.1 mg/dL、溶血ヘモグロビン620 mg/dL、乳糜1,610 FTU、アスコルビン酸100 mg/dLの添加まで測定値は安定していた。一方、TGについては、溶血ヘモグロビンおよび乳糜はそれぞれ372 mg/dL、322 FTU以上の添加で正の影響を、抱合型ビリルビンおよびアスコルビン酸は8.5 mg/dL、20 mg/dL以上の添加で負の影響を認めた (Fig. 3)。

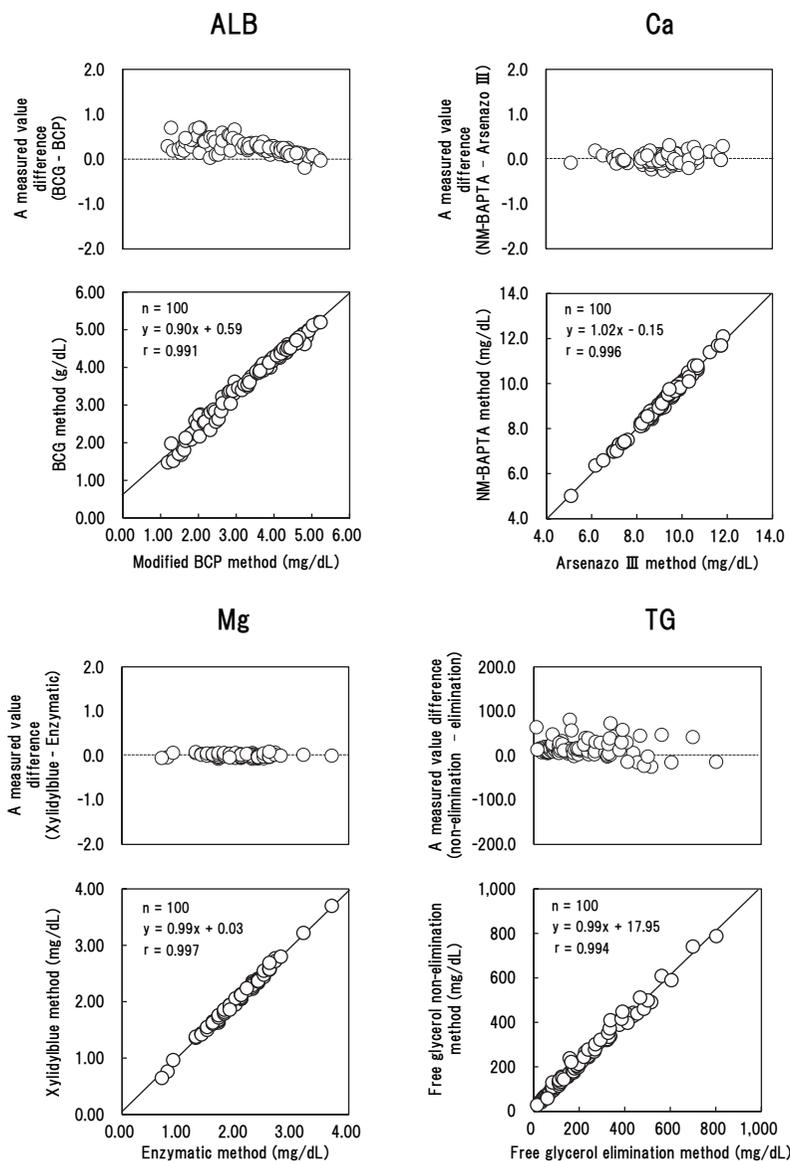


Fig. 4 Correlation between measured value of study reagent (y) and control reagent (x).

7) 相関

各項目について患者の血清あるいはヘパリンリチウム加血漿を100例ずつ用いて、本試薬と対照試薬との相関性を解析したところ、ALBは相関係数 $r=0.991$ 、標準主軸回帰式 $y=0.90x+0.59$ 、Caは $r=0.996$ 、 $y=1.02x-0.15$ 、Mgは $r=0.997$ 、 $y=0.99x+0.03$ 、TGは $r=0.994$ 、 $y=0.99x+17.95$ であった (Fig. 4)。

8) キャリーオーバー試験による超音波洗浄効果の検証

HBs抗原高値血清 (約30,000 IU/mL) 1本について、生化学11項目 (AST, ALT, ALP, γ -GT, LD, CK, AMY, P-AMY, BIL, Fe, フェリチン) 分のサンプリングを連続して実施したのち、検体プローブの超音波洗浄を行った。次に、上記と同様のサンプリングをHBs抗原陰性血清1本に対して行った後、cobas 8000<

Table 4 Results of carry-over test.

	Ultra sonic cleaning	Non ultra sonic cleaning
HBsAg positive serum (IU/mL)		29,584
HBsAg negative serum (IU/mL)	0.001	0.016

Table 5 Results of auto calibration.

	ALB (g/dL)			Ca (mg/dL)			Mg (mg/dL)		
	C.fas	cc1	cc2	C.fas	cc1	cc2	C.fas	cc1	cc2
Indicated value	3.76	3.19	4.71	11.20	9.02	13.70	2.72	1.95	3.26
Measured value (new lot reagent)	3.66	3.10	4.55	11.07	8.96	13.53	2.72	1.94	3.29
Bias	-0.10	-0.09	-0.16	-0.13	-0.06	-0.17	0.00	-0.01	0.03
± (Indicated value × B _A %)	±0.19	±0.16	±0.24	±0.56	±0.45	±0.69	±0.14	±0.10	±0.16

*Analytical bias

e801 > (ロシユ)にて陰性血清のHBs抗原を測定した。また、上記と同様の操作を検体プローブの超音波洗浄を実施せずに行った。すなわち、超音波洗浄実施の有無による陰性血清のHBs抗原値を比較することで、c503の超音波洗浄効果を検証した。なお、陰性血清のHBs抗原値は感度(0.05 IU/mL)未満であったため、ロシユの検量線ソフトによりシグナル値から計算で求めた。その結果、超音波洗浄の有無によるHBs抗原値は、「なし」で0.016 IU/mLから「あり」で0.001 IU/mLに16倍低減した(Table 4)。

9) Auto cal機能の評価

Auto cal機能を評価するため、まず、ALB、CaおよびMgの初回試薬架設時にC.fasを用いて通常の2点校正を行い、その後、新ロット試薬を架設しAuto cal機能により検量線を自動補正した。次に、C.fas、2濃度のコントロール(cc1、cc2)を測定し、測定値と表示値のバイアスを求め、それが±表示値×B_A(%)以内であるかで正確さを評価した²⁾。ただし、標準物質の測定が実施できず厳密な正確さは算出不能であるため、B_Aは上限である5%とした。その結果、いずれの項目のバイアスも、±表示値×B_A(%)以内であった(Table 5)。なお、TGに関しては、現在Auto cal非対応の項目であり、検討を行うことはできなかった。

4. 考察

今回我々は、新規自動分析装置として開発されたコバスpro <503>において、現段階で検討可能な濃度項目であるALB、Ca、MgおよびTG試薬の測定性能と、本装置搭載機能の有用性評価を行った。各項目の標準物質の測定平均値から認証値を差し引いたバイアスは、いずれも、日本臨床化学会の示す正確さの許容誤差限界である±認証値×B_A

(%)以内であった。併行精度および室内再現精度の結果は、ALB、Caでは同学会の定める精密さの許容誤差限界CV_A(coefficient of variation of imprecision)を、またMgおよびTGはその上限である5%を超えず、正確さおよび精密さは良好であった。さらに、各項目とも性能保証期間の26週目まで測定値は安定しており、対照試薬の性能保証期間と比較して明らかに試薬安定性が向上していた。これは、キャップピアッシング方式の採用により試薬の蒸散濃縮が極力回避されているためと考えられた。

各項目の希釈直線性および対照試薬との相関性を検討したところ、いずれも添付文書上の測定上限を上回る濃度まで直線性が確認され、また、相関係数は良好であった。ALBで回帰式の傾きが0.90と低めであったが、これは対照試薬の測定原理がBCP改良法であるのに対して本試薬はBCG法であることから、低濃度域で測定値に差が生じたためと推察された³⁾。現在、海外ではBCG法が主流である一方、本邦では大多数の施設で特異性が高いBCP改良法が採用されている。さらに、2019年には日本臨床検査医学会よりBCP改良法への完全移行を促す提言がなされ、今後本邦においてBCP改良法への標準化が進行すると予想される⁴⁾。そのため、本来であればBCP改良法を検討試薬として相関性を評価すべきだが、ロシユから上市されているc503用のALB試薬はBCG法のみであり、本検討では実施できなかった。また、TG測定法における本邦の主流は内因性遊離グリセロール(FG)消去法で、諸外国では内因性FGを含む総グリセロールを測定する非消去法が増加している⁵⁾。すなわち、国内外において2種類のTG測定法が存在し、国際標準化の観点からTG測定におけるFG消去の是非が議論されている。そこで本検討ではFG非消去法を検討試薬として相関性評価を行い、実際、本法ではFGの測り込みが一因と考えられる切片の上昇がみられた。しかし、

厳密に言えば、ALBでは反応性を異にする2法、TGは測定対象物が違う測定系での比較であるため、従来の機器・試薬との互換性を評価するにあたってやや不適切である。さらに、TGにおいてFG非消去および消去法間の測定値差を評価する際は、疾患、投薬などの患者情報が考慮されるべきであるが、本検討では詳細に解析できなかった。今後、標準化の議論が進展し、改めて評価を行う際には課題とした。

