

# 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38回春季セミナー公告 (第2報)

第56回大会公告 (第2報)

総説: 自己免疫性後天性凝固因子欠乏症 ..... 橋口 照人

2024年度学会予定

第38回春季セミナー/4月14日(日)

例会長・大川龍之介 於：金沢市文化ホール

第56回大会/10月4日(金)、5日(土)、6日(日)

大会長・橋口照人 於：パシフィコ横浜 会議センター



一般社団法人

日本医療検査科学会

The Japan Association for Clinical Laboratory Science

2024

VOL.49

通巻第274号

1

## いずれ、をいま、に。

人々が安心してすごせる健康社会の実現。  
それは、永遠につづく旅路にも似て、  
長く、果てしない道のりでしょう。

しかしそのゴールを「いずれ」と夢見るのではなく、  
「いま」踏み出す一歩の先にあることを信じて  
私たち日立ハイテックは、  
今この瞬間にできることを、  
次の一歩を、  
ためらうことなく踏み出していきます。



日立自動分析装置  
LABOSPECT 008  $\alpha$



製造販売届出番号:08B2X10005000041  
本写真は2モジュール構成です。

日立自動分析装置  
LABOSPECT 006



製造販売届出番号:08B2X10005000038

日立自動分析装置  
LABOSPECT 003



製造販売届出番号:08B2X10005001007

日立検体検査自動化システム  
LABOSPECT TS



日立自動分析装置  
3500



製造販売届出番号:  
08B2X10005000042

日立自動分析装置  
3100



製造販売届出番号:  
08B2X10005000040

全自動PCR検査システム  
エリート インジニアス



製造販売届出番号:  
12B3X00033000003  
製造販売元:プレジジョン・システム・サイエンス(株)  
本製品はELITech社の製品です。

全自動PCR検査システム  
ジーンリード エイト



製造販売届出番号:  
12B3X00033000006  
製造販売元:  
プレジジョン・システム・サイエンス(株)



## <年頭のご挨拶>

一般社団法人日本医療検査科学会  
理事長 高橋 聡

新年あけましておめでとうございます。

昨年も日本医療検査科学会へ多大なるご支援とご高配を賜りまして、改めて心から御礼を申し上げます。

新型コロナウイルス感染症の世界的流行が始まってから早4年が経ちました。新型コロナウイルス感染症への対応を学んだ我々は、この感染症をもはや恐れることなく、昨年の第55回大会ではコロナ禍以前と同様の対面開催により多くの皆さまに参加していただきました。本年は、これまでの学びから、恐れず、侮らず、コロナ禍後の日常を取り戻す時、そして、さらに発展するための第一歩かと考えています。

さて、本年4月14日(日)には、東京医科歯科大学の大川龍之介例会長のもと、第38回春季セミナーが金沢にて開催されます。テーマは、「臨床検査のオープンイノベーション」とし、産学連携と国際化を大きな柱として企画を準備していただいています。そして、10月4日(金)～6日(日)には、鹿児島大学の橋口照人大会長のもと、第56回大会が横浜で開催されます。テーマは、「Knowledge, Heart and Humanity ～知と愛と人と～」とし、サブテーマとして、「地域医療」「超高齢社会」「医療DX」「国際化」など、まさに、近年の医療トレンドをしっかりと捉えた企画が準備されています。大川例会長、そして、橋口大会長、共に本学会が進むべき方向性を的確に捉えてくださり、迷うことなく目標に向かって前進するべく後押しをしてくださっています。

日本医療検査科学会は、多くの課題を着実に乗り越え、本学会の眼前の目標である産学連携と国際化を進めます。本学会は更なる活性化と発展を達成します。私どもはこのような目標に向かって学会の舵取りをして参りますので、皆さまのご理解とご支援を引き続き賜りますよう何卒よろしくお願ひ申し上げます。

皆さま、そして、ご家族のご健勝とご多幸をお祈り申し上げ、新年の挨拶とさせていただきます。

日本医療検査科学会

## 第38回春季セミナー公告(第2報)

会 期：2024年4月14日(日)

テ ー マ：「臨床検査のオープンイノベーション」

例 会 長：大川 龍之介

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 臨床分析・分子生物学分野

副例会長：大江 宏康 金沢大学附属病院 検査部

会 場：金沢市文化ホール(ホール他)

〒920-0864 石川県金沢市高岡町15-1

TEL：076-223-1221 FAX：076-223-1299

参 加 費：2,000円

各種委員会：2024年4月13日(土) 11:00～18:30(予定)

会 場：金沢市文化ホール(第2会議室・第5会議室・第6会議室)

理事会、プログラム委員会、委員長会議、編集委員会、科学技術委員会、  
POC技術委員会、遺伝子・プロテオミクス委員会、血液検査機器技術委員会、  
微生物検査・感染症委員会、医療情報委員会、生理検査委員会、国際交流委員会、  
一般検査委員会、認定POCCWG、遺伝子・プロテオミクス技術委員会WG等

懇 親 会：2024年4月13日(土) 18:30～20:30(予定\*)

会 場：金沢ニューグランドホテル

〒920-8688 石川県金沢市南町4-1 TEL：076-233-1311 FAX：076-233-1591

懇親会費：3,000円



\* 本会ホームページより、2024年2月1日(木)から事前参加登録を開始いたします。

多くのみなさまのご参加をお待ちしております。

### ————プログラム概要————

開会の挨拶 8:50～9:00

理事長：高橋 聡(札幌医科大学 医学部感染制御・臨床検査医学講座)

例会長：大川 龍之介(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 臨床分析・分子生物学分野)

【シンポジウムI】 9:00～10:40

「国際活動で拓く臨床検査」

座長：勝田 仁(九州大学大学院 医学研究院 保健学部門 検査技術科学分野)

萩原 三千男(株式会社エスアールエル 人財育成本部)

演者：中川 央充(慶應義塾大学病院 臨床検査技術室 臨床検査科)

松尾 英将(京都大学大学院 医学研究科 人間健康科学系専攻総合医療科学コース  
臨床系医療科学講座)

森 大輔(九州大学病院 検査部)

齋藤 良一(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 微生物・感染免疫解析学分野)

**【教育講演】 10:50～11:35**

座長：大江 宏康(金沢大学附属病院 検査部)

「金沢大学発 ベンチャーキャピタル ヴィジョンインキュベートと未来知実証センター」

講師：松本 邦夫(金沢大学 がん進展制御研究所)

共催：アボットジャパン合同会社

**【機器・試薬セミナーⅠ】 11:40～12:10**

司会：石山 雅大(弘前大学医学部附属病院 検査部)

- 大塚電子株式会社
- シスメックス株式会社
- アボットジャパン合同会社
- 株式会社日立ハイテク

**【ランチョンセミナー】 12:20～13:10**

座長：大川 龍之介(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 臨床分析・分子生物学分野)

演者：菅原 義紀(地方独立行政法人宮城県立病院機構 宮城県立がんセンター 薬剤部/感染対策室)

原崎 頼子(地方独立行政法人宮城県立病院機構 宮城県立がんセンター 血液内科)

共催：株式会社日立ハイテク

**【機器・試薬セミナーⅡ】 13:30～14:00**

司会：岡田 光貴(京都橋大学 健康科学部 臨床検査学科)

- 栄研化学株式会社
- 富士フイルム和光純薬株式会社
- 株式会社テクノメディカ

**【特別講演】 14:05～14:50**

座長：大川 龍之介(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 臨床分析・分子生物学分野)

「大学病院検査部における体外診断用医薬品の開発：生理活性脂質の臨床検査医学の構築」

講師：矢富 裕(国際医療福祉大学 大学院)

共催：東ソー株式会社

**【シンポジウムⅡ】 15:00～16:40**

「産学連携で拓く臨床検査」

座長：吉川 直之(東京大学医学部附属病院 検査部)

太田 徳仁(PHC 株式会社 診断薬事業部 LPIA ビジネス開発室)

演者：武村 和哉(大阪公立大学医学部附属病院 中央臨床検査部)

宮本 博康(東京慈恵会医科大学附属病院 中央検査部)

徳原 康哲(香川県立保健医療大学 臨床検査学科)

笹野 哲郎(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 循環制御内科学分野)

閉会の挨拶 16:40～16:40～

今期大会長：橋口 照人(鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 血管代謝病態解析学分野)

次期例会長：石山 雅大(弘前大学医学部附属病院 検査部)

例 会 長：大川 龍之介(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 臨床分析・分子生物学分野)

\*本セミナー受講後は、日本臨床衛生検査技師会会員 生涯教育制度の点数が付与されます。

事 務 局：日本医療検査科学会

主催事務局：東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 臨床分析・分子生物学分野

〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45 3号館16階

TEL：03-5803-5374

運営事務局：株式会社メッド

〒108-6028 東京都港区港南2-15-1 品川インターシティ A棟28階

TEL：03-6717-2790 FAX：086-463-5345 (本社)

E-mail：jcls-spring38@med-gakkai.org

日本医療検査科学会  
第56回大会 大会公告(第2報)

大会テーマ：「Knowledge, Heart and Humanity ～知と愛と人と～」

会 期：2024年10月4日(金)～6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：橋口照人(鹿児島大学病院 検査部長)

副大会長：山口宗一(鹿児島大学病院 副検査部長)

大会事務局長：波野史典(鹿児島大学病院検査部 臨床検査技師長)

TEL：099-275-7141

E-mail：jcls56th@gmail.com

演題募集期間：2024年4月1日(月)～4月30日(火)



————— プログラム大綱 —————

<企画中>

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



# AIA-パックCL<sup>®</sup> 試薬

エストラジオールキット

体外診断用医薬品

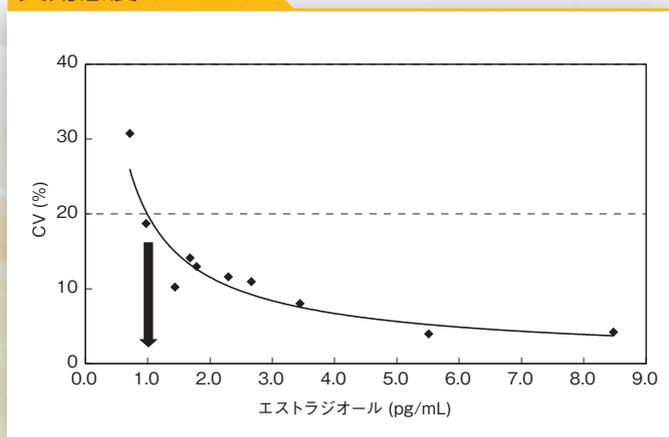
製造販売届出番号:13E1X80174002024

## AIA-パックCL<sup>®</sup> hs-E2

### 特長

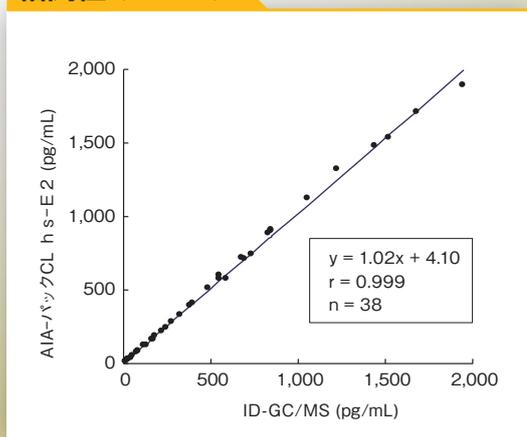
- \* 迅速測定(結果報告は約15分)
- \* 2ステップサンドイッチ法を採用することで、高感度化を達成
- \* 測定範囲は 2.0~2,000 pg/mL
- \* 凍結乾燥試薬のため安定、マスターカーブ較正は90日間有効
- \* モノテスト方式のためオーダー数の変化にフレキシブルに対応
- \* AIA<sup>®</sup>-CLシリーズの各機種で共通に使用可能