ALB, CaおよびMgに関して、検討範囲内で各共存物質の添加による測定値への影響はみられなかった。一方、TGでは溶血ヘモグロビンおよび乳糜の添加で正、抱合型ビリルビンあるいはアスコルビン酸では負の影響を認めた。乳糜のみならず溶血ヘモグロビンで正誤差をきたしたのは、本試薬の測定波長である505nmではヘモグロビンの吸収波長の影響を受け、1ポイントアッセイかつ副波長が700nmである本試薬では溶血由来の吸光度を差し引くことができなかつたためと推察された^{6,7)}。また、反応系にペルオキシダーゼを用いる測定法では、還元性物質の存在により負の干渉を受ける⁷⁾ことが知られており、本TG試薬においても還元作用のある抱合型ビリルビンやアスコルビン酸により測定値が低下し、特にその作用が強い後者でそれは顕著であった。本邦製の試薬は、還元作用に対する阻害剤の添加により、共存物質の存在下においても測定値の安定性が保たれている。しかし、本試薬を含めグローバル製の試薬では、共存物質の影響を回避する対策が講じられていないことがあり、その理由として諸外国では共存物質に対する考え方が本邦と異なることが挙げられる。海外では測定試薬が共存物質を受けることを考慮して臨床判断が行われ、また、共存物質は患者試料の情報として臨床報告することが一般的のようである。そのため、グローバル製の試薬では、本邦試薬のように干渉を回避する方策が積極的にとられていないと考えられる。

生化学自動分析装置に求められる性能の1つとして、検体間キャリアオーバーの低減⁸⁾があり、c503では検体プローブの超音波洗浄を行い、その性能を強化している。そこで、HBs抗原高濃度検体を用いて、キャリアオーバー試験を行ったところ、超音波洗浄を実施した場合に影響がより低減された。従来、1本の採血管で生化学項目と免疫項目の依頼があった場合は、別容器に分取し各分析装置の測定に供する、あるいは免疫分析装置で測定したのちに生化学分析装置で測定するプロセスを介していた。しかし、超音波洗浄機能によりキャリアオーバーの低減が確認されたことから、煩雑な行程を経ることなく生化学および免疫項目を同

時測定することが可能となり、検査業務の効率化をもたらすと示唆された。

Auto cal機能の検証では、いずれの試料においてもバイアスは±表示値×B_A(%)以内と良好な結果が得られたが、未だAuto cal非対応の項目があることや、比濁法試薬のように試薬ロット間差が大きい⁹⁾と考えられる項目についての評価は今後の課題である。しかし、本機能を活用することで、マニュアル較正の頻度減少など検査業務の省力化が期待されることから、今後、Auto cal対応項目の拡充とその評価は必須である。

5. 結語

コバス pro<503>によるALB, Ca, MgおよびTG項目の測定性能は概ね良好であった。特に、試薬安定性の大幅な向上、検体間キャリアオーバーの低減、さらに検量線自動補正機能により、精密さの向上はもちろん日常検査業務の効率・省力化に寄与し、患者・臨床検査技師双方に有用な付加価値を与える自動分析装置であると考えられた。

文 献

- 1) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会. Validation-Support/Excel Ver.3.5. http://jscc-jp.gr.jp/?page_id=1145
- 2) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会. 生理的変動に基づいた臨床化学検査36項目における測定の許容誤差限界. 臨床化学 2006;35:144-153.
- 3) 田中真輝人, 高橋祐輔, 梅森祥央ほか. ALB測定方法の違いを考慮した新たなCa補正式の検討. 臨床病理 2016;64:619-24.
- 4) 血清アルブミン測定の標準化に対する提言. <https://www.jsml.org/about/jsml/20190425.pdf>
- 5) 山本 肇, 佐竹奏一, 二本柳洋志ほか. 遊離グリセロール未消去による総グリセライド測定の検討—中性脂肪測定国際標準化を見据えた基礎検討—. 医学検査 2016;65:209-15.
- 6) 小川善資. 比色分析装置の基礎. 生物試料分析 2013;36:273-80.
- 7) 影山信雄. 現在行なわれている尿酸測定法の特徴と問題点. 尿酸 1983;7:225-34.
- 8) 坂本竜雄, 大西計子. 全自動生化学・免疫統合装置「cobas6000<501/601>」の性能評価—生化学検査・免疫検査 統合型システムのキャリアオーバーに関する基礎的検討—. 医学と薬学 2013;70:349-56.
- 9) 和出弘章. 免疫検査とは? 日常検査における免疫検査の位置付け. 生物試料分析 2017;40:145-50.

自動分析装置 コバス pro<503>による LD および ALP IFCC 法対応試薬の基礎的検討

Fundamental Study of IFCC Methods for Measurement of LD and ALP by the New Automatic Analyzer, "cobas pro<503>"

梅森祥央¹⁾ 田中真輝人¹⁾ 高橋祐輔²⁾ 浅沼康一¹⁾ 高橋 聡¹⁾³⁾

要旨 新たに開発された自動分析装置コバス pro<503>を用いて、LDおよびALPのIFCC法対応試薬（IFCC試薬）の基本性能を評価した。その結果、併行精度および室内再現精度は両試薬とも良好な成績であった。開封後の試薬安定性はLDでは26週目、ALPでは13週目まで安定していた。希釈直線性は、両試薬ともメーカー推奨値を超えた直線性を確認できた。共存物質の影響では、溶血ヘモグロビンおよびアスコルビン酸の添加濃度依存性に、LDで正の影響を、ALPでは負の影響を受けた。IFCC試薬とJSCC試薬との相関性は良好であったが、両者ともIFCC法で低値に乖離する例がみられた。LDでの乖離例はいずれも肝・胆道系疾患をきたしており、アイソザイム分析においてLD5が高かった。また、LD5が高いほどLD活性値の乖離の程度も大きかった。ALPのIFCC値はJSCC値の約1/3となり、小腸型ALPの出現でより低値となることが確認された。c503を用いたLDおよびALPのIFCC試薬の基本性能は概ね良好で、特にキャップピアッシング方式により試薬安定性に優れ、日常検査に有用と考えられた。

Key words cobas pro<503>, reagent stability, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase, IFCC method,

1. はじめに

近年、Global Harmonizationの必要性が強く認識されるようになり、日本独自の測定方法では、国際的なトレーサビリティや治験への参加が困難な状況になりつつある。すなわち、酵素項目に関しては、日本臨床化学会（Japan Society of Clinical Chemistry;JSCC）から提示された勧告法に準拠した、JSCC標準化対応法（JSCC法）から国際臨床化学連合（International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine;IFCC）のIFCC primary reference procedures（IFCC法）への測定法の移行が議論されてきた。既に、乳酸デヒドロゲナ

ーゼ（Lactate dehydrogenase:LD）とアルカリ性ホスファターゼ（alkaline phosphatase:ALP）は2020年度末までの完了を目的に移行が開始されている¹⁻⁴⁾。現在、LDおよびALPのIFCC法対応試薬（IFCC試薬）は各社より販売されているが、塩基性の強い試薬であり開封後の安定性に問題がある⁵⁻⁷⁾。

最近ロシュ・ダイアグノスティックス（株）より開発された、自動分析装置コバス pro<503>（以下、c503）は、試薬安定性の向上を目的に密閉性に優れたキャップピアッシング方式を採用している⁸⁻¹⁰⁾。そこで今回われわれは、c503の専用試薬であるLDおよびALPのIFCC試薬の基本性能を評価した。さらに、JSCC標準化対応試薬

Received Sep. 14, 2020; Accepted Nov. 5, 2020
Yoshifumi UMEMORI¹⁾, Makito TANAKA¹⁾, Yusuke TAKAHASHI²⁾, Koichi ASANUMA¹⁾, Satoshi TAKAHASHI¹⁾³⁾

¹⁾札幌医科大学附属病院検査部

²⁾北海道医療大学医療技術学部臨床検査学科

³⁾札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座
〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目

¹⁾Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory Science, School of Medical Technology, Health Science University of Hokkaido

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

South-1, West-16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543

Corresponding author: 梅森祥央

Tel: 011-611-2111 (内線36430) Fax: 011-615-3646

E-mail: umemori@sapmed.ac.jp

(JSCC 試薬) との比較を行い、アイソザイムの違いによる測定値の影響も検討した。

2. 材料および方法

1) 材料

(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;302-172)を経て、後ろ向き観察研究として実施した。

(2) 試薬および測定機器

検討機器は c503、検討試薬は IFCC 法の コバス 試薬 LDH IFCC Gen.2 および ALP IFCC Gen.2 (いずれも ロシュ・ダイアグノスティクス (株)) を使用した。校正は、メーカー指定のキャリブレーターである C.f.as. II (JCLLS CRM001d 基準) を用いて 2 点校正を実施した。対照には、JSCC 法の クイックオートネオ LD JS、ALP-JS (いずれも シノテスト (株)) を用い、自動分析装置 LABOSPECT 008 ((株) 日立ハイテック) に搭載した。LD および ALP のアイソザイム分析には、クイックジェル LD・ALP と タイタンジェル LD・ALP 試薬 (いずれも (株) ヘレナ研究所) をそれぞれ使用した。

2) 方法

(1) 併行精度

2 濃度の プール血 を 20 回 連続測定し、併行精度を検討した。

(2) 室内再現精度

併行精度の検討と同様の試料を -80°C で凍結保存し、1 日 2 回、15 日間測定して室内再現精度を検討した。なお、初日にメーカー指定のキャリブレーターを用いた 2 点校正を実施以後、ブランク補正を含め一切の校正をしなかった。

(3) 試薬安定性

開封後の試薬安定性を調べるために、LD では室内再現精度の検討後、引き続き 4 週、8 週、13 週、20 週および 26 週目に測定を行った。また、ALP は設定上可能であった 13 週目まで同様に測定した。室内再現精度初日の平均値を 100% とし、 $\pm 5\%$ 以内の変動を安定性の許

容範囲とした。

(4) 希釈直線性

高活性 プール試料 を生理食塩水で 10 段階希釈後 3 重測定し、希釈直線性を検討した。

(5) 共存物質の影響

検討用の プール試料 (LD:280 U/L, ALP:80 U/L に調整) に、5 段階の濃度の健常者由来溶血ヘモグロビン、乳糜、抱合型ビリルビン、非抱合型ビリルビン (干渉チェック A プラス; シスメックス (株))、および L(+)-アスコルビン酸 (富士フィルム和光純薬 (株)) をそれぞれ添加後 3 重測定し、これらの影響をそれぞれ調べた。共存物質未添加時の平均値を 100% とし、 $\pm 5\%$ を超えた場合を、影響ありとした

(6) 相関性

患者検体 119 例を用いて、本試薬と JSCC 試薬との相関性を検討した。回帰式から $\pm 15\%$ 以上異なる場合を乖離とした。各乖離症例について患者背景を調べ、さらにアイソザイム分析を行った

(7) 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-V3.5¹⁾ を用いた。

3. 結果

1) 併行精度

変動係数 (CV) は LD で 0.48, 0.31%, ALP で 0.50, 0.30% であった (Table 1)。

2) 室内再現精度

総合 CV は LD で 1.23, 1.79%, ALP で 0.71, 0.46% であった (Table 2)。

3) 試薬安定性

LD では今回の検討範囲かつ性能保証期間の 26 週目まで、ALP では性能保障期間の 8 週目を超え 13 週目まで、測定値は安定していた (Fig. 1)。

4) 希釈直線性

LD で 1,913 U/L, ALP で 1,624 U/L まで、それぞれ直線性が得られた (Fig. 2)。

Table 1 Repeatability.