### 実効感度 (当社データ)



Precision Profile法にて実効感度を求めたところ、CV 20%となる濃度が1.0 pg/mLであった。

### 相関性 (当社データ)



東ソー株式会社  
バイオサイエンス事業部

東京本社 ☎(03)5427-5181

名古屋支店 ☎(052)211-5730

仙台支店 ☎(022)266-2341

カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384

ホームページ <https://www.diagnostics.jp.tosohbioscience.com/>

大阪支店 ☎(06)6209-1948

福岡支店 ☎(092)710-6694

## 目次

### 学会ニュース

#### 総説

自己免疫性後天性凝固因子欠乏症 ..... 橋口 照人... (4)

#### 原著

非アルコール性脂肪性肝疾患におけるオートタキシンの肝線維化進行度評価と

高度肥満が与える影響 ..... 西能 史華... (8)

尿蛋白試験紙の測定操作および判定に関するリスク解析 ..... 豊島 寛大... (17)

COVID-19 感染症重症化における各種炎症性マーカーの比較検討 ..... 角野 忠昭... (24)

#### 技術

質量分析装置 Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry の

細菌同定における外部精度管理調査報告 ..... 曾川 一幸... (29)

2ステップサンドイッチ法による高感度エストラジオール測定試薬の

基礎的検討 ..... 八木 道隆... (35)

プログラニューリン (PGRN) の測定方法の確立と臨床的意義

—RA 患者における TNF 関連生物学的製剤治療による変化— ..... 藤垣 英嗣... (41)

MMP-3 測定用改良試薬「マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 キット

LZ テスト「栄研 MMP-3」の基礎的検討 ..... 豊田 咲希... (48)

#### 短報

ICU 患者血清検体での血餅浮遊 (泡嚙みフィブリン) に関する検討 ..... 金山 幸貴... (54)

理事会議事録 ..... (57)

## CONTENTS

### JCLS News

#### Review

Autoimmune acquired coagulation factor deficiency..... Teruto HASHIGUCHI···(4)

#### Originals

- Autotaxin evaluation of liver fibrosis progression in patients  
with nonalcoholic fatty liver disease..... Fumika SAINO···(8)
- A risk assessment for urine test strip in urinalysis..... Norihiro TOYOSHIMA···(17)
- Comparative study of various inflammatory markers in the severity  
of COVID-19..... Tadaaki KADONO···(24)

#### Reports

- External quality control survey report in identification of Microorganism  
from Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass  
spectrometry..... Kazuyuki SOGAWA···(29)
- Fundamental study of high sensitivity estradiol measurement reagent  
by two-step sandwich method..... Michitaka YAGI···(35)
- Establishment and clinical significance of progranulin (PGRN) measurement.  
– Changes by TNF-related biologic agent infliximab treatment  
in RA patients. –..... Hidestugu FUJIGAKI···(41)
- Validation of improved MMP-3 measurement reagent  
“Matrix Metalloproteinase-3 kit LZ test ‘EIKEN’ MMP-3”..... Saki TOYOTA···(48)

#### Short Communications

- Investigation of floating clots in the serum samples  
of the intensive care unit..... Kouki KANEYAMA···(54)

Boad Meeting Minutes..... (57)

# 自己免疫性後天性凝固因子欠乏症

## Autoimmune acquired coagulation factor deficiency

橋口照人

**要約** 後天性凝固因子欠乏症にはインヒビターの出現により止血反応が阻害される自己免疫性凝固因子欠乏症 (AiCFD) とインヒビターの出現の無い非自己免疫性凝固因子欠乏症 (nAiCFD) がある<sup>1)</sup>。AiCFD と nAiCFD の比較において圧倒的に nAiCFD が多いが原因不明の出血症状を認めた際には AiCFD を常に念頭におくべきであり適格な鑑別診断が必須である。クロスミキシングテスト (CMT) はインヒビターを含む凝固反応阻害因子の有無のスクリーニングに有用であり、その鑑別の第一選択となる。しかしながら、第 XIII 因子欠乏症、一部のフィブリノゲン欠乏症、vWF 欠乏症、更に線溶系の異常である  $\alpha$ 2-PI, PAI-1, TAFI 欠乏症においては PT, APTT の異常に反映されない。CMT の曲線は明らかに下に凸の場合は凝固反応阻害因子の存在しない欠乏パターン (先天性あるいは消費による凝固因子欠乏症等) とみなされるが、欠乏パターンであっても凝固因子活性を阻害することなく凝固因子に結合してそのクリアランスを亢進させる抗体の場合は下に凸の曲線を描く。AiCFD の診断の際は活性/抗原量比、インヒビターの証明に努めるとともに慎重に nAiCFD の可能性を除外すべきである。肝機能低下、大動脈瘤による慢性的な凝固線溶系の亢進による凝固因子の消費、AL アミロイドーシスによる第 X 因子の低下、体外循環による VWF の消費 (後天性 VWD) はその例である。インヒビターの簡易検出法の開発はこれからの重要課題である。

### 1. はじめに

自己免疫性後天性凝固因子欠乏症における出血症状の出現を理解する考え方として、血管壁は「ずり応力」や血管壁に垂直にかかる「壁圧」といった物理的的刺激により、常に傷つき修復されていると考えるべきである。「血小板-凝固-線溶系」の生体システムは外傷などによる血管の破綻時 (出血時) のみに作動するのではなく、低次元のレベルで平常時においても常に作動して血管を修復している。従って、凝固因子に対する自己抗体による凝固機能の破綻は打撲、外傷等の有無に関わらず出血をきたすこととなる。

### 2. 指定難病 288

自己免疫性後天性凝固因子欠乏症 (AiCFD) は

Teruto HASHIGUCHI  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 血管代謝病態解析学分野  
〒890-8544 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1  
TEL : 099-275-5435  
E-mail : k1581347@kadai.jp

理論的にはどの凝固因子にも起こり得るが現在、指定難病に登録されている AiCFD<sup>2)</sup> は、凝固第 XIII 因子欠乏症、第 VIII 因子欠乏症 (後天性血友病 A)、VWF 欠乏症、第 V 因子欠乏症、第 X 因子欠乏症である。令和 3 年度において医療受給者証保持者数は 414 人である<sup>3)</sup>。疾患背景として (1) 過去 1 年以内に発症した出血症状がある (2) 家族歴がない (3) 出血症状の既往がない (特に外傷、手術、抜歯、分娩など) (4) 抗凝固薬や抗血小板薬などの過剰投与がないことが重要であり、出血時間、PT、APTT、血小板数の一般検査所見を Fig. 1 に示す。

### 3. インヒビター (抑制物質)

狭義には凝固因子に対してその因子活性の低下を直接的に引き起こす獲得性抗体であり、凝固因子欠乏患者への補充療法の結果として出現する同種抗体をタイプ I インヒビター、健常者あるいは種々の基礎疾患に伴い自然発生する凝固因子に対する自己抗体をタイプ II インヒビターと呼ぶ。また、凝固因子と複合体を形成してクリアランスを亢進させる抗体があることは重要である。広義には免疫グロブリンの存在なしに凝固因子の組織への過剰な吸着により因子量が低下、あるいはそれによるクリアランス

の亢進の結果として活性低下を示すものも(広義の)インヒビターと称することがある。

後天性血友病ではしばしばタイプ II インヒビターを生じる。タイプ I インヒビターでは、抗体濃度の上昇とともに残存第 VIII 因子活性は直線的に減衰し完全に失活するため、インヒビター存在時の第 VIII 因子活性は通常 1% 未満である。一方、タイプ II インヒビターでは、抗体濃度の上昇による残存第 VIII 活性の減衰は比較的緩やかでインヒビターが存在するにもかかわらず第 VIII 因子活性が検出される。

#### 4. 疾患像<sup>4-9)</sup>

指定難病に登録されている AiCFD の、好発年齢、男女比、出血部位、予後のまとめを Fig. 2 に示す。特記すべきは、出血症状は多彩であり、かつ重篤な

ものが多く、出血部位によっては致死的となる。また、第 VIII 因子欠乏症(後天性血友病)においては免疫抑制療法中の感染死が多いことも重要である。出血症状が出現した際に速やかに的確に診断することが極めて重要である。

AiCFD における凝固因子の活性と抗原量の考え方について述べる。各凝固因子の活性は必ず低下し、抗原量は通常は低下すると考えて良い。第 XIII 因子は 2 つの酵素活性をもつ A サブユニットと 2 つの酵素活性をもたない B サブユニットからなる 4 量体であるため、自己抗体のタイプ・性状によって A サブユニット、B サブユニットの抗原量は異なってくる。通常は活性/抗原量比は著しく低下するが、第 XIII 因子欠乏症における活性/A サブユニット抗原量は抗 FXIII-B サブユニット自己抗体が原因の症例では正常となる。

### 疾患背景

- (1) 過去 1 年以内に発症した出血症状がある。
- (2) 家族歴がない。
- (3) 出血症状の既往がない(特に外傷、手術、抜歯、分娩など)。
- (4) 抗凝固薬や抗血小板薬などの過剰投与がない。

一般検査所見					
	第 XIII 因子	第 VIII 因子	VWF	第 V 因子	第 X 因子
出血時間	正常	正常	正常~延長	正常	正常
PT	正常	正常	正常	延長	延長
APTT	正常	延長	正常~延長	延長	延長
血小板数	正常	正常	減少・正常・増加	正常	正常

Fig. 1 自己免疫性後天性凝固因子欠乏症

好発年齢・男女比・出血部位・予後					
	第 XIII 因子	第 VIII 因子	VWF	第 V 因子	第 X 因子
好発年齢	高齢者	高齢者と分娩後女性	中央値 50 歳代	高齢者	小児・若年者にも発症
男女比	男性に多い傾向	1:0.9	1:1	2.6:1	3:1
出血部位	筋肉・皮下出血など	広範な皮下出血 筋肉内出血	極めて多彩	尿路出血・消化管出血など極めて多彩	粘膜・皮下出血・血尿・下血など
	重篤なものが多い	重篤なものが多い	軽症~致死的	軽症~致死的	症例数が少なく不明
予後		免疫抑制療法中の感染死が多い		検査値のみの異常もあり得る	
	頭蓋内・胸腔内・腹腔内・後腹膜出血などは致命的となりうる				
インヒビターの再燃はあり得る					