	LD (n = 20)		ALP (n = 20)	
	Low	High	Low	High
Mean (U/L)	169.5	725.3	64.4	667.0
SD	0.81	2.24	0.32	2.09
CV (%)	0.48	0.31	0.50	0.30

Table 2 Intermediate precision.

	LD (n = 30)		ALP (n = 30)	
	Low	High	Low	High
Mean (U/L)	166.7	714.2	63.7	665.2
SD	2.05	12.75	0.45	3.03
CV (%)	1.23	1.79	0.71	0.46

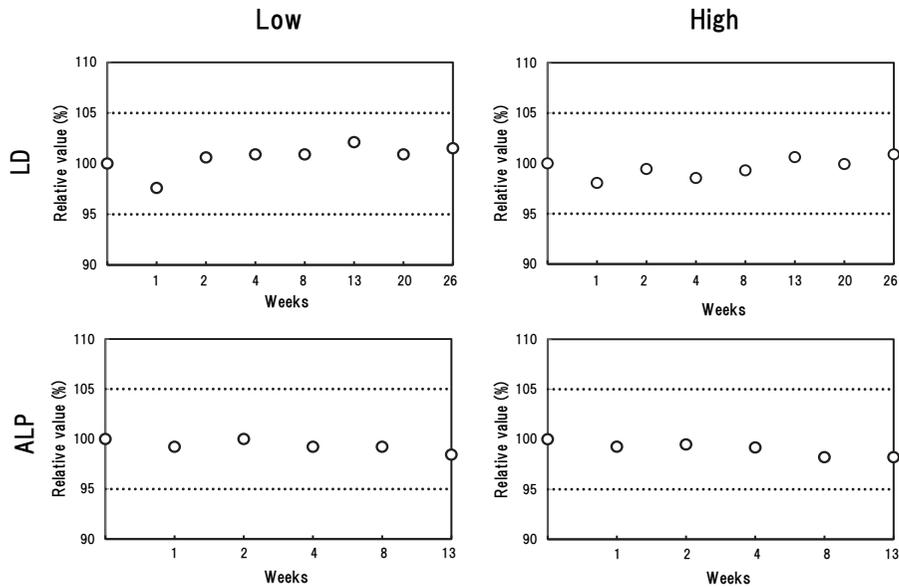


Fig. 1 Reagent stability.

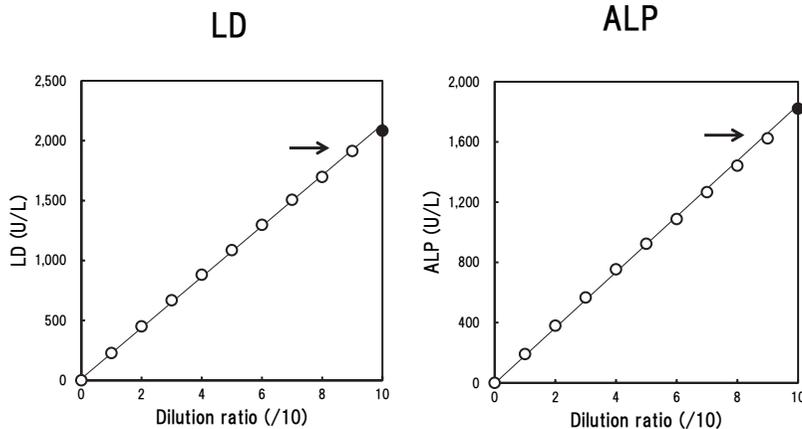


Fig. 2 Dilution linearity.

5) 共存物質の影響

非抱合型ビリルビンは19.1 mg/dL、抱合型ビリルビンは21.2 mg/dL、乳糜は1,610 FTUの添加まで、両測定法における測定値は安定していた。しかし、溶血ヘモグロビンおよびL(+)-アスコルビン酸の添加時には、それぞれ程度は異なるものの、添加濃度依存性にLD活性値が上昇し、ALP活性値が減少した (Fig. 3)。

6) 相関性

LDで相関係数 (r) =0.975、Passing-Bablok回帰式 $y=0.929x+11.143$ 、ALPでは $r=0.998$ 、 $y=0.341x-1.440$ と、いずれも良好な相関を示した (Fig. 4)。しかし、回帰式か

ら±15%以上異なる場合を乖離とすると、LDで7例、ALPで5例認められ (図中黒丸)、いずれもIFCC試薬では、JSCC試薬に比べ低値を示していた。

7) 乖離症例の解析

各乖離症例について患者背景を調べ、さらにアイソザイム分析を行った (Table 3)。LDでの乖離例はいずれも肝・胆道系疾患をきたした症例であった。また、アイソザイム分析をしたところ、いずれの症例もLD5が占める割合が43.3~60.1%と高く、その割合が高いほど両法におけるLD値の乖離は大きい傾向が認められ、最大で27.8%の乖離であった。

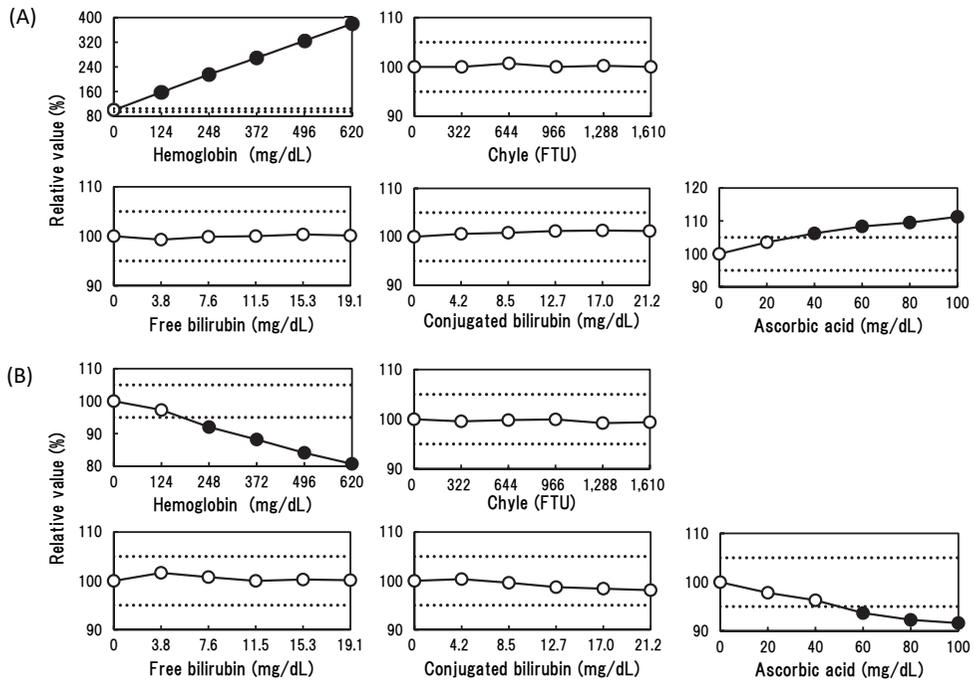


Fig. 3 Effects of interference substances. (A) LD, (B) ALP

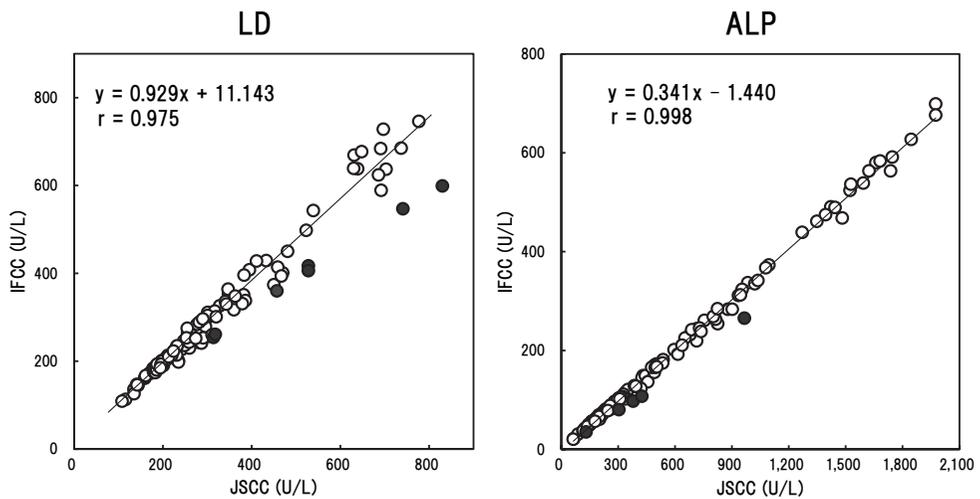


Fig. 4 Correlation between measured values of LD or ALP activity obtained by IFCC and JSCC methods.

Table 3 Isozyme and blood type of discrepant cases.

No.	LD (U/L)		IFCC/JSCC ratio	LD Isozyme (%)				
	IFCC	JSCC		LD1	LD2	LD3	LD4	LD5
1	261	318	0.821	10.9	20.0	15.1	10.2	43.8
2	254	314	0.809	10.1	21.6	16.0	9.0	43.3
3	417	528	0.790	11.2	17.1	12.8	8.7	50.2
4	360	457	0.788	11.6	18.5	11.2	8.7	50.0
5	406	528	0.769	10.8	15.1	11.8	8.9	53.4
6	547	741	0.738	9.2	13.6	7.9	9.5	59.8
7	599	830	0.722	7.7	12.3	9.3	10.6	60.1

No.	ALP (U/L)		IFCC/JSCC ratio	ALP Isozyme (%)					Blood type
	IFCC	JSCC		ALP1	ALP2	ALP3	ALP4	ALP5	
1	265	966	0.274	7.6	36.6	11.2	0.0	44.6	o
2	35	131	0.267	2.7	54.8	14.7	0.0	27.8	o
3	80	304	0.263	3.4	35.5	13.6	0.0	47.5	B
4	97	379	0.256	0.3	29.9	15.5	0.0	54.3	o
5	107	425	0.252	0.3	19.0	23.6	0.0	57.1	o

ALPでは、Table 3に示す症例1でのみ肝・胆道系疾患が認められた。また、乖離全5例の血液型は、O型とB型であった。アイソザイム分析の結果では、小腸型ALPであるALP5が27.8～57.1%と高値であった。

4. 考察

今回我々は、c503を用いたLDおよびALPのIFCC試薬の基本性能を評価した。さらに、JSCC法との相関性を調べ、アイソザイムの違いによる測定値への影響についても解析した。

その結果、両試薬の併行精度は0.5%以内と良好であり、既報よりも優れていた⁵⁻⁷⁾。室内再現精度は最大でも1.79%と、ブランク補正をしない運用でも良好な成績であった。LDおよびALP試薬のpHはそれぞれ9.4または10.2と塩基性が強く、両者の従来試薬における開封後の安定性は1～3週間程度と問題があった⁵⁻⁷⁾。そこで、開封後の試薬安定性を検討したところ、LDは性能保障期間かつ今回の検討範囲である26週目まで、ALPは性能保障期間の8週を超える13週目まで測定値の変動はみられなかった。本測定系で採用したキャップピアッシングボトルでは容器内が密閉され、酸化によるpH変動が抑えられたため、既報よりも著しく長い期間の試薬安定性が可能となったと考えられる。

希釈直線性は、それぞれメーカー推奨値 (LD: 1,000 U/L, ALP: 1,200 U/L) を有意に超えた直線性が確認できた。共存物質の影響を検討したところ、LDでは溶血ヘモグロビンの添加で高度な正の影響を受け、赤血球中に含まれるLDの測り込みが原因と考えられた。また、40 mg/dL以上のアスコルビン酸添加時にも濃度依存性にLD値は上昇した。要因の1つとして、アスコルビン酸の還元作用による測定系の促進が考えられたが、アス

コルビン酸の最大血中濃度は1.5 mg/dL程度であるため、実務上問題ないと思われる。一方、ALPではヘモグロビンおよびアスコルビン酸で濃度依存性に負の影響を受けた。原因として、ヘモグロビンの酸化による吸光度変化¹²⁾、およびアスコルビン酸による還元作用が考えられた。森田らの報告⁷⁾によると、本邦の4社で製造販売されているALP試薬は、試薬中の界面活性剤に何らかの工夫を施され、ヘモグロビンによる影響が軽減されている。しかし、本試薬では溶血の干渉を回避する方策がとられておらず、溶血検体の取扱いには注意が必要である。

LDのIFCC試薬とJSCC試薬との相関性では、IFCC試薬で低値へ乖離する例が散見された。乖離例はいずれも肝・胆道系疾患症例で、さらにアイソザイム分析の結果は全例でLD5が優位であった。また、LD5の占める割合が高いほど乖離の程度が大きくなる傾向が認められた。LD測定においてJSCC法とIFCC法とでは、基質に乳酸を用いる点は同じであるが、JSCC法ではDiethanolamine緩衝液 (pH8.8)、IFCC法ではN-Methyl-D-glucamine (pH9.4) と、緩衝液の種類や反応pHは異なる¹³⁻¹⁶⁾。また、5種のLDアイソザイムは至適pHの違いにより、試薬との反応性がそれぞれ変化する。すなわち、JSCC法の反応pH(8.8)は主に肝疾患で上昇するLD5の至適pHであるのに対し、IFCC法の反応pH(9.4)はLD1～3に至適pHである^{2,14)}。以上より、両試薬間で生じた測定値の乖離は、各検体におけるアイソザイムの優位性の違いが原因と考えられた。

ALPのIFCC値は既報^{4,7)}と同程度にJSCC値の約1/3となったが、低値への乖離例も散見された。LDと同様に、ALPでも緩衝液の種類によって活性値やアイソザイムの反応性が大きく異なる。JSCC法の2-ethylaminoethanol (EAE) 緩衝液 (pH9.9) では各アイソザイムの反応性

が均等であるため、B型・O型の分泌型で脂肪食後に上昇する小腸型 ALP (ALP5) の影響を受ける^{17,18)}。一方、IFCC法の 2-amino-2-methylpropanol (AMP) 緩衝液 (pH10.2) は ALP5 の反応性が低く¹⁹⁾、ALP5 の影響を受けにくい。今回乖離した全5例の血液型はO型とB型であり、ALP5 が高値であった。各症例の乖離の原因として、症例1は肝機能障害由来のALP5の増加、症例2~5では肝機能障害はみられないため脂肪食由来のALP5の上昇が考えられた。また、症例4と5は、JSCC法の基準範囲 (106~322U/L) を超えていたのに対し、IFCC法の基準範囲 (38~113 U/L) 内であった。食餌に起因するALP5の影響を受けにくいIFCC法に変更することは、病態を反映しない異常値が減ることになり、臨床的にも有用と思われる。

以上より、JSCC試薬からIFCC試薬に変更する場合には、アインザイムの違いによる測定値への影響やその程度について十分に理解して検査を実施する必要があると考えられた。

5. 結語

c503を用いたLDおよびALPのIFCC試薬の基本性能は概ね良好で、特にキャップピアッシング方式により試薬安定性に優れ、日常検査に有用と考えられる。また、両試薬ともJSCC試薬と比較し低く乖離する症例があり、注意を要する。

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) 関口光夫. 【JSCC勧告法は磐石か?-課題と展望】酵素項目 (AST, ALT, CK, LD). 臨床検査2014; 58:156-166.
- 2) 山館周恒. JSCC常用基準法の課題. 臨床病理2016; 64:544-549.
- 3) 山館周恒, 山崎浩和, 荒木秀夫ほか. 血清アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定のJSCC勧告法をIFCC標準測定法にトレーサブルな方法への変更に関する提案. 臨床化学 2017;46:138-145.
- 4) 日本臨床化学会 酵素・試薬専門委員会. ALP・LD測定法変更について - 医療従事者向け - ver. 1.0 (2019.11.21). <http://jsc.jp.gr.jp/file/2019/alpld2.pdf>
- 5) 石崎早織, 清宮正徳, 鈴木芳武ほか. D活性測定におけるIFCC対応検討試薬の性能評価. 臨床化学 2018;47:34-40.
- 6) 梅森祥央, 高橋祐輔, 浅沼康一ほか. LD活性測定におけるIFCC対応法試薬の基礎的検討. 医療検査と自動化2020;45:181-186.
- 7) 森田祐貴, 松田将門, 南野徹. IFCC標準測定法に対応した4社のALP活性測定試薬の特性と測定性能の解明. 医療検査と自動化 2020;45:155-167.
- 8) 岸孝明. 次世代生化学・免疫検査統合型分析装置コバスproのご紹介. 医療検査と自動化2020;45:271-273.
- 9) 藤井隆. 次世代生化学・免疫検査統合型分析装置コバスproの試薬ご紹介. 医療検査と自動化2020;45:274-276.
- 10) 田中真輝人, 梅森祥央, 早坂 享子ほか. 自動分析装置コバスpro<503>によるALB, CaおよびMg項目の性能評価. 日本臨床検査自動化学会誌 2019;44:478
- 11) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会. Validation-Support/Excel Ver.3.5. http://jsc.jp.gr.jp/?page_id=1145
- 12) 今野稔, 小川登, 渡邊眞一郎ほか. 酵素活性測定に及ぼすヘモグロビンの影響. 日本臨床検査自動化学会誌 2006;31:790-796.
- 13) 日本臨床化学会. ヒト血清中酵素活性測定の勧告法一乳酸デヒドロキナーゼ. 臨床化学1990;19:228-246.
- 14) 日本臨床化学会. ヒト血清中酵素活性測定の常用基準法一乳酸デヒドロキナーゼ. 臨床化学2003;32:81-85.
- 15) Bais R, Philcox M: Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part8. IFCC Method for Lactate Dehydrogenase (L-Lactate: NAD+Oxidoreductase, EC 1.1.1.27). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Eur J Clin Chem Clin Biochem 1994;32:639-655.
- 16) Schumann G, Bonora R, Ceriotti F et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of Lactate Dehydrogenase. Clin Chem Lab Med 2002;40:643-648.
- 17) 日本臨床化学会酵素専門委員会. ヒト血清中酵素活性測定の勧告法一アルカリホスファターゼ-. 臨床化学 1990;19:209-227.
- 18) 松下誠, 入野勲, 神山清志ほか. 血清アルカリ性ホスファターゼ活性と血液型との関係. 臨床化学 2001;30:217-22.
- 19) Schumann G, Klauke R, Canalias F et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 9:Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. Clin Chem Lab Med 2011;49:1439-1446.