Fig. 2 自己免疫性後天性凝固因子欠乏症

5. 診断

クロスミキシングテスト (CMT) はスクリーニングに有用であるが、明らかに欠乏パターンでなければインヒビターの存在を疑うべきである。しかしながら、欠乏パターンであっても凝固因子活性を阻害することなく凝固因子に結合してそのクリアランスを亢進させる抗体の場合は下に凸の曲線を描く。CMTに用いる検査は第XIII因子欠乏症では、アンモニア放出法 (外部委託にて検査可能) あるいはアミン取り込み法を用いる。2時間インキュベーション後のアンモニア放出法によるクロスミキシングテストでは異種4量体に結合するType Aaインヒビターは鋭敏に検出できるが、活性化FXIII (FXIIIa) に結合するType Abインヒビターは検出できない。第V, X因子欠乏症ではPTあるいはAPTTを用い

る。また、VWF欠乏症においては、VWFと血小板膜上のGPIbとの相互作用を阻害するインヒビターが存在すれば、VWF:Rco (リストセチンコファクター活性, 外部委託にて検査可能) あるいはRistocetin-induced platelet agglutination (RIPA) アッセイによる交差混合試験が有用である (Fig. 3)。

第V, X因子欠乏症においてはベセスダ法による凝固抑制因子の検出が可能である。イムノブロット法, ELISA法, イムノクロマト法による自己抗体の検出は研究室での検出であり通常の臨床現場では用いられていない。

6. 鑑別診断

AiCFDの診断における鑑別診断は重要である (Fig. 4)。自己抗体を良好な感度・特異度をもって検出できる検査法が未だ存在しないため、

確定診断のための検査					
	第XIII因子	第VIII因子	VWF	第V因子	第X因子
交差混合試験	アンモニア放出法 アミン取り込み法	APTT	VWFとGPIbとの相互作用を阻害するインヒビターが存在すれば、VWF:Rco あるいは Ristocetin-induced platelet agglutination (RIPA) アッセイ	PT および APTT	PT および APTT
	明らかに欠乏型パターンでなければ疑う (注)			明らかに欠乏型パターンでなければ疑う (注)	
凝固抑制因子の検出	—	ベセスダ法	—	ベセスダ法	
自己抗体の検出	イムノブロット法、ELISA法、イムノクロマト法など				

(注) 非阻害性抗体は、免疫複合体の血中からのクリアランスを亢進して交差混合試験では「欠乏型」を示し欠乏症の原因となりうる。

Fig. 3 自己免疫性後天性凝固因子欠乏症

第XIII因子	第VIII因子	VWF	第V因子	第X因子
<b>遺伝性</b>				
FXIII欠乏症	血友病A FV・FVIII複合欠乏症 VWD	VWD	FV欠乏症 FV・FVIII複合欠乏症	FX欠乏症
<b>後天性 (非自己免疫性)</b>				
重症肝疾患	後天性VWD	心血管疾患	フィブリン糊 (ウシFV)	AL-アミロイドーシス
IgA血管炎		甲状腺機能低下症		
慢性炎症性腸疾患		リンパ・骨髄増殖性疾患		
大動脈瘤		バルプロ酸の内服 ウィルムス腫瘍 Hydroxyethyl starch (人工膠質液) の投与		
手術・外傷・悪性腫瘍・感染症・薬剤性・DICなど				

Fig. 4 各因子の低下をきたしうる背景疾患 (非自己免疫性)

AiCFDではないにも関わらず、副腎皮質ステロイドが投与される例も希ではないと思われる。

### 7. 治療<sup>10)</sup>

治療の基本は、基礎疾患が存在する場合は基礎疾患の治療に加えて、止血療法と免疫抑制療法を行い、出血症状の臨床的寛解、機能的寛解、免疫学寛解を目標とする (Fig. 5)。指定難病に登録されているAiCFDの基本的な治療法を Fig. 6 に示す (保険収載されていない治療法も含まれる)。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

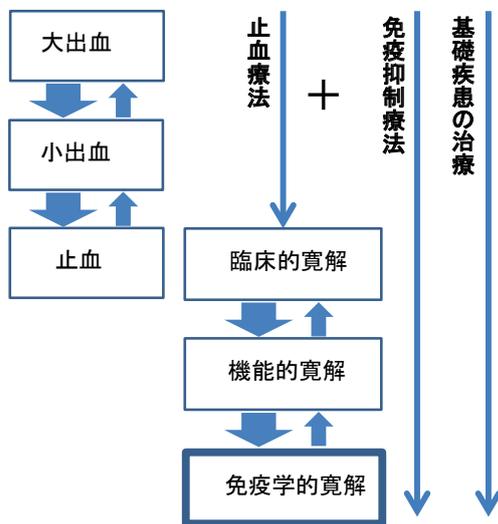


Fig. 5 治療の考え方

### 文献

- 1) 一瀬白帝：自己免疫性後天性凝固因子欠乏症—診療の最前線— 臨床血液 60(2019):6
- 2) 自己免疫性後天性凝固因子欠乏症 (指定難病288) – 難病情報センター (nanbyou.or.jp)
- 3) 統計で見る日本\_ [https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&stat\\_infid=000040002898](https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&stat_infid=000040002898)
- 4) 惣宇利正善：自己免疫性後天性凝固第XIII(13)因子欠乏症 臨床化学51(2022):281
- 5) 小川孔幸, 酒井道生：後天性血友病A 臨床化学51(2022):287
- 6) 和田英夫, 玉木茂久：自己免疫性後天性凝固第V/5因子(FV/5)欠乏症(いわゆるFV/5インヒビター) 臨床化学51(2022):295
- 7) 家子正裕：自己免疫性凝固第II因子欠乏症および自己免疫性凝固第V因子欠乏症とループスアンチコアグラント：Lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndromeを中心に 臨床化学51(2022):300
- 8) 荒幡昌久, 朝倉英策：自己免疫性後天性凝固第X(10)因子欠乏症 臨床化学51(2022):305
- 9) 山口宗一, 田上聖徳, 東貞行, 藤崎知園子, 橋口照人：自己免疫性後天性フォン・ヴィルブラント病 臨床化学51(2022):311
- 10) 一瀬白帝：我が国における自己免疫性凝固因子欠乏症の実態と診療ガイド 血栓止血誌 29(2018):251

治療					
	第XIII因子	第VIII因子	VWF	第V因子	第X因子
<b>A</b>	<b>止血療法</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・FXIII 濃縮製剤</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・rFVIIa</li> <li>・aPCC</li> <li>・FVIIa/FX (バイパス止血療法)</li> <li>・エミスマブ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・DDAVP</li> <li>・VWF 含有凝固 FVIII 濃縮製剤</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・新鮮凍結血漿</li> <li>・濃厚血小板 (FV を顆粒中に含む)</li> </ul>
<b>B</b>	<b>抗体根絶・除去療法</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a 副腎皮質ステロイド薬</li> <li>サイクロフォスファミド (保険適応がない)</li> <li>b 治療抵抗性の症例にはリツキシマブ、サイクロスポリンA、アザチオプリンなどの投与も考慮 (保険適応はない)</li> <li>c 通常、高用量イムノグロブリン静注 (IVIg) は推奨されていない</li> <li>ただし、自己免疫性後天性VWF欠乏症では、VWFを正常レベルに数日間回復させることがある</li> <li>d 止血治療に難渋する場合は、抗体を一時的に除去するために血漿交換、免疫吸着療法も考慮</li> </ul>			

Fig. 6 自己免疫性後天性凝固因子欠乏症

## 非アルコール性脂肪性肝疾患におけるオートタキシンの肝線維化進行度評価と高度肥満が与える影響

Autotaxin evaluation of liver fibrosis progression in patients with nonalcoholic fatty liver disease

西能史華<sup>1)</sup>, 中野恵一<sup>1)</sup>, 岩井孝仁<sup>1)</sup>, 西田睦<sup>2)</sup>, 吉川仁人<sup>3)</sup>, 安田慶子<sup>1)</sup>, 渡邊千秋<sup>1)</sup>

### Abstract

#### Objectives:

Autotaxin (ATX) analysis is a non-invasive method for assessing liver fibrosis progression. However, studies exploring its usefulness among patients with obesity are scarce. Here, we aimed to prospectively assess how obesity impacts ATX concentration in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

#### Methods:

ATX concentration was measured using a one-step sandwich enzyme immunoassay. Magnetic resonance elastography (MRE) was performed on Discovery MR 750W 3.0T, using a sample of the elastic modulus from the right lobe of the liver.

#### Results and Discussion:

Seventy-four patients with NAFLD were evaluated. The correlation coefficient between the results obtained with ATX analysis and MRE was statistically significant in the  $25 \leq \text{BMI} < 35 \text{ kg/m}^2$  group ( $\rho = 0.652$  and  $0.547$  for men and women, respectively) but not significant for either sex in the  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$  group. The area under the receiver operating characteristic curve for the diagnosis of  $\geq$  stage 2 fibrosis via ATX concentration in men and women were  $0.820$  and  $0.697$  in the  $25 \leq \text{BMI} < 35 \text{ kg/m}^2$  group, respectively, and  $0.583$  in the  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$  group of men.

#### Conclusion:

The diagnostic accuracy of ATX-based evaluation of liver fibrosis is less reliable in patients with severe obesity for men.

### Key words

Autotaxin (ATX), serum biomarker, Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), liver fibrosis

Received Mar. 27, 2023; Accepted Jul. 31, 2023  
Fumika SAINO<sup>1)</sup>, Keiichi NAKANO<sup>1)</sup>, Takahito IWAI<sup>1)</sup>, Mutsumi NISHIDA<sup>2)</sup>, Masato YOSHIKAWA<sup>3)</sup>, Keiko YASUDA<sup>1)</sup>, Chiaki WATANABE<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 北海道大学病院 検査・輸血部

<sup>2)</sup> 北海道大学病院 企画マネジメント部

<sup>3)</sup> 北海道大学病院 放射線診断科  
〒060-8648 北海道札幌市北区北14条西5丁目  
Corresponding author: 中野恵一  
TEL: 011-706-5712 FAX: 011-706-7614  
E-mail: nakakeiichi12@gmail.com

## 1. はじめに

肝生検は肝線維化進行度の評価法として、ゴールドスタンダードとされてきたが、侵襲的な検査であり、繰り返し行うことが困難である。また、肝生検によって得られたわずかな組織のみで肝全体を評価することは難しく、サンプリングエラーの問題がある<sup>1,2)</sup>。組織標本は、肝線維化の程度を線維化なし (F0)、門脈域の線維性拡大 (F1)、線維性架橋形成 (F2)、小葉構造のひずみを伴った線維性架橋形成 (F3)、肝硬変 (F4) の5段階で評価されるが<sup>3)</sup>、病理医間で評価にばらつきがあることも指摘されている<sup>4-6)</sup>。

このような背景を踏まえ、肝生検に変わる非侵襲的な評価法として、MRエラストグラフィ (MRE) や超音波エラストグラフィなどの画像検査や種々の血清バイオマーカーによる肝線維化進行度の評価が試みられている。

MREは体外から加えた振動により生じる波が組織を伝わる様子をMRIで可視化し、その様子を解析することで弾性率を測定する。各線維化進行度を分類する診断能が良好で<sup>7)</sup>、評価者間の一致率が非常に高いことが報告されている<sup>8)</sup>。

オートタキシン (ATX) は全身の組織で産生され、リゾホスファチジルコリンを加水分解し、リゾホスファチジン酸を産生するリゾホスホリパーゼD活性を有する125 kDaの脂質分解酵素である。ATXは肝臓の類洞内皮細胞のスカベンジャーレセプターを介して取り込まれるが、肝線維化の進行に伴う代謝障害によりクリアランスが低下すると考えられている。この点に着目し、肝線維化を評価する血清バイオマーカーとしてATXの測定系が開発され、日本では2018年に保険適用された。現在までにB型およびC型ウイルス肝炎において初期の肝線維化診断への有用性が報告されているが<sup>9,10)</sup>、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) に関する報告は限定的である<sup>11)</sup>。また、血清ATX濃度は性差があり、女性が男性より高値であることが報告されている<sup>12)</sup>。一方、肥満者は、皮下脂肪のATXの発現量と血清ATX濃度が低下し、血清ATX濃度とBMIが負の相関を示すことが報告されている<sup>13)</sup>。しかし、血清ATX濃度を用いた肝線維化進行度評価について、肥満がどのような影響を与えるかについては明らかになっていない。

今回我々は、MREによる肝線維化の評価を指標として、NAFLDにおけるATXの初期の肝線維化進行度診断の有用性と肥満による影響を検討した。

## 2. 対象と方法

### 1) 対象

北海道大学病院にて2020年3月から2022年3月の間にMREを撮像し、3ヵ月以内に血液検査を施行したNAFLDを横断的観察研究にて検討した。

NAFLDの診断基準<sup>14)</sup>は、①画像もしくは組織学的に肝臓に脂肪蓄積 (肝細胞の5%以上) を認めること、②アルコール、薬剤、遺伝疾患などによる二次性脂肪肝を除外されたものとした。

対象患者の臨床情報及び検査結果は電子カルテより取得した。肥満分類は、肥満症診療ガイドライン2022にて規定されている高度肥満 (BMI  $\geq$  35 kg/m<sup>2</sup>) 群と肥満 (25  $\leq$  BMI < 35 kg/m<sup>2</sup>) 群の2群に分類した。対象患者の血清は、ATX測定まで-30°Cで凍結保管した。

本研究は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得て行った (承認番号: 自019-0290)。対象患者には、文書及び口頭による十分な説明を行い、自由意思による同意を文書で取得した。

### 2) ATX

血清ATX濃度は、1ステップサンドイッチ enzyme immunoassay法を原理とする測定試薬、Eテスト「TOSOH」II (オートタキシン) (東ソー株式会社) を用い、AIA-360 (東ソー株式会社) にて測定した。血清は室温で融解後、1時間以内に測定した。

### 3) 他の血清肝線維化バイオマーカー

ヒアルロン酸、4型コラーゲン7S、Mac-2結合蛋白糖鎖修飾異性体 (M2BPGi) は、他の研究などで測定し電子カルテに公開されているデータのみを使用した。ヒアルロン酸はラテックス凝集比濁法 (LA) 法を原理とする測定試薬、エルピアエースHA (富士レジオ株式会社)、4型コラーゲン7SはLA法を原理とする測定試薬、ルミパルスプレストIV型コラーゲン・7S (富士レジオ株式会社)、M2BPGiはLA法を原理とする測定試薬、HISCL M2BPGi試薬 (Sysmex株式会社) を用いて測定した。また、fibrosis-4 index (FIB-4index) およびAST/血小板インデックス (APRI) は以下の計算式にて算出した。  

$$\text{FIB-4index} = \text{年齢 [歳]} \times \text{AST [U/L]} / (\text{血小板数 [10}^9\text{/L]} \times \sqrt{\text{ALT [U/L]}})$$

$$\text{APRI} = (\text{AST [U/L]} / \text{ASTの正常上限値 (=30 [IU/L]}) / \text{血小板数 [10}^9\text{/L]} \times 100$$

### 4) MRE

装置は、Discovery MR 750W 3.0T (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて撮像し、北米放

射線学会の画像診断の定量化・標準化に向けた取り組み (Quantitative Imaging Biomarkers Alliance: QIBA) に従い、肝右葉で測定した4スライスの関心領域の弾性率 (平均値) を採用した。関心領域の設定は1名の放射線診断専門医が行った。肝線維化のカットオフ値はHsu Cら<sup>15)</sup>の報告から、早期線維化の指標として弾性率2.97 kPa以上をF2以上として評価した。

5) 統計解析

ATXとMREの関係はスピアマンの順位相関係数を算出し±0.7~±1.0を強い相関がある、±0.4~±0.7をかなり相関がある、±0.2~±0.4をやや相関がある、±0.0~±0.2をほとんど相関がないと評価した。男女間の患者背景及びATXの肝線維化進行度F2未満とF2以上の比較は、Mann-Whitney U検定またはカイ二乗検定を用い、ATX

の肝線維化進行度F2の診断能は receiver operating characteristic (ROC) 解析にて評価した。肝線維化進行度の診断能は、曲線下面積 (area under receiver operating characteristic curve: AUROC) が0.8以上1.0未満を高精度、0.6以上0.8未満を中精度、0.5以上0.6未満を低精度と評価した。統計解析ソフトはJMP16.0.0(SAS Institute Japan株式会社)を用いた。

3. 結果

1) 患者背景

NAFLD 74例 (男性: 38例, 女性: 36例) が登録された。対象患者の患者背景をTable 1に示す。年齢, 体脂肪率, 総コレステロール, M2BPGiは女性の方が男性より有意に高かった。一方, eGFRは女性の方が男性より有意に低値であった。その他の

Table 1 Characteristics of patients.

	All	Men	Women	p value
N	74	38	36	-
Age	47.4 ± 13.5	42.4 ± 12.5	52.8 ± 12.5	<0.001
BMI, kg/m <sup>2</sup>	36.65 ± 7.58	34.59 ± 5.86	36.76 ± 9.00	0.459
Dyslipidemia, %	59 (79.7)	30 (78.9)	29 (80.6)	0.863
Hypertension, %	49 (66.2)	25 (65.8)	24 (66.7)	0.936
Diabetes, %	66 (89.1)	35 (92.1)	31 (86.1)	0.407
Body fat percentage, %	35.65 ± 7.58	35.30 ± 8.28	46.92 ± 5.95	<0.001
HbA1c, %	6.86 ± 1.65	7.29 ± 2.07	6.41 ± 0.86	0.194
Alb, g/dL	4.05 ± 0.33	4.09 ± 0.35	4.01 ± 0.31	0.301
eGFR, mL/min/1.73m <sup>2</sup>	79.65 ± 26.70	88.04 ± 26.39	70.55 ± 24.24	0.003
Total cholesterol, mg/dL	172.1 ± 35.8	163 ± 32.5	181.0 ± 37.3	0.025
HDL, mg/dL	47.1 ± 11.2	46.1 ± 9.5	48.3 ± 13.0	0.460
LDL, mg/dL	102.7 ± 31.4	101.1 ± 28.2	104.1 ± 34.8	0.450
TG, mg/dL	131.7 ± 115.8	130.4 ± 151.4	133.1 ± 60.9	0.053
AST, U/L	36.6 ± 21.6	36.5 ± 20.7	36.6 ± 22.7	0.825
ALT, U/L	46.6 ± 38.9	52.8 ± 40.3	40.1 ± 36.8	0.077
Platelet ×10 <sup>9</sup> /L	224.4 ± 75.6	211.6 ± 74.9	237.5 ± 75.1	0.081
Hyaluronic acid, ng/mL	46.7 ± 66.5	44.5 ± 68.9	49.1 ± 64.8	0.602
Type IV collagen 7S, ng/mL	4.98 ± 1.70	5.06 ± 1.77	4.90 ± 1.64	0.661
M2BPGi, C.O.I.	0.84 ± 0.84	0.79 ± 1.03	0.90 ± 0.57	0.013
FIB-4 index	1.50 ± 1.36	1.29 ± 1.16	1.72 ± 1.52	0.300
APRI	0.62 ± 0.49	0.63 ± 0.39	0.62 ± 0.57	0.127
MRE, kPa	3.24 ± 1.34	3.31 ± 1.39	3.16 ± 1.29	0.589

Values are n (%) or mean ± standard deviation.

APRI, AST/Platelet index; C.O.I., cut off index; FIB-4 index, fibrosis-4 index; MRE, magnetic resonance elastography; M2BPGi, Mac-2 binding protein glycan isomer

項目は男女間で有意差はなかった。

## 2) MREによる肝線維化進行度評価

MREによる肝線維化進行度評価は、全対象者でF2未満49例、F2以上25例、男性F2未満24例、F2以上14例、女性F2未満25例、F2以上11例であった。また、男性では肥満群でF2未満16例、F2以上8例、高度肥満群でF2未満8例、F2以上6例であった。女性では肥満群においてF2未満11例、F2以上9例、高度肥満群でF2未満14例、F2以上2例であった (Table 2)。

## 3) 血清ATX濃度

血清ATX (mean ± SD) 濃度は、男性全例で0.748 ± 0.204 mg/L、女性全例で1.056 ± 0.310 mg/Lであった。肥満群は男性0.715 ± 0.226 mg/L、女性1.130 ± 0.356 mg/Lであった。一方、高度肥満群は男性0.805 ± 0.149 mg/L、女性0.963 ± 0.219 mg/Lであった (Table 3)。

## 4) ATXとMREの相関

ATXとMREの相関係数は男性で $r=0.547$ 、女性

で $r=0.492$ とかなりの相関関係が認められた。また、肥満群は男性で $r=0.652$ 、女性で $r=0.547$ とかなりの相関関係が認められたが、高度肥満群は男女ともに有意な相関関係は認められなかった (Fig. 1)。

## 5) ATXと肝線維化進行度

F2未満群と以上群におけるATXと肝線維化進行度の比較をTable 4に示す。男性全例の血清ATX濃度は、F2以上が未満と比較して有意に高値であった。また、女性では、F2以上と未満では有意差は認められなかったが、高値傾向 ( $p=0.05$ ) であった (Fig. 2)。

男性肥満群では、F2以上が未満と比較して有意に高値であった。一方、高度肥満群では、F2未満と以上の間に有意差は認められなかった。また、女性の肥満群でF2未満と以上の間には有意差は認められなかった (Fig. 2)。

## 6) ATX及び他の血清肝線維化バイオマーカーにおける肝線維化の診断能

ATXと他の血清肝線維化マーカー(ヒアルロン酸、

Table 2 Evaluation of liver fibrosis by MRE.