酵素法による Mg 測定試薬の性能評価

Evaluation of the Reagents in the Enzymatic Method for Magnesium

竹田千尋¹⁾ 正司浩規¹⁾ 植田康樹¹⁾ 前田育宏¹⁾ 日高 洋²⁾

要旨 ヘキソキナーゼを用いた酵素法マグネシウム試薬 Lタイプワコー Mg・N (富士フィルム和光純薬株式会社) の性能評価を行った。精度、希釈直線性、定量限界、相関性、共存物質影響試験などの各種分析性能に優れたものであった。試薬安定性は特に優れており、開封後少なくとも40日間安定であるという結果が得られた。また直線性上限の改良により、臨床的に問題となりうる高濃度域の測定、薬剤由来のMg濃度モニタリングにも有効であった。これらの特徴から、本試薬は日常検査薬として大変有用である。

Key words magnesium, enzymatic method, hexokinase, L-Type wako Mg・N

1. はじめに

マグネシウム (Mg) は生体内で4番目に多い陽イオンである。成人生体内には20~28g存在するが、そのうち53~60%が骨中に、27%が筋肉中に、12~19%がその他の組織中に、そして残りの1%が血漿と細胞外液に存在する。325種以上の酵素反応のアクチベーターとして関与し、生理的に重要な役割を果たしているため、Mgの欠乏状態や過剰状態では多彩な症状を呈す¹⁾。血中濃度が高値となれば意識障害などの症状を引き起こすことがあり、切迫早産および重症の妊娠高血圧症候群の治療目的でMg製剤を使用する場合は、投与中に中毒域以下でコントロールするため、Mgの血中濃度を数時間おきにモニタリングする必要がある。血中濃度が高くなるに従い、高Mg血症による症状も重篤となるため、測定結果が高濃度域であるほど臨床への迅速な報告が要求される。

Mg測定法にはキレート滴定法、キレート比色法、蛍光法、酵素法、原子吸光法などがある。原子吸光法はそ

のほかの共存イオンの影響を受けることがなく高感度な方法であり、Reference methodとして用いられてきたが、高価な装置を必要とし、操作も煩雑であることから、日常検査には向きである。従来、日常検査ではキシリジルブルーによるキレート比色法が用いられてきたが、Ca²⁺などそのほかの陽イオンの干渉を完全に除去できないことから、特異性の高い酵素法が普及し、現在に至っている²⁾。

このたび富士フィルム和光純薬社において開発された、ヘキソキナーゼを用いた酵素法試薬で、Mg製剤投与患者に対応するため直線性能を向上させたLタイプワコー Mg・Nの性能評価を行った。

2. 測定原理

試料にアデノシン5'-三リン酸(ATP)を作用させると、試料中のMgはMg・ATP複合体を形成する。Mg・ATPとグルコースは、ヘキソキナーゼ (HK) によりMg・ADPとグルコース-6-リン酸となる。Mg・ADP中のMgはATPと複合体を再形成してMg・ATPとなり、HKに

Received Aug. 20, 2020; Accepted Nov. 9, 2020
Chihiro TAKEDA¹⁾, Hiroki SHOJI¹⁾, Yasuki UEDA¹⁾,
Ikuhiro MAEDA¹⁾, Yoh HIDAKA²⁾

¹⁾大阪大学医学部附属病院 医療技術部 検査部門

²⁾大阪大学医学部附属病院 臨床検査部

¹⁾Division of Clinical Laboratory, Department of Medical Technology, Osaka University Hospital

²⁾Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Hospital

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15

2-15, Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871.

Corresponding author: Chihiro TAKEDA

TEL: 06-6879-6664 (ダイヤルイン)

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

よる反応が連続的に行われる。生成したグルコース-6-リン酸はNADP共存下、グルコース-6-リン酸脱水素酵素により6-ホスホグルコン酸に変換され、同時にNADPはNADPHに還元され、340nmの吸光度が増加する。NADPHの生成速度はMg濃度に比例するため、この速度を測定することにより、試料中のMg濃度を求める³⁾。

3. 対象および方法

1) 対象

当院臨床検査部に提出された外来および入院患者の検査実施後の残余血清検体を用いた。なお、本検討は大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認（承認番号：17198）を得て、当院臨床検査部における残余検体の教育・研究および精度管理への利用⁴⁾に基づき使用した。

2) 測定機器

自動分析装置はJCA-BM6050（日本電子株式会社）を用いた。パラメータの概要は、標準で5倍希釈の血清検体4.5 μLに対し第1試薬（酵素液）を60 μL添加し5分間インキュベーションしたのち、第2試薬（基質液）15 μLを添加して37℃で5分間反応させる。合計反応時間は10分であり、反応時間7分から10分の間の吸光度変化量を主波長340nm/副波長410nmで測光した。

3) 試薬

i) 検討試薬

LタイプワコーMg・N（富士フィルム和光純薬株式会社）

ii) 従来試薬

LタイプワコーMg（富士フィルム和光純薬株式会社）

iii) 共存物質の影響試験用試液

a) 遊離型ビリルビン（Bil-F）

b) 抱合型ビリルビン（Bil-C）

c) 溶血ヘモグロビン（Hb）

d) アスコルビン酸（Ascorbic acid）

（以上、a）～d）富士フィルム和光純薬株式会社）

e) 乳び（イントラリポス：大塚製薬株式会社）

iv) その他

a) 液状コントロール血清IワコーC&C（コントロールL）

b) 液状コントロール血清IIワコーC&C（コントロールH）

c) 血清マルチキャリブレーター

4. 成績

1) 精度

試料として2濃度のコントロール血清を用いて、併行精度は20回連続測定し、中間精度は初日のみキャリブレーションを行い、1日2重測定を20日間行った結果、コントロールLとコントロールHの併行精度（n=20）のCVは0.4%と0.5%、中間精度（n=20）のCVは0.9%と1.0%であった（Table 1）。

2) 定量限界

血清マルチキャリブレーターを試料として生理食塩水で段階希釈したものを試料として、多重測定（n=10）を行った。CVが10%以下となる最小濃度を定量限界とした場合、0.04 mg/dLであった。また、0.0 mg/dLの平均吸光度変化率-2.6SDの値と、各試料の平均吸光度変化率+2.6SDの値が重ならない濃度を検出限界とすると0.03 mg/dLであった（Fig. 1）。

3) 希釈直線性

Mg直線性用試料を生理食塩水で段階希釈したものを試料として検討を行ったところ、20 mg/dLまで原点を通る直線が得られた（Fig. 2）。

4) 添加回収試験

2濃度のプール血清と3濃度に段階希釈したキャリブレータをそれぞれ9対1の割合で添加したものを試料として多重測定（n=3）し、その平均値を測定値として検討を行った。その結果、回収率は92.3%～107.7%（平均回収率99.3%）であった（Table 2）。

5) 共存物質の影響試験

2濃度のプール血清に5種類の干渉物質を添加したもの

Table 1 Reproducibility of Mg assay.

	Within-run(n=20)		Between-day(n=20)	
	Low	High	Low	High
Mean (mg/dL)	2.31	4.26	2.22	4.12
SD (mg/dL)	0.01	0.02	0.02	0.04
CV (%)	0.4	0.5	0.9	1.0
Max (mg/dL)	2.32	4.29	2.27	4.20
Min (mg/dL)	2.29	4.23	2.19	4.05

Table 2 Additional recovery test.

	Additive conc (mg/dL)	Measured value (mg/dL)	Recovery (%)	Average Recovery (%)
	Low	0.00	1.19	-
0.13		1.33	107.7	
0.25		1.44	100.0	
0.50		1.68	98.0	
High	0.00	2.08	-	96.8
	0.13	2.20	92.3	
	0.25	2.33	100.0	
	0.50	2.57	98.0	

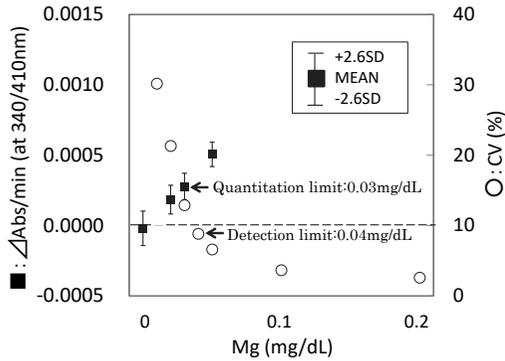


Fig. 1 Detection limit.

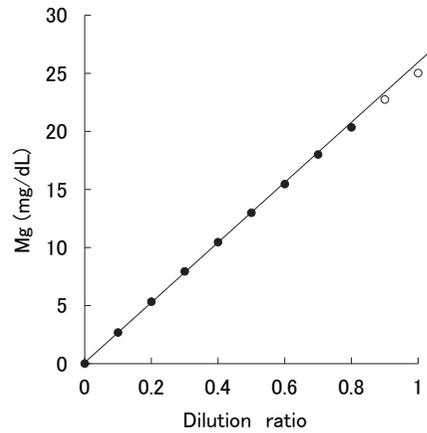


Fig. 2 Dilution linearity.

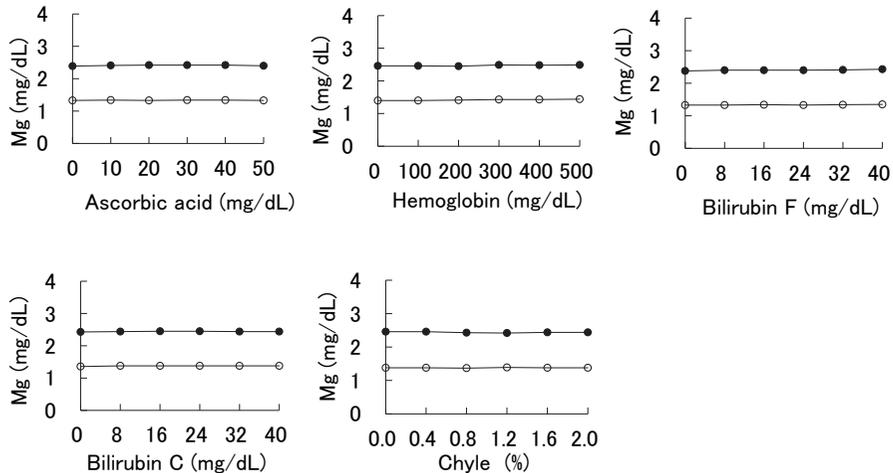


Fig. 3 Effects of interfering substances on Mg assay.