	Men (n=38)		Women (n=36)	
	Fibrosis stage < 2	Fibrosis stage ≥ 2	Fibrosis stage < 2	Fibrosis stage ≥ 2
All (n=74)	24	14	25	11
Obesity (n=44)	16	8	11	9
Severe obesity (n=30)	8	6	14	2

Obesity,  $25 \leq \text{BMI} < 35 \text{ kg/m}^2$ ; Severe obesity,  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$

MRE, magnetic resonance elastography

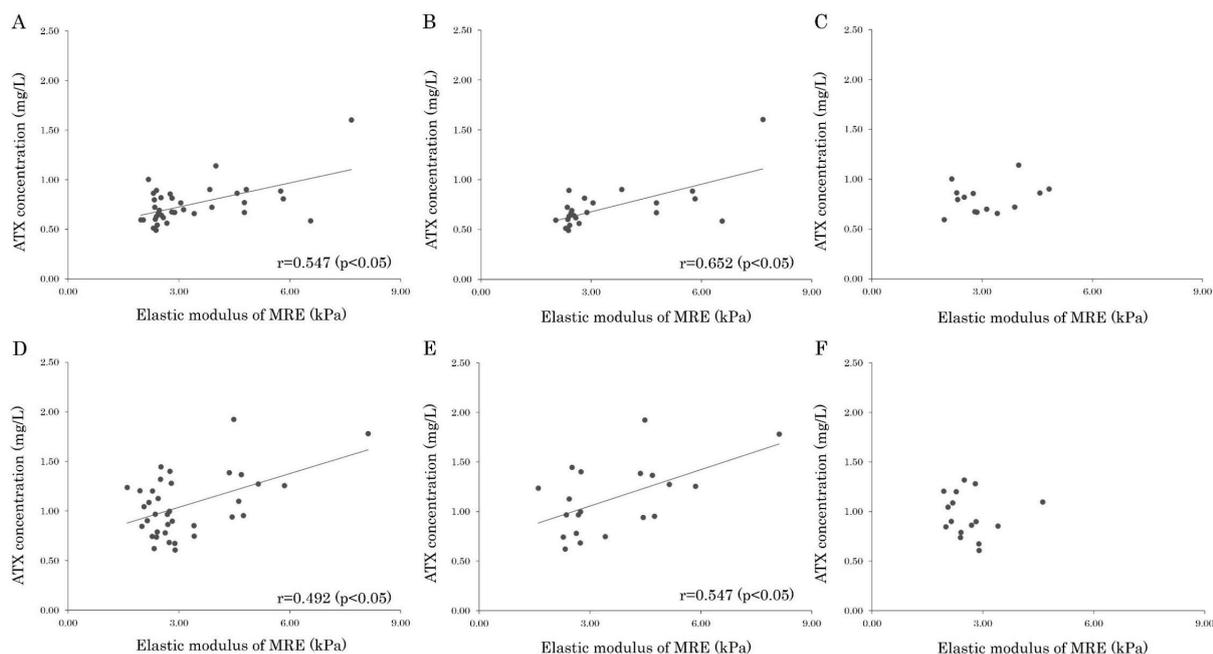
Table 3 ATX concentration.

	Men (n=38)	Women (n=36)
All (n=74), mg/L	0.748 ± 0.204	1.056 ± 0.310
Obesity (n=44), mg/L	0.715 ± 0.226	1.130 ± 0.356
Severe obesity (n=30), mg/L	0.805 ± 0.149	0.963 ± 0.219

Values are mean ± standard deviation.

Obesity,  $25 \leq \text{BMI} < 35 \text{ kg/m}^2$ ; Severe obesity,  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$

ATX, autotaxin



A. Men (All), B. Men (Obesity), C. Men (Severe obesity), D. Women (All), E. Women (Obesity), F. Women (Severe obesity)

Obesity,  $25 \leq \text{BMI} < 35 \text{ kg/m}^2$ ; Severe obesity,  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$

ATX, autotaxin; MRE, magnetic resonance elastography

Fig. 1 Correlation between ATX concentration and elastic modulus of MRE.

Table 4 Comparison of ATX concentration by liver fibrosis stage.

	Men (n=38)			Women (n=36)		
	Fibrosis stage < 2	Fibrosis stage $\geq 2$	p value	Fibrosis stage < 2	Fibrosis stage $\geq 2$	p value
All (n=74), mg/L	0.685 ± 0.136	0.856 ± 0.256	0.01	0.977 ± 0.249	1.235 ± 0.372	0.05
Obesity (n=44), mg/L	0.635 ± 0.110	0.874 ± 0.313	0.01	0.998 ± 0.281	1.292 ± 0.385	0.14
Severe obesity (n=30), mg/L	0.785 ± 0.132	0.831 ± 0.179	0.61	0.961 ± 0.230	0.976 ± 0.173	NA*

Values are mean ± standard deviation.

Obesity,  $25 \leq \text{BMI} < 35 \text{ kg/m}^2$ ; Severe obesity,  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$

ATX, autotaxin

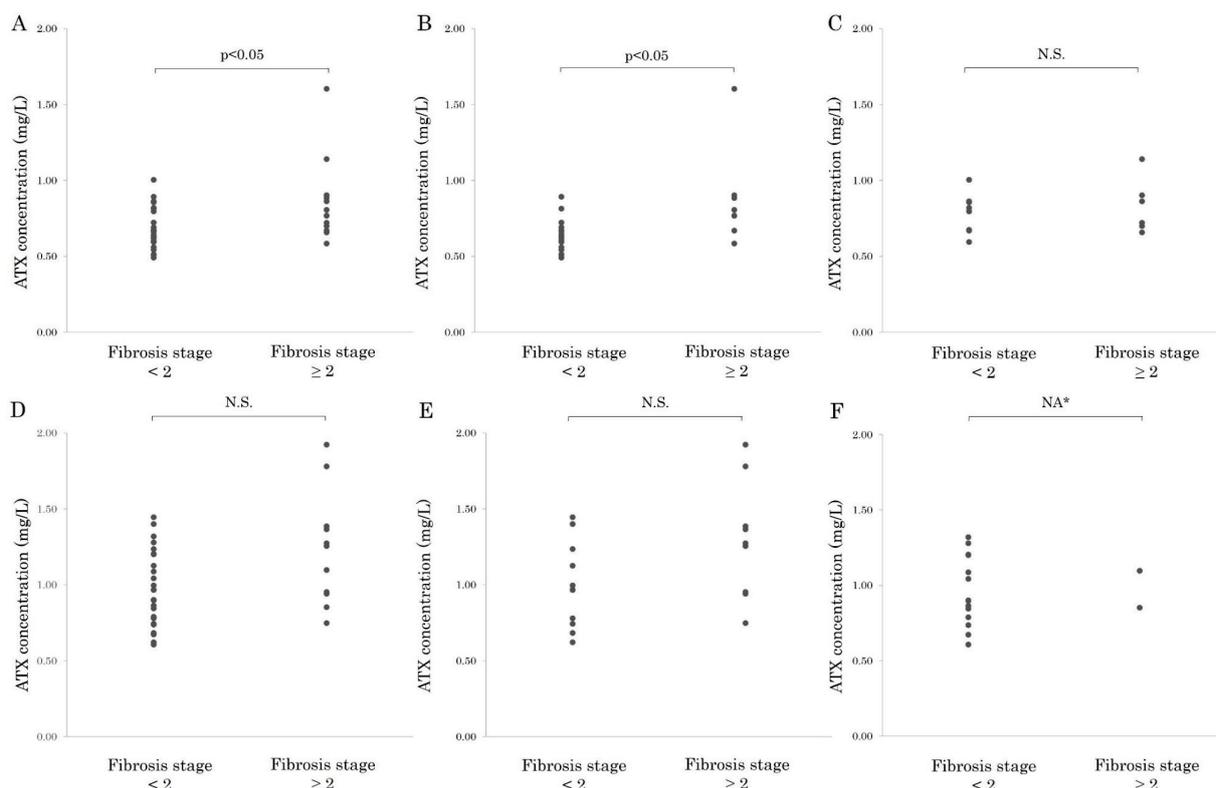
\* Severe obesity in women did not evaluate due to small number of subjects.

IV型コラーゲン7S, M2BPGi, FIB-4 index, APRI)におけるF2以上群を鑑別するAUROCをFig. 3に示す。また、各項目におけるカットオフ値, AUROC, 感度, 特異度, 陽性適中率, 陰性適中率はTable 5に示す。F2以上群を診断するATXのAUROCは、男性全例0.743, 女性全例0.705と男女ともに中精度であった。また、肥満群における同指標は、男性0.820と高精度, 女性0.697と中精度であ

ったが、高度肥満群では、男性0.583と低精度であった。他の肝線維化バイオマーカーは、男女ともに中精度以上であった。

#### 4. 考察

ATXとMREの相関関係は、男女ともに肥満群では有意な相関関係が認められたが、高度肥満群では有意な相関関係は認められなかった (Fig. 1)。



A. Men (All), B. Men (Obesity), C. Men (Severe obesity), D. Women (All), E. Women (Obesity), F. Women (Severe obesity)

Obesity,  $25 \leq \text{BMI} < 35 \text{ kg/m}^2$ ; Severe obesity,  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$ ; N.S., Not significant

ATX, autotaxin

\* Severe obesity in women not yet evaluated due to small number of subjects.

Fig. 2 Comparison of ATX concentration by liver fibrosis stage.

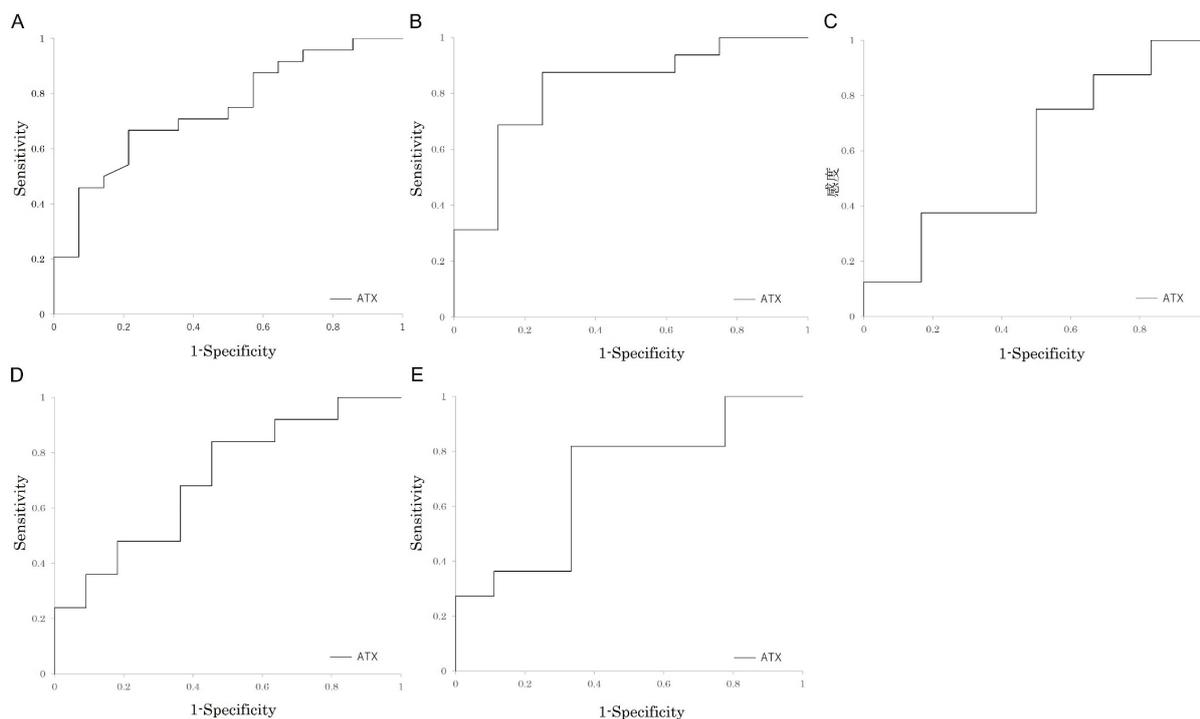
Table 5 The diagnostic accuracy of ATX and other serum biomarkers for liver fibrosis.