を試料として検討を行った。その結果、アスコルビン酸は 50 mg/dL、溶血ヘモグロビンは 500 mg/dL、ビリルビン F (遊離型) は 40 mg/dL、ビリルビン C (抱合型) は 40 mg/dL、乳びは 2.0% まで影響を認めなかった (Fig. 3)。

6) 相関性試験

患者検体 100 例について検討試薬と従来試薬で相関性を検討した結果、相関係数ならびに回帰式は $r=0.999$, $y=1.00x - 0.008$ であった。また血清 Mg が高くなる傾向があるとされる透析患者検体 50 例についても同様の検討を行った結果、相関係数ならびに回帰式は $r=0.999$, $y=0.99x+0.016$ であった。相関性の検討には標準主軸回帰の計算式を用いた (Fig. 4)。

7) 試薬の安定性試験

2 濃度のコントロール血清を試料として初日のみキャリブレーションを行い、1~5 日間隔で 2 重測定し、42 日間にわたり検討を行った。試薬は開栓保存とし、測定期間中は装置内にて 4℃ で静置した。測定期間中に得られた測定値の平均は、初日の値に対して 98.3%~102.2% の範囲内であった (Fig. 5)。

8) 正確性試験

2 濃度の認証標準物質 (JCCRM 321-8 M, H) を多重測定 ($n=10$) した。認証値 (拡張不確かさ) はそれぞれ 2.03 mg/dL (± 0.02), 2.98 mg/dL (± 0.03) であるのに対し、測定平均値はそれぞれ 2.01 mg/dL, 2.94

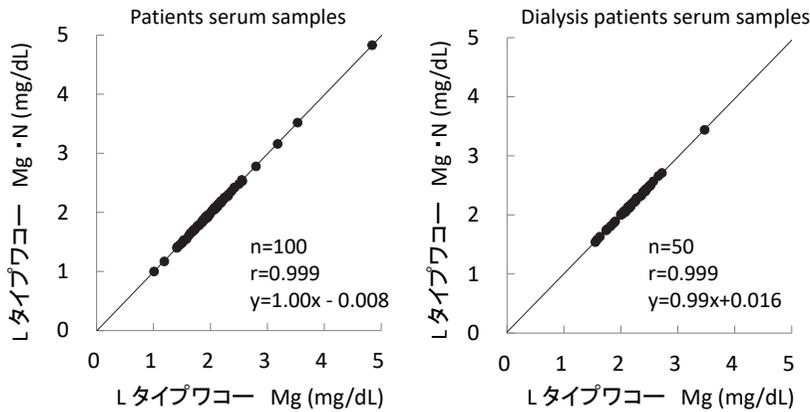


Fig. 4 Correlation of Mg value in patient serum samples and that in dialysis patient samples.

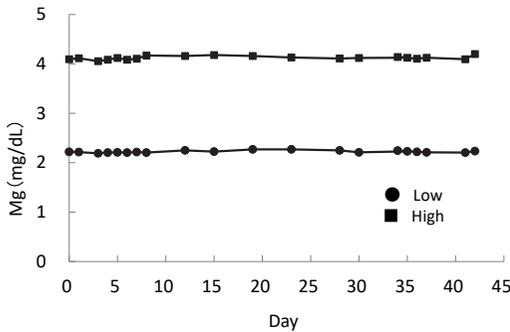


Fig. 5 On board reagent stability test.

Table 3 Accuracy evaluation.

JCCRM 321-8	Mg (n=10)	
	Middle	High
Certified value (mg/dL)	2.03	2.98
Expanded uncertainty (mg/dL)	0.02	0.03
Mean (mg/dL)	2.01	2.94
Max(mg/dL)	2.01	2.96
Min(mg/dL)	1.99	2.92
CV (%)	0.40	0.40

mg/dLであった (Table 3)。

9) マグセント添加試験

プール血清にMg製剤であるマグセント注(東亜薬品工業株式会社)を段階的に添加したものを試料として検討を行った結果、添加濃度に依存した測定結果が得られた (Fig. 6)。

5. 考察

本試薬の精度、定量限界、希釈直線性、共存物質の影響試験は良好であった。正確性試験ではJCCRM 321-8 Mにおいて測定平均値が認証値の拡張不確かさを満たし、臨床的に問題のない正確性であると判断した。試薬安定性は検討期間中に上昇および低下傾向が見られず、42日間と長期にわたって良好であった。マグセント影響試験では薬液添加量に依存して直線的にMg検出量も増加した。

本試薬はHKを用いた酵素法試薬である。HKには数種類のアイソザイムが存在し、それぞれKm値、安定性などの酵素特性に違いがあることが知られている。Lタイプワコー Mg・Nでは反応系により適したHKを使用することで、検量範囲の拡大と長期間安定な試薬の構築を可能にしたものと考えられる。

高齢入院患者に対する緩下剤として酸化Mg (MgO) がしばしば処方されるが、MgO服用により血清Mgは増加傾向となり、腎機能低下例ではさらに血清Mgが増加する⁵⁾。そのためMgO製剤を長期投与する場合には患者への血清Mg測定を行うことが厚生労働省より推奨されている⁶⁾。またMg製剤として使用されるマグセント注は切迫早産における子宮収縮の抑制、あるいは重症の妊娠高血圧症候群における子癇の発症抑制及び治療を目的として用いられる。治療域として4~7.5 mg/dLをターゲットとして点滴で使用するが、Mg中毒の基準は6.7 mg/dL以上で末梢筋力低下、8.4~12 mg/dLで膝蓋腱反射消失、12~14.4 mg/dLで呼吸抑制・麻痺、15 mg/dL以上で呼吸停止とされており、治療域と中毒域

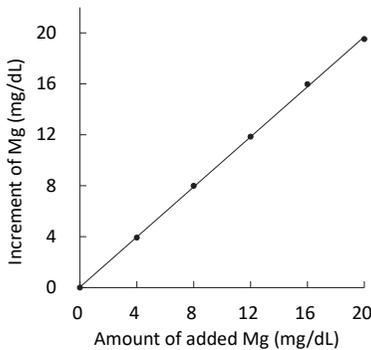


Fig. 6 Effect of Magnesium sulfate on Mg assay.

が近いことから、薬剤使用中は血中Mg濃度を数時間おきにモニタリングする必要がある^{7,8)}。マグセント添加試験の結果、本試薬は中毒域に該当するMg濃度であっても正確な測定が可能であると考えられる。

6. 結論

Lタイプワコー Mg・N は精度、希釈直線性、定量限界、相関性、共存物質影響試験などの各種分析性能に優れていた。試薬安定性は特に優れており、開封後少なくとも40日間安定であるという結果が得られた。また直線性向上により、高濃度における血中Mgモニタリングにも適しており、迅速に臨床側に報告できる。これらの特徴から、日常検査薬として大変有用である。

本論文の発表に関して、開示すべきCOI関係にある企業等はありません。

文 献

- 1) 橋詰 直孝. マグネシウム代謝異常. 日本内科学雑誌 1997;86巻10号:1857-1861
- 2) 金井正光, 臨床検査法提要, 改訂第33版, 金原出版; 東京, 2010, 499-502
- 3) 富士フイルム和光純薬工業(株), 血液・尿検査用マグネシウムキットLタイプワコーMg・N(酵素法) 添付文書 2017
- 4) 林貞夫, 末久悦次, 浅利誠志, 他. 臨床検査部における残余検体の教育・研究および精度管理への利用についてのインフォームドコンセント. 臨床病理 2001;49:273-277.
- 5) 齊藤 昇. 高齢入院患者の血清マグネシウム値への腎機能障害と酸化マグネシウム投与の影響. 日本老年医学会雑誌 2011;48:263-270.
- 6) 厚生労働省安全対策課. 酸化マグネシウムによる高マグネシウム血症について. 医薬品医薬機器等安全性情報No 252 2008;3-5.
- 7) 東亜薬品工業(株), マグセント注 100mL 添付文書 2006
- 8) 安達 知子. 4)薬物治療の実際と問題点((3)クリニカルカンファレンス(1);早産の取り扱いを考える, 生涯研修プログラム, 研修コーナー, <特集>第58回日本産科婦人科学会生涯研修プログラム・卒後臨床研修プログラム). 日本産科婦人科学會雑誌. 2006;9:58

一般社団法人 日本医療検査科学会
2020年度 第4回理事会

- 開催日時： 2020年8月23日（日）13時00分～14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、
 〆谷直人理事、高橋聡理事、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： 通山薫理事

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. 副理事長報告（横田副理事長）

第52回大会がオンデマンド開催となり、関係各所への案内及び開催に向けて準備を進めている。8月5日にJACLaSとの感染対策委員会の打ち合わせを行ったと報告があった。
 - 2-2. 地域担当報告（各理事）

特になし
 - 2-3. 認定POCコーディネーターへの特別移行措置について（事務局）

POC委員会から認定POCコーディネーターへの特別移行措置について以下の報告があった。

特別移行措置対象者181人 移行希望者：153人 辞退者：5人 連絡なし：23人
3. 審議事項
 - 3-1. 2020年度事業報告書（横田副理事長）（資料1）

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. 2020年度予算書（澤部理事）（資料2）

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. 臨時社員総会について（横田副理事長）（資料3-8）
 - (1) 開催案内確認

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。
 - (2) 式次第および資料の確認

資料に基づき説明があり、事業計画書と予算書の対象年度を修正することを条件に申請通り承認された。
 - (3) 出欠はがき確認

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。
 - (4) その他

白井監事より臨時社員総会の日程変更の提案があり、2020年9月26日（土）

16時00分～16時20分でリモート会議にて開催することが決定した。

- 3-4. 会員総会、プログラム委員会、委員長会議実施について（事務局）
第52回大会のオンライン開催に伴い、会員総会への報告内容はHP上に掲載を行い、プログラム委員会、委員長会議は日程調整を行う事で承認された。
- 3-5. 第52回大会共催セミナーキャンセル取扱いについて（横田副理事長）（資料9）
第52回大会共催セミナーをキャンセルされた企業への対応について協議を行った結果、パシフィコ横浜で会場費50%がキャンセル料として払う事を根拠に、半額を返金し第52回大会開催期間である2020年10月1日～10月31日までバナー広告を表示する方針で企業に提案することで承認された。
- 3-6. パシフィコ横浜からのキャンセル料金請求について（石川）（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。
- 3-7. JCCLS年会費納入依頼（石川）（資料11）
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。
- 3-8. 2022年度第54回（神戸）大会長について（萱場理事長）
萱場理事長より推薦があり、日高洋先生（大阪大学）が第54回大会長に承認された。
- 3-9. 編集委員会より論文賞について（高橋理事）（資料12-13）
資料に基づき説明があり、論文賞は原則2名であることが確認され審議の結果申請通り承認された。
- 3-10. 第76回POCセミナー企画申請（日高理事）（資料14）
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。
- 3-11. 科学技術委員会より第1回委員会議事録（日高理事）（資料15）
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。
- 3-12. 委員会委員異動申請（科学、POC、微生物検査）（日高理事）（資料16-18）
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。
- 3-13. その他
 - ・白井監事より初めてのWEB開催のため参加者の減少が見込まれるため、参加者を増やす手段を協議する提案があり、以下の提案があり検討を進めることとなった。
 - ◇オンライン開催でのメリットを前面アピールする
 - ◇臨床検査専門医の点数になるよう申請する
 - ◇情報案内をするためSNS媒体や取材記事にて宣伝を行う
 - ◇理事長・セミナー開催をする各委員長などから案内を発信する
 - ◇コロナに関する特集コーナーを作成する
 - ・事務局より認定POCコーディネーター関連の問い合わせが増えてきた為、POC対応用メールアドレスの作成の申請があり、審議の結果承認された。