		Men						Women					
		Cut off value	AUROC	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Cut off value	AUROC	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
All	ATX	0.69	0.743	66.7	78.6	84.2	57.9	1.24	0.705	84.0	54.6	80.8	60.0
	Hyaluronic acid	27.1	0.815	75.0	85.7	90.0	66.7	35.1	0.902	80.0	100.0	100.0	66.7
	Type IV collagen 7S	4.40	0.926	83.3	92.9	95.2	76.5	4.80	0.831	76.0	81.8	90.5	60.0
	M2BPGi	0.45	0.817	58.3	100.0	100.0	58.3	1.04	0.722	92.0	55.6	85.2	71.4
	FIB-4 index	1.04	0.823	73.9	78.6	85.0	64.7	1.65	0.836	96.0	63.6	85.7	87.5
	APRI	0.56	0.941	73.9	100.0	100.0	70.0	0.55	0.847	76.0	81.8	90.5	60.0
Obesity	ATX	0.72	0.820	87.5	75.0	87.5	75.0	1.24	0.697	81.8	66.7	75.0	75.0
	Hyaluronic acid	15.6	0.781	62.5	100.0	100.0	57.1	35.1	0.843	63.6	100.0	100.0	69.2
	Type IV collagen 7S	4.10	0.965	81.3	100.0	100.0	72.7	4.50	0.823	63.6	88.9	87.5	66.7
	M2BPGi	0.45	0.836	75.0	100.0	100.0	66.7	1.33	0.682	90.9	50.0	71.4	80.0
	FIB-4 index	0.94	0.852	62.5	100.0	100.0	57.1	1.43	0.808	90.9	66.7	76.9	85.7
	APRI	0.63	0.984	100.0	87.5	94.1	100.0	0.45	0.879	72.7	88.9	88.9	72.7
Severe obesity	ATX	0.86	0.583	75.0	50.0	66.7	60.0						
	Hyaluronic acid	27.1	0.917	87.5	100.0	100.0	85.7						
	Type IV collagen 7S	4.30	0.854	75.0	100.0	100.0	75.0						
	M2BPGi	0.78	0.865	100.0	66.7	80.0	100.0			NA*			
	FIB-4 index	1.31	0.786	100.0	50.0	70.0	100.0						
	APRI	0.56	0.810	57.1	100.0	100.0	66.7						

Obesity,  $25 \leq \text{BMI} < 35 \text{ kg/m}^2$ ; Severe obesity,  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$

APRI, AST/Platelet index; ATX, autotaxin, AUROC, area under a receiver operating characteristic curve, FIB-4 index, fibrosis-4 index; M2BPGi, Mac-2 binding protein glycan isomer, NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value,

\* Severe obesity in women did not evaluate due to small number of subjects.



A. Men (All), B. Men (Obesity), C. Men (Severe obesity), D. Women (All), E. Women (Obesity)  
 Obesity,  $25 \leq \text{BMI} < 35 \text{ kg/m}^2$ ; Severe obesity,  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$

ATX, autotaxin

Fig. 3 The diagnostic accuracy of ATX.

ATXは主に脂肪細胞で産生される物質であり、脂肪組織、特に内臓脂肪よりも皮下脂肪においてATXの発現量が増加していることが報告されている<sup>16)</sup>。糖尿病患者及び耐糖能異常者では、コントロール（正常耐糖能）と比較して、脂肪組織内のATX発現が上昇していることが報告されている。一方、Nishimuraら<sup>13)</sup>は肥満者では血清ATX濃度が低下すると報告している。したがって、我々の検討において高度肥満群ではATXとMREに有意な相関関係がなかったことは、肥満による複合的な影響に起因している可能性が考えられる。

MREは、NAFLDにおける線維化の検出において、BMIに影響を受けず、高い診断精度を有することが報告されている<sup>17)</sup>。本研究における、血清ATX濃度（平均値）は、肥満群男性0.715 mg/L、女性1.130 mg/L、高度肥満群は男性0.805 mg/L、女性0.963 mg/Lであった。一方、Yamazakiら<sup>9)</sup>は健常者（男性80例・女性80例）において、血清ATX濃度（中央値）は男性0.70 mg/L、女性0.82 mg/Lと報告しており、既報と比較し、男女ともに高値傾向であったが、女性の方がより高値であった。

Fujimoriら<sup>18)</sup>は、NAFLD 186例（男性80例、女性106例）、Hondaら<sup>11)</sup>は、NAFLD 307例（男性173例、女性134例）の検討において、血清ATX濃度は肝線維化の進行度に応じて上昇することを報告している。本研究では肥満群で、男性のF2以上が未満と比較し、血清ATX濃度が有意に高値であったが、高度肥満群では有意差はなかった。さらに女性の肥満群でF2未満と以上において、有意差は認められなかった。本研究は、肝線維化の進行度を、F2未満と以上で比較しており、既報との比較は難しいが、症例数が少ないことと肥満による影響によって、各群間で有意差が認められなかった可能性も考えられる。特に、本研究の対象患者において、体脂肪率は、女性の方が、男性より有意に高値であり、より女性の方が脂肪の影響を受けていた可能性も考えられる。

ATXと他の血清バイオマーカーの比較では、肥満群の男性でヒアルロン酸を除く他の血清マーカーとATXは同程度の診断能であったが、女性ではM2BPGiを除く他の血清マーカーよりATXの診断精度は低かった。さらに、高度肥満群では男女とも

にATXは他の血清バイオマーカーよりも診断精度が低かった。これらの結果から、高度肥満例ではATXの診断精度が低下する可能性がある。

Hondaら<sup>11)</sup>は、F2以上のカットオフ値は、男性0.76 mg/L、女性0.99 mg/Lと報告している。本研究では、男性0.69 mg/L、女性1.24 mg/Lであり、肥満群では、男性0.72 mg/L、女性1.24 mg/L、高度肥満群では、男性0.86 mg/Lであった。カットオフ値が既報と大きく異なることは、対象者に高度肥満症例が含まれていることに起因している可能性も考えられる。また、肥満の程度によってカットオフ値が大きく異なることから、カットオフの設定には、肥満による影響を考慮する必要があると考えられる。他の肝線維化マーカーにおけるF2以上のカットオフ値は、ヒアルロン酸で男性45 ng/mL、女性52 ng/mL、IV型コラーゲン7Sで男性5.40 ng/mL、女性4.90 ng/mL、Fib-4 indexで男性1.15、女性1.49、APRIで男性0.67、女性0.81と報告されている<sup>11)</sup>。またOgawaら<sup>19)</sup>は、M2BPGiにおけるF2以上のカットオフ値は、男女で0.83 C.O.I.と報告している。ヒアルロン酸の基準値が50 ng/mLに対し、本研究のF2カットオフ値は男性27.1 ng/mL、女性35.1 ng/mLであり、既報と比較し低値傾向であった。これは、ATXと同様に本研究に高度肥満患者が含まれていることに起因している可能性が考えられる。一方、他の項目は既報と本研究は同程度であった。

本研究のlimitationは、第一に症例数、特に女性の高度肥満群が少なく、統計学的解析が行えなかった点である。今後、他施設と共同研究などで症例数を増やし、追加検証する必要がある。第二に、脂肪によるATXへの直接的な影響を解析することができなかった点である。今後の解析によりATXによる肝線維化進行度評価の注意点を明らかにする必要がある。

現在、肝線維化を評価する血液バイオマーカーとしてM2BPGi、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン7Sや複数の検査項目を組み合わせたFib-4 index、APRIなどが臨床応用されている。しかし、血液バイオマーカーは肝線維化進行度を間接的に評価しており、様々な因子により影響を受けると考えられる。血清ATX濃度も妊娠時にも上昇<sup>20)</sup>することや副腎皮質ステロイドホルモン投与によって低下<sup>21)</sup>することが報告されている。一方、血清ATX濃度は年齢や腎機能<sup>22)</sup>、食餌<sup>23)</sup>の影響を受けず、ATXは5日間の室温保存や5回の凍結融解にも安定<sup>24)</sup>であることが報告されている。したがって、測定する上で比較的扱いやすい蛋白質であることは、今後様々な

疾患における評価項目として臨床応用される可能性がある。その際のATXの結果の解釈には、肥満による影響を考慮する必要がある。

## 5. 結語

ATXは初期の肝線維化診断に有用と考えられたが、男性の高度肥満例では診断精度が低下し、結果の解釈に注意が必要な可能性がある。

ATXは、東ソー株式会社から試薬・装置の提供を受けて、測定した。

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) Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001;344:495-500.
- 2) Standish RA, Cholongitas E, Dhillon A, et al. An appraisal of the histopathological assessment of liver fibrosis. *Gut* 2006;55:569-578.
- 3) Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825-832.
- 4) Regev A, Berho M, Jeffers LJ, et al. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2614-2618.
- 5) Gawrieh S, Knoedler DM, Saeian K, et al. Effects of interventions on intra- and interobserver agreement on interpretation of nonalcoholic fatty liver disease histology. *Ann Diagn Pathol* 2011;15:19-24.
- 6) Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2018;67:328-357.
- 7) Kim YS, Jang YN, Song JS. Comparison of gradient-recalled echo and spin-echo echoplanar imaging MR elastography in staging liver fibrosis: a meta-analysis. *Eur Radiol* 2018;28:1709-1718.
- 8) Ichikawa S, Motosugi U, Morisaka H, et al.

- Validity and Reliability of Magnetic Resonance Elastography for Staging Hepatic Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis B. *Magn Reson Med Sci* 2015;14:211-221.
- 9) Yamazaki T, Joshita S, Umemura T, et al. Association of Serum Autotaxin Levels with Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C. *Sci Rep* 2017;7:46705.
  - 10) Joshita S, Ichikawa Y, Umemura T, et al. Serum autotaxin is a useful liver fibrosis marker in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepato Res* 2018;48:275-285.
  - 11) Honda Y, Imajo K, Kobayashi T, et al. Autotaxin is a valuable biomarker for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepato Res* 2019;49:1136-1146.
  - 12) Nakamura K, Igarashi K, Ide K, et al. Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation. *Clin Chim Acta* 2008;388:51-58.
  - 13) Nishimura S, Nagasaki M, Okudaira S, et al. ENPP2 contributes to adipose tissue expansion and insulin resistance in diet-induced obesity. *Diabetes* 2014;63:4154-4164.
  - 14) Younossi ZM, Gramlich T, Liu YC, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. *Mod Pathol* 1998;11:560-565.
  - 15) Hsu C, Caussy C, Imajo K, et al. Magnetic Resonance vs Transient Elastography Analysis of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Pooled Analysis of Individual Participants. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019;17:630-637 e638.
  - 16) Rancoule C, Dusaulcy R, Treguer K, et al. Depot-specific regulation of autotaxin with obesity in human adipose tissue. *J Physiol Biochem* 2012;68:635-644.
  - 17) Singh S, Venkatesh SK, Looma R, et al. Magnetic resonance elastography for staging liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease: a diagnostic accuracy systematic review and individual participant data pooled analysis. *Eur Radiol* 2016;26:1431-1440.
  - 18) Fujimori N, Umemura T, Kimura T, et al. Serum autotaxin levels are correlated with hepatic fibrosis and ballooning in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2018;24:1239-1249.
  - 19) Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, et al. Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2-binding protein and type 4 collagen 7S: useful markers for the diagnosis of significant fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2018;33:1795-1803.
  - 20) Masuda A, Fujii T, Iwasawa Y, et al. Serum autotaxin measurements in pregnant women: application for the differentiation of normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *Clin Chim Acta* 2011;412:1944-1950.
  - 21) Sumida H, Nakamura K, Yanagida K, et al. Decrease in circulating autotaxin by oral administration of prednisolone. *Clin Chim Acta* 2013;415:74-80.
  - 22) 黒沢 貴之, 矢島 智志, 山崎 悦子. 血清肝線維化マーカーに及ぼす腎機能の影響に関する検討. *医療検査と自動化* 2020;45:551-554.
  - 23) Ikeda H, Kobayashi M, Kumada H, et al. Performance of autotaxin as a serum marker for liver fibrosis. *Ann Clin Biochem* 2018;55:469-477.
  - 24) 宇佐美 陽子, 石嶺 南生, 柴 彩夏ほか. 新規肝線維化マーカーオートタキシン測定試薬の基礎性能評価. *医学検査* 2019;68:99-104.