4. その他

4-1. 次回開催日程

(1) 第5回理事会

2020年9月26日（土）15:00～15:45 リモート会議

(2) 臨時社員総会
2020年9月26日(土) 16:00~16:20 リモート会議

以上

2020年12月25日

一般社団法人 日本医療検査科学会

議長 菅場 名之 

議事録署名人 白井 秀明 
(出席監事)

議事録署名人 内海 健 
(出席監事)

一般社団法人日本医療検査科学会
2020年度 第5回理事会 議事録

開催日時： 2020年9月26(土)15時00分～15時45分
開催場所： 日本医療検査科学会事務局よりOn-line[Zoom]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、
 ×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. 報告事項

2-1. 総務職務報告(横田理事)

第52回大会の準備を進めている旨の報告があった。ランチョンセミナーをキャンセルした企業については対応が出来た。抄録にてランチョンセミナーの企業名が違うとの指摘を受け、来年以降は複数名もしくは編集委員長が確認するなどの改善点があると感じた。オンデマンド形式となり演題登録のキャンセルを申し出る会員もいたが、そちらは抄録を掲載することとした。機器試薬セミナーについては1名キャンセルがあったが、別の演者が対応する事となった。COIの表示について発表責任者と研究責任者について質問が出て対応した。

2-2. 地域担当報告(各理事)

東北地域担当の萱場理事長より、評議員の推薦を検討しているとの報告があった。

2-3. 臨時社員総会について(横田理事)

(1) 出欠はがき返信数確認(資料1)

評議員：165名中 返信ハガキ：140通

出席：55名 欠席：85名 返信率：85%

この結果から定足数を満たし社員総会は成立すると報告があった。

(2) 議事録署名人の選出について

東田修二社員、多田正人社員の2名を選出候補とすると報告があった。

(3) 式次第および提出資料の最終確認(資料2)

第一号議案 2021年事業計画書について、認定POCC試験について記載がないとの指摘を受け補足説明することとなった。第二号議案 2021年予算書について、委員会費・旅費・交通費の記載について補足説明をする事とした。

(4) その他

通山理事より Zoom 会議の費用についての勘定科目について質問があり、通信費であることを確認した。

2-4. その他

事務局より事務所賃貸の連帯保証人を萱場理事長とし上限を家賃 10 ヶ月分とする覚書を提出する旨を報告した。

3. 審議事項

3-1. 国際交流委員会議事録（資料 3）（萩原理事）

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. その他

ベ谷理事より HP・Twitter に掲載する内容を事前に確認をすべきとの意見があり、今後は掲載前に萱場理事長の了解を得る事で承認された。

4. その他

4-1. 次回開催日程

(1) 理事会

2020 年 12 月 5 日（土）13:00- On-line[Zoom]会議

4-2. その他

特になし

以上

2020 年 12 月 25 日

一般社団法人日本医療検査科学会

議長 萱場 宏之 

議事録署名人 白井 秀明 
(出席監事)

議事録署名人 内海 健 
(出席監事)

一般社団法人日本医療検査科学会

2020年度 臨時社員総会 議事録

開催日時：2020年9月26日（土）16:00～16:20

開催場所：弘前大学医学部大学院医学研究科

（青森県 弘前市在府町5）

出席社員：評議員（社員）55名 はがきによる議決権行使者 85名

社員の出席方法：社員である萱場理事長を除き、web 会議システムを利用して参加した。なお、出席社員全員について、本総会の開催中に回線切断、音声不良等の不具合はなかった。

出席役員：萱場広之理事長、横田浩充副理事長、康東天理事、澤部祐司理事、メ谷直人理事、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

役員の出席方法：萱場理事長を除き、web 会議システムを利用して参加した。なお、出席役員全員について、本総会の開催中に回線切断、音声不良等の不具合はなかった。

議長：萱場広之理事長

議事録作成者：佐久間 良太

1. 開会

定款第28条に従って当社員総会の議長を担当する萱場理事長より挨拶があった。

2. 本総会成立宣言

総会に先立ち、総務担当の横田副理事長より本会の出席者数について次のように報告された。評議員165名中、出席者総数55名（社員41名、役員14名）で、葉書による議決権行使者85名を含めて全体として140名（85%）との報告があった。これを受けて萱場理事長より、定款第30条に照らして本定時社員総会の成立が宣言された。

3. 議事録署名人選出

続いて、議事録署名人として東田修二社員と多田正人社員が選任され、審議に入った。

4. 議案

第1号議案 2021年度事業計画書

- ・横田副理事長より、2021年度の事業計画について、資料に基づいて説明があった。また萱場理事長よりPOCC認定試験は大会期間中の最終日を予定していると追加説明があった。
- ・その後質疑応答に入り、特に質問なく採決に進み満場一致をもって可決承認された。

第2号議案 2021年度予算書

- ・澤部会計担当理事より、2021年度の予算について資料に基づいて説明があ

った。

- ・その後質疑応答に入り、特に質問なく採決に進み満場一致をもって可決承認された。

5. 報告

第1号報告 2022年度大会(第54回)大会長
 萱場理事長より2022年度第54回大会大会長の報告があり、担当する大阪大学の日高洋大会長より挨拶があった。

6. 本年度大会(第52回)大会長挨拶

慶應義塾大学の横田浩充大会長より挨拶があった。

7. 2021年度春季セミナー(第35回)例会長挨拶

琉球大学の前田士郎例会長より挨拶があった。

8. 2021年度大会(第53回)大会長挨拶

長崎大学の柳原克紀大会長に代わり、萱場理事長より第53回大会についての紹介があった。

9. その他

萱場理事長より2022年度春季セミナーを担当する佐賀大学 末岡榮三郎例会長の紹介があった。

10. 閉会

萱場理事長より閉会が告げられた。

以上

2020年12月25日

一般社団法人日本医療検査科学会

議長 萱場 宏之 

議事録署名人 東田 修二 

議事録署名人 多田 正人 

一般社団法人 日本医療検査科学会
2020年度 第6回理事会 議事録

開催日時： 2020年12月5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（ZOOM会議）

出席者： 萱場広之理事長、横田浩允副理事長、康東天理事、澤部佑司理事、
谷直人理事、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： 高橋聡理事

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回大会が終了し、参加者は998名であった。個別検体管理のAI化・臨床検査技師教育等のシンポジウム、技術セミナーが好評で、今後の日本医療検査科学の方向性が分かったと評価を受けたと報告があった。

第53回大会の趣意書説明会を行った。

2-2. 地域担当理事からの報告（各理事）

1) 北海道・東北地区：日本臨床検査医学会と日本臨床化学会の幹事会があり、日本医療検査科学会の九州地区にて催し物を進めていると伝えたと報告があった。

2) 関東地区：特になし

3) 東海・北陸地区：特になし

4) 近畿地区：特になし

5) 中国・四国地区：特になし

6) 九州地区：九州支部の立ち上げ、日本臨床検査医学会と日本臨床化学会の合同地方会への合同開催参加、開催補助金20万円の支出について本理事会で承認された。2021年3月に第1回九州支部の例会を開催する予定だと報告があった。

2-3. 評議員分析報告（佐久間）（資料1）

現状の会員情報を地域ごとにまとめ、資料に基づき報告があった。

2-4. 第52回大会参加登録者の分析結果報告（佐久間）（資料2）

大会参加登録者の情報をまとめ、資料に基づき報告があった。

2-5. 日本臨床検査標準評議会委員会への委員推薦について（萱場理事長）

(資料 3)

資料に基づき説明があり、20 年度公益社団法人日本臨床検査標準評議会 ISO/TC212 国内検討委員会委員に細萱茂実先生を推薦したと報告があった。

2-6. 国際交流委員会 医療技術等国際展開推進事業について (康理事)
 NCGM 国際展開事業が正式に承認され、約 500 万円の予算で COVID-19 に関するオンラインセミナーを来年 1 月に開催する予定で準備を進めていると報告があった。

2-7. その他

萩原理事より第 53 回大会の趣意書説明会の補足説明があった。20 社の企業にご参加いただき、柳原大会長は現地開催への強い意志を伝えた。「金～日曜の開催」「ランチョンセミナーの事前予約」については例年との変更点であると説明したと報告があった。

3. 審議事項

3-1. 評議員推薦 (和田理事) (資料 4)

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 5-13)

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. 学術委員会より各委員会議事録 (通山理事) (資料 14-21)

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。

3-4. 遺伝子分析科学認定士制度審議会委員について (萱場理事長) (資料 22)

遺伝子分析科学認定士制度審議会委員に糸賀栄先生の継続就任の依頼があり、糸賀先生に継続確認の意向を確認し返答する事となった。

3-5. 選挙管理委員会について (事務局) (資料 23)

選挙管理委員会について、評議員の中から 3, 4 名の委員を選任する事となった。

3-6. 役員選挙について (白井監事) (資料 24-25)

2021 年度役員改選の準備にあたり、白井監事より提案があり以下のことが決定した。

- ・理事会の意向は選挙日程を例年より 1 か月程度早める事とした上で、選挙管理委員会に意向を伝え日程を検討していただく。

- ・「JACLaS から理事を選任する」あるいは「連絡委員会 (仮) の立ち上げ」について JACLaS の残松理事長と話し合いをする。

3-7. 転載許諾について-POC 委員会- (石川)