# 尿蛋白試験紙の測定操作および判定に関するリスク解析

A risk assessment for urine test strip in urinalysis

豊島寛大, 逸見 孝, 稲田政則

**Abstract** Urine test strips are widely used in medical laboratories to determine the chemical substances in urine. Although it is easy to manipulate test strips, it requires a lot of attention, which is not well founded. At the end of the analytical process, visual judgments by individual practitioners can cause fluctuations in measurements. In this study, we examined the risk assessment of measuring errors associated with manipulation and fluctuation due to visually reading in urinalysis. We prepared samples (0–300 mg/dL, 4 levels) with bovine albumin added to urine and measured them with protein reagent strips (Siemens). Then, we measured the following in each situation: sample temperature (4 or 25 °C), reaction time (20, 60, or 180 s), and urine wiping operation (done or not). After the reaction, the reagent pad areas were photographed using a digital camera, and RGB values were obtained from the images. Finally, we performed a multiple regression analysis to clarify the degree of influence of the above situations, using the R value as a response variable and the albumin concentration and each situation as explanatory variables. In contrast, 18 color patterns expressing the reaction associated with albumin concentration were synthesized by computer simulation based on the above examinations. Thirty practitioners visually read them using the approximation and round-up methods. In the results, the multiple regression analysis shows only the albumin concentration affected to the R value, the others were not significant. Individual differences in visual judgments were observed; the fluctuation from the approximation method was smaller than that from the round-up method. We concluded that the risk of measurement error from test strip manipulation was very low, and the risk of fluctuation from visual judgement was high in urinalysis. In addition, the approximation method is reasonable for reducing risk.

**Key words** urine test strip, measurement error, fluctuation, visually reading

## 1. はじめに

尿定性検査で利用されている試験紙法<sup>1-2)</sup>は、操作が簡便であり、国内外を問わず広く普及している。各社の製品は、ほぼ同様の操作性<sup>1-3)</sup>で、同様に遵守すべき事項も多い。臨床検査の初学者が使う教科書<sup>4)</sup>、JCCLS提案指針<sup>5)</sup>、尿蛋白試験紙製品の添付文書<sup>6)</sup>において使用方法、取扱い方法、保存方法、測定上の注意事項が詳細に記載されている。

試験紙法はすでに確立された技術とみなされる。Sharakiらは、尿検査の工程で起こる過誤は、検査前あるいは検査後工程で発生し、分析工程での発生頻度は0.31%に過ぎないと報告している<sup>7)</sup>。NCCLSのガイドライン<sup>8)</sup>においても、測定法よりも尿検体の採取、運搬、保存方法に焦点が当てられている。我々が行った文献調査において、試験紙法の操作自体に求められる注意点を裏付ける系統的な研究はほぼ見当たらなかった。測定操作に潜むリスクは不明

Received Mar. 24, 2023; Accepted Aug. 1, 2023  
Norihiro TOYOSHIMA, Kou HENMI, Masanori INADA  
つくば国際大学 医療保健学部 臨床検査学科  
Department of Medical Technology, Faculty of Health Science, Tsukuba International University

〒300-0051 茨城県土浦市真鍋6-20-1  
6-20-1 manabe, tsutiura-shi, Ibaraki  
Corresponding author: 稲田政則  
TEL: 029-826-6000  
E-mail: m-inada@tius.ac.jp

瞭なままである。

JCCLSの指針<sup>5)</sup>によれば、判定を目視で行う際に、切り上げ法、近似法、切り下げ法のいずれかの方法を選択し、施設内で統一すべきとされている。ただ、どの方法を使うべきかの技術的優劣は議論されていない。日本腎臓学会は、近似法は個人の視覚の差により誤差が生じやすいと指摘<sup>9)</sup>しているものの、その裏付けとなる調査の有無は不明瞭である。

そこで我々は、尿蛋白試験紙を取り上げ、試験紙法の各操作での逸脱が、どの程度検査結果に影響をもたらすのか、また、目視判定の際の方法の違いと個人差によるバラつきがどの程度存在するのか、尿試験紙法に関するリスク評価を試みた。

## 2. 方法

今回、尿蛋白試験紙として、シーメンス社の機器・目視判定用のアルプスティックス<sup>6)</sup>を用いた。

調査は、操作に伴う誤差の解析と目視判定のバラツキの解析の2つに分けて実施した。操作に伴う誤差の解析では、一部の尿定性自動分析装置でCCDカメラが採用されていることに倣い、デジタルカメラにて撮影し画像データのRGB値を取得して解析に供した。目視判定のバラツキについては、操作に伴う誤差の解析で得られたRGB値から疑似反応画像を合成し、切り上げ法と近似法で複数人に目視判定してもらうことで解析した。

### 1) 撮影環境

試験紙反応部を安定して撮影するために、Fig. 1に示す治具を作製した。

### 2) 統計手法

試料中の蛋白濃度および試験紙法の各操作(要因)が試験紙の色調(特性値)に影響を及ぼす度合いを

解析するために重回帰分析<sup>10-11)</sup>を用いた。

### 3) 調査した要因と特性値

尿蛋白試験紙の色調を変化させる要因として、蛋白濃度、保存温度、反応時間、ぬぐい操作を取り上げた。尿蛋白陰性の尿試料をベースに牛アルブミン(Wako社)を蛋白濃度0, 20, 100, 300mg/dLとなるように添加し、4水準の濃度系列とした。測定直前までの試料の保存温度は4℃(冷蔵)と25℃(室温)とした。反応時間は本来60秒判定以外に20秒と180秒の条件とした。試験紙浸漬後の引き上げ操作において、試料容器に試験紙側面を接触させてのぬぐい操作の有無を条件とした。これらの各要因各水準の全ての組み合わせパターンでアルプスティックスにて測定を行い、1)の撮影環境にて、反応後の試薬パッドの反応部分を照度計で測定しながら1000ルクスを示すように白色光の位置を設定し、デジタルカメラ(CASIO社製EXILIM EX-ZR50)で撮影した。

撮影した試験紙反応部の画像をパーソナルコンピュータに取り込み、画像処理ソフトウェア「ImageJ」にて解析した<sup>12)</sup>。撮影した画像の試薬パッド部分の中心140×140画素の範囲を固定してこの範囲の平均RGB値を取得した。

各要因を説明変数とし、各要因各水準の全ての組み合わせパターンで取得したRGB値のうちR値を目的変数として重回帰分析に供した。

### 4) 線形補間による疑似反応画像の作製

アルプスティックスの色調表に合わせて、濃度系列(0, 10, 30, 100, 300, 1000mg/dL)を調整し、アルプスティックスの標準的操作(25℃, 60秒, ぬぐい操作有)にて測定した。デジタルカメラ撮影画像から取得したRGB値を基に、表計算ソフトウェアにてRGB値から色を再現して色調表を作成し、

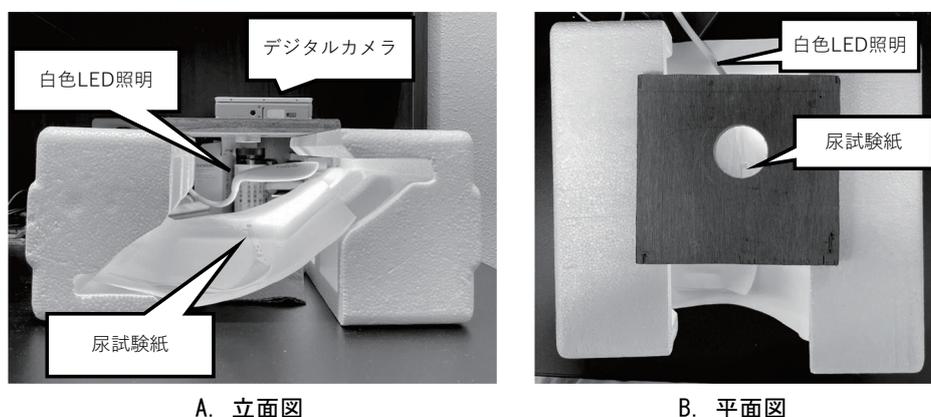


Fig. 1 Camera setting and equipment.

さらに線形補間にて合計18段階の疑似反応結果画像を作製した。

### 5) 目視判定のバラツキの解析

4)で再現した色調表およびランダムに配置し18種の疑似反応結果画像を印刷し(付録参照),研究の目的を説明し同意が得られたつくば国際大学医療保健学部臨床検査学科3,4年生30名に配布し,18種の疑似反応結果を色調表に従って,切り上げ法および近似法で目視判定をしてもらった。

## 3. 結果

### 1) 操作に伴う誤差の解析

重回帰分析の結果をTable 1に,標準的測定条件下での蛋白濃度とRGB値の関係をFig. 2左に示す。R値と蛋白濃度の関係のみをあらためてFig. 2右に示す。

重回帰分析の結果,決定係数は0.89であった。p値は濃度の常用対数値で0.001未満,温度で0.77,時間で0.50,ぬぐい操作の有無で0.75であり,尿蛋白試験紙の反応結果である色調には濃度のみが影響していた。

### 2) 目視判定のバラツキの解析

協力者30名が18段階の蛋白濃度の疑似反応結果

を近似法で目視判定した結果をFig. 3 Aに,同じく切り上げ法で判定した結果をFig. 3 Bに示す。さらに半定量値について,「-」を0,「±」を0.5,「1+」を1,「2+」を2,「3+」を3,「4+」を4としてスコア化を施し,平均値と標準偏差を求めた結果をTable 2に示す。全体を通して,平均の平均と標準偏差の中央値を求めると,近似法で2.16,0.290に対し,切り上げ法では2.54,0.409であった。バラツキの大きさを標準偏差で評価するならば,近似法に比べて切り上げ法で大きいことが示された。

## 4. 考察

尿試験紙は簡便な方法でありながら,JCCLS提案指針<sup>5)</sup>や製品の添付文書<sup>6)</sup>では操作上の注意事項が詳細に示されている。ただし,その注意事項を守らない場合にどのような影響がどのくらい生じるのか,根拠となる調査研究の存在も含め不明瞭である。目視判定を行う際の判定法も近似法,切り上げ法,切り下げ法が示されているものの,その技術的リスクを詳細に比較検討した報告も近年の研究としては見当たらない。我々の経験に基づく仮説として,試験紙法は頑健な方法で,多少逸脱した操作であっても反応結果への影響は少なく,むしろ,目視判定に

**Table 1** Results of multiple regression analysis between the R values as a response variable and explanatory variables: albumin concentration (0-300 mg/dL, 4 levels), sample temperature (4 or 25 °C), reaction time (20, 60, or 180 s), and urine wiping operation (done or not).