資料に基づき説明があり、外部出版物からの場合は出版者・著作者ともにオリジナル・改変問わず許諾申請を行う事となった。

- 3-8. 認定 POC 特別移行措置審査結果について (康理事) (資料 28)
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。
- 3-9. 血液検査機器技術委員会委員長交代について (萱場理事長)
稲葉亨先生 (京都府立医科大学附属病院) から新保敬先生 (獨協医科大学)
への委員長交代の申請があり、審議の結果、申請通り承認された。
- 3-10. 事務局賃貸連帯保証人について (石川) (資料 29)
資料に基づき説明があり、他社も含め再度検討する事となった。
- 3-11. その他
萱場理事長より微生物検査委員会・医療情報委員会・倫理 COI 委員会が今年度で委員長交代となると報告があり、対象となる委員会は委員長選定作業を進める事となった。

4. その他

今後の理事会予定

- ・2021年2月6日(土) 13:00- 学会事務局より WEB 会議
- ・2021年4月17日(土) 春季セミナー時 (沖縄県市町村自治会館)
- ・2021年5月8日(土)

以上

2020年 月 12日

一般社団法人日本医療検査科学会

議長 萱場 宏之 

議事録署名人 白井 季明 
(出席監事)

議事録署名人 内海 健 
(出席監事)

投稿規定

投稿規定が改定されました。
令和2年1月1日以降の投稿に適用します。

(令和元年10月5日改定)

1. 医療検査と自動化（日本医療検査学会誌）に投稿される論文は、臨床検査に関する新知見（自動化に限定せず機器・試薬の検討でも可）のあるもので、他誌に発表されていないものとする。すでにその内容の一部を学会などで発表したものは、その旨を論文末尾に記載する。
2. 投稿者（連名者も含む）は本学会の会員に限る。連名者は臨時会員（論文投稿用）でも可とする。
3. 投稿論文の種類は、原著、技術、症例、短報とする。
機器・試薬の検討は技術へ投稿されたい。原著は、技術の開発・改良、臨床的評価など一歩進めたオリジナリティーのあるもの、または、他の機器・試薬との比較検討を詳細に行い、臨床検査の進歩に寄与するものとする。症例は検査値が臨床的または技術的に興味ある報告とする。
4. 投稿にあたっては、本誌の原稿作成要領に従う。論文投稿に際しては、（一社）日本医療検査学会「医学研究の利益相反（COI）に関する指針に従って、筆頭著者およびCorresponding author（連絡責任者）は「医療検査と自動化 COI申告書」（様式2-Aまたは様式2-B）を提出しなければならない。また、指定の著者チェックリストを添付する。規定に沿わない場合は、返却あるいは訂正を求めることがある。
5. 投稿論文は、いずれも編集委員会の審査により論文の種類（原著、技術など）および採否を決定する。
6. 投稿論文の著作権は日本医療検査学会に帰属するものとする。
7. Corresponding author（連絡責任者）を表紙に明記する。Corresponding authorは論文の審査過程に関わる連絡担当者となるほか、当該論文の責任を負う。
8. 研究倫理に関して：ヒトを対象とした臨床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）
 - 2) 著者名（和文および英文）
 - 3) 所属機関名とその住所（和文および英文）
 - 4) 原著、技術、症例、短報いずれを希望かを明記（英文の例：Koki MOTEGI）
2. 原著原稿は次の順序に配列することが望ましい。
 - (1)表紙（1. 参照）(2)本文（i 参照）、(3)表、(4)図（写真など）とその説明
 - i. 本文は、要旨（英文で200語以内）、キーワード（英文で5項目以内）。はじめに、材料および方法（測定機器、測定原理など）、成績、考察、結論、文献の順序に記載する。
 - ii. 文献は必要最低限にし、引用順に番号をつけ、本文最後に一括して記載する。本文中の引用箇所には肩付きで、右片括弧に入れて記載する。文献の記載法を別表1に示す。
3. 技術原稿もこれに準ずる、但し英文要旨に替えて和文要旨を要する。
4. 原著の規定頁数は原則として1編につき刷り上がり8頁以内、技術および症例は6頁以内とする（1頁分は1600字に相当する）。
図と表は、あわせて10枚以内とする（図表は1枚、400字に相当する）。
短報は刷り上がり2頁以内、図と表はあわせて3枚以内とする。

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

上記の規定頁数を超過した場合はその分の実費を徴収する。

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

〒113-0033 東京都文京区本郷2-31-2 (笠井ビル)

「医療検査と自動化」編集委員会宛

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

別表1 引用文献

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

(雑誌)

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

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

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

(単行本)

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

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

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

別表2 度量衡の単位

a) 接頭語には次のものを用いる。

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

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

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

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

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

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

追記

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

「医療検査と自動化」論文投稿時の著者チェックリスト

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

著者名	会員番号 または臨時会員

著者名	会員番号 または臨時会員

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

様式 2-A (論文投稿用)

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

著者名: _____

(共著者を含む)

論文題名: _____

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

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

(本 COI 申告書は論文掲載後 2 年間保管されます)

(申告日) 年 月 日

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

(何れかに○)

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

様式 2-B (論文投稿用)

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

著者名 : _____

(共著者を含む)

論文題名 : _____

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

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

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

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
シーメンズヘルスケア・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
(株)日立ハイテック	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

賛助会員

アイ・エル・ジャパン(株)	108-0073	東京都港区三田1-3-30 三田神田ビル
(株)アイディエス	150-0011	東京都渋谷区東2-22-14 ロゼ氷川 4F
アボットジャパン(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2-6 横浜プラザビル
栄研化学(株)	110-8408	東京都台東区台東4-19-9 山口ビル7
(株)エクセル・クリエイツ	542-0081	大阪府大阪市中央区南船場1-16-13 堺筋ベストビル 5F
(株)LSIメディエンス	101-8571	東京都千代田区内神田1-13-4 THE KAITTEKI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	212-0015	神奈川県川崎市幸区柳町70-1
極東製薬工業(株)	103-0024	東京都中央区日本橋小舟町7-8
合同酒精(株)酵素医薬品研究所	271-0064	千葉県松戸市上本郷字仲原250
(株)シノテスト	101-8410	東京都千代田区神田駿河台3-7-9
(株)CGI	106-0041	東京都港区麻布台1-7-3 神谷町スクエアビル 8F
積水メディカル(株)	103-0027	東京都中央区日本橋2-1-3
セラビシオン・ジャパン(株)	220-0004	神奈川県横浜市西区北幸1-11-5 相鉄KSビル 9F
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
ニッポー・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
ピオメリュー・ジャパン(株)	107-0052	東京都港区赤坂2-17-7 赤坂溜池タワー 2F
日立化成ダイアグノスティックス・システムズ(株)	104-6004	東京都中央区晴海1-8-10
(株)日立製作所	110-0015	東京都台東区東上野2-16-1 上野イーストタワー 8F
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
富士レピオ(株)	163-0410	東京都新宿区西新宿2-1-1 新宿三井ビル
古野電気(株)	662-0934	兵庫県西宮市西宮浜2-20
平和物産(株)	550-0012	大阪府大阪市西区立売堀1-3-13
ベックマン・コールター(株)	135-0063	東京都江東区有明3-5-7 TOC 有明ウエストタワー 13F
(株)ベリタス	105-0013	東京都港区浜松町1-10-14 住友東新橋ビル3号館 5F
(株)ヘレナ研究所	330-0061	埼玉県さいたま市浦和区常盤9-21-19
(株)堀場製作所	601-8510	京都府京都市南区吉祥院宮の東町2
(株)ミズホメディール	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

(令和2年12月10日現在)

編集後記

令和2年は新型コロナウイルスに翻弄された、まさに、長期にわたる大災害の年でした。院内外を問わず検査に携わる医療者にとっては新型コロナウイルス検査により多忙を極めたのみならず、検査の重要性を再認識できたのではないかと考えます。このようなコロナ禍にもかかわらず多くの貴重な論文が投稿されてきたことに感謝するとともに、多忙中でも研究の意欲を維持されてきた著者の方々に敬意を表するものです。

投稿していただいた論文を眺めると、「医療検査と自動化」誌の根幹をなす機器や試薬の評価に加え、IFCC法対応試薬の性能評価に関する論文が目を引きました。IFCC法対応試薬とJSCC標準化対応法試薬との比較は、検査結果の継続性という意味からも大変重要であると考えます。今後も、性能評価、そして、その性能評価の評価についての論文投稿をお待ちしております。また、掲載に関するお知らせですが、多くの医学雑誌の掲載方法に則り、第46巻1号より論文の掲載を受諾日の順

番としました。

第46巻1号の編集後記執筆時には、北海道と東京、そして、それに引き続いて多くの地域での感染拡大、病院や福祉施設での集団感染などにより、医療機関の有症状患者受け入れと重症患者への対応において、医療従事者の方の必死の貢献が続けられています。第46巻1号発刊時にはなんとか落ち着きを見せて欲しいものと願いつつ、この長く続くコロナ禍への検査側からの貢献を引き続き継続していく強い気持ちを持っていきたいところです。

読者の皆さまにおかれましては、普段はあまり気にされないかもしれない健康について、このような機会に、何卒ご自愛いただきたいと切に願います。最後になりましたが、感染されて療養が続けられている方々の回復をお祈り申し上げます。また、感染により亡くなられた方々の冥福をお祈り申し上げます。

〔「医療検査と自動化」編集委員長 高橋 聡〕

「医療検査と自動化」編集委員会

編集委員長 高橋 聡

副編集委員長 石井潤一

編集幹事 村上正巳、盛田俊介、横田浩充

編集委員 阿部正樹、池田勝義、石井良和、磯部和正、渭原 博、氏家真二、大久保滋夫、岡野芳幸、長田 誠、萱場広之、栢森裕三、康 東天、澤部祐司、静 怜子、澁谷和俊、メ谷直人、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46巻 第1号（通巻第254号） 2021年2月1日発行

発行 一般社団法人 日本医療検査科学会

制作 「医療検査と自動化」編集委員会

発行人 萱場広之

〒113-0033 東京都文京区本郷2-31-2

事務所 〒113-0033 東京都文京区本郷4-2-5

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

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

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

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

送付先変更等の手続きのご案内

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