回帰統計	
重相関係数	0.94
重決定係数	0.89
補正重決定係数	0.88
標準誤差	12.16
観測数	48

分散分析表					
	自由度	変動	分散	観測された分散比	有意 F
回帰	4	49328	12332	83.3	$1.11 \times 10^{-19}$
残差	43	6362	148		
合計	47	55691			

	係数	標準誤差	t	p 値
切片	209.099	4.934	42.383	0.000
log <sub>10</sub> 濃度	-34.325	1.882	-18.241	0.000
温度(°C)	0.051	0.170	0.296	0.768
時間(s)	-0.017	0.026	-0.677	0.502
ぬぐい操作の有無	1.146	3.511	0.326	0.746

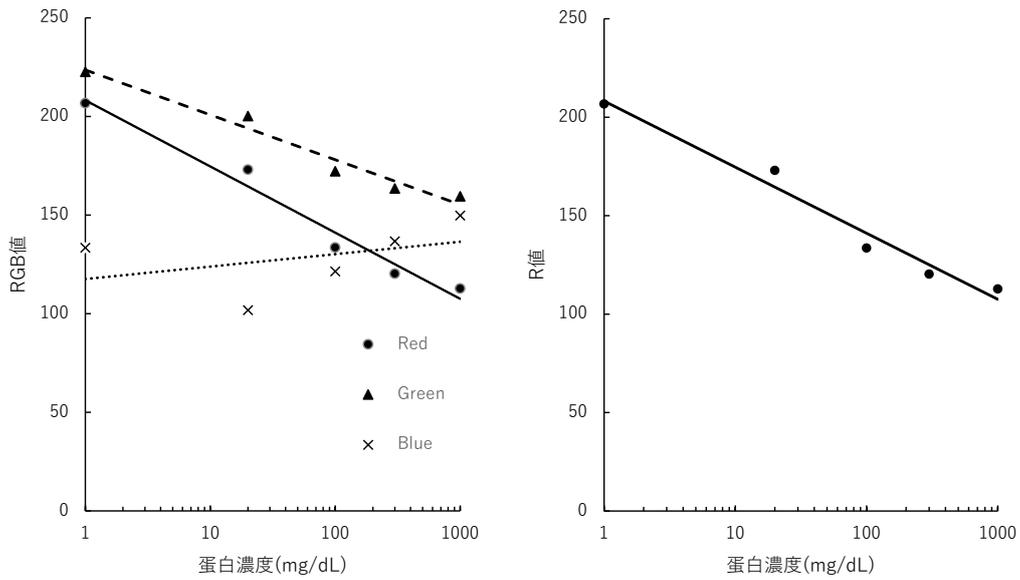
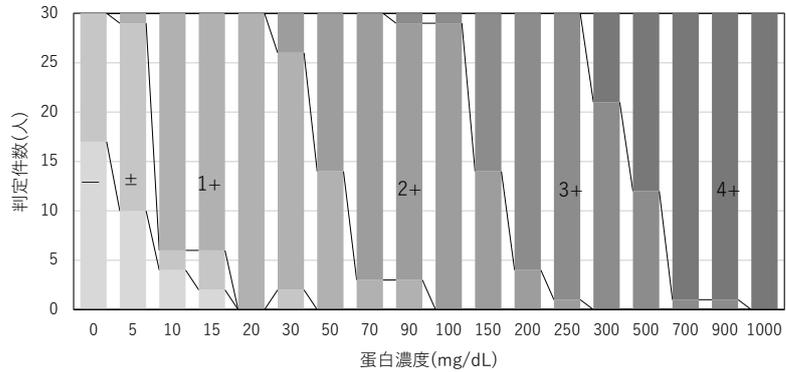


Fig. 2 Relationship between urine albumin concentration and RGB values in the reagent area of the urine test strip. The series of R values was employed to the response variable because of its linearity.

A. 近似法 (approximation method)



B. 切り上げ法 (round-up method)

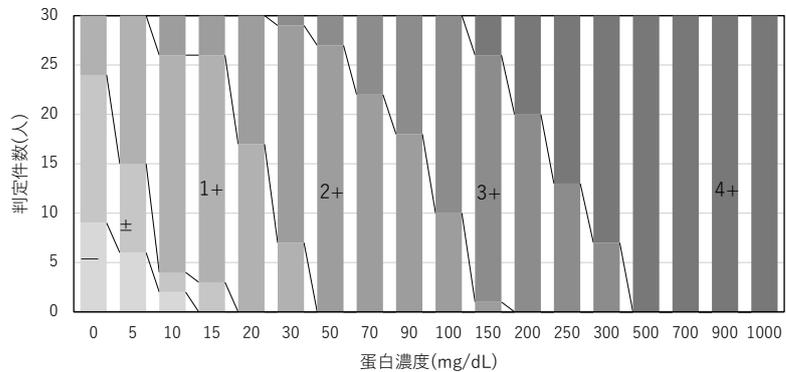


Fig. 3 Results of visually reading 18 color patterns representing the reagent areas on the test strips by computer simulation. Thirty practitioners assessed semi-quantitative values (approximation and round-up methods) by comparing the simulated color patterns to the corresponding color chart related to urine albumin concentration.

**Table 2** Fluctuations in visual reading using approximation and round-up methods. Semi-quantitative values were converted into scores ( $- = 0$ ,  $\pm = 0.5$ ,  $1+ = 1$ ,  $2+ = 2$ ,  $3+ = 3$ , and  $4+ = 4$ ). The standard deviations were calculated for each color pattern.

**A. 近似法 (approximation method)**

蛋白濃度 (mg/dL)	0	5	10	15	20	30	50	70	90	100	150	200	250	300	500	700	900	1000	全体
平均値	0.22	0.35	0.83	0.87	1.00	1.10	1.53	1.90	1.93	2.03	2.53	2.87	2.97	3.30	3.60	3.97	3.97	4.00	2.16
標準偏差	0.248	0.263	0.350	0.287	0.000	0.374	0.499	0.300	0.359	0.180	0.499	0.340	0.180	0.458	0.490	0.180	0.180	0.000	0.293

**B. 切り上げ法 (round-up method)**

蛋白濃度 (mg/dL)	0	5	10	15	20	30	50	70	90	100	150	200	250	300	500	700	900	1000	全体
平均値	0.45	0.65	1.03	1.08	1.43	1.80	2.10	2.27	2.40	2.67	3.10	3.33	3.57	3.77	4.00	4.00	4.00	4.00	2.54
標準偏差	0.350	0.391	0.464	0.389	0.496	0.476	0.300	0.442	0.490	0.471	0.396	0.471	0.496	0.423	0.000	0.000	0.000	0.000	0.409

おいてのバラツキこそが誤差の本質ではないかと考えていた。目視判定において色覚の個人差の存在はもちろん、近似法そのものが切り上げ法や切り下げ法に比べて、個人差をより増幅している可能性も疑われた。こうした背景の下、今回、蛋白試験紙（アルブステックス）<sup>6)</sup>を用いて詳細な調査を試みた。

調査は、試験紙法の各操作に伴う誤差の解析と目視判定のバラツキの解析に分けて実施した。

尿蛋白試験紙の色調変化を生じさせる要因として、蛋白濃度をはじめ、試料の測定前の保存温度、反応時間、ぬぐい操作を取り上げ、これらを説明変数とし、一方、反応結果としての色調をデジタルカメラで撮影してRGB値を取得した中からR値を目的変数として選び、重回帰分析を試みた。

尿蛋白試験紙の機能として、試料の蛋白濃度に応じて試薬パッド部の色調が変化しなくてはならない。蛋白濃度の対数値とRGB値の間にはFig. 2に示したような関係がみられ、特にR値は大きな傾きで直線的な関係がみられた。完全な直線とは言えないが、高木らの反射率の検量線でも同様の傾向が示されている<sup>13)</sup>。この結果から、R値を特性値として採用する妥当性が確認できた。

重回帰分析の結果 (Table 1) をみると、重決定係数は0.89と重回帰モデルの当てはまる精度は良好であった。各要因のp値は、濃度の対数値が0.001未満である一方、試料の測定前の温度で0.768、反応時間で0.502、ぬぐい操作の有無で0.746であり、反応結果である色調変化は蛋白濃度のみで規定され、その他の要因は系統的な誤差として影響していないことが示された。このことから、尿蛋白試験紙については、各種操作で逸脱があったとしても系統的誤差の発生リスクは低いものと考えられる。

目視判定のバラツキの解析では、18段階の蛋白濃度の疑似反応結果を再現し、協力者に近似法お

び切り上げ法で目視判定してもらった。協力者30名の判定結果は、近似法はFig. 3 Aに、切り上げ法はFig. 3 Bに示した通りである。いずれにおいても、18段階の蛋白濃度の疑似反応結果において判定された半定量値は30名の間でバラツキがある。当然ではあるが、各濃度において、切り上げ法は高い半定量値に判定している割合が高い。半定量値をスコア化して平均値で表してみると、Table 2に示した通り、18種類全体を通した平均値の平均は、近似法で2.16に対し、切り上げ法では2.54と0.38高い。これは色調表にない中間色を高い半定量値に判断するという切り上げ法のルールに沿って協力者が判定していることを示しているものと解釈される。一方、判定のバラツキを標準偏差で表すならば、全体を通して、標準偏差の中央値は近似法で0.293に対して、切り上げ法は0.409と大きいことが示された。当初の我々の仮説では、近似法こそが判定の個人差をそのまま増幅させ、バラツキが大きいと考えていたが、反対の結果であった。すなわち、目視判定に色覚的に個人差は存在するものの、近似法で判定することでバラツキが小さくなることを示している。近似法は、四捨五入的な自然な発想に沿い、かつ、技術的合理性のある妥当な判定方法と言える。

今回の結果は、尿蛋白試験紙に限定されることに注意しなければならない。今回使用した尿蛋白試験紙は瞬時に呈色し、その後は判定時間の前後において安定していたが、例えば、尿糖のように測定原理に酵素法を採用している場合には、反応時間の逸脱は有意に影響を及ぼすと予想される。また、多項目試験紙ではぬぐい操作がない場合にランオーバーが起きて少なからず色調に影響が出ることが推察される。よって、試験紙操作に伴う誤差についてはさらに調査を広げる余地がある。目視判定のバラツキの調査結果については、用紙に印刷した疑似反応結果

を複数人に判定してもらっていることから、個人の色覚認知以外に誤差が入りこむ余地は少なく、普遍性のある結果と考えられる。自動分析装置の普及で目視判定を代替することは、単に効率化のみならず、尿試験紙法に関連するリスクを低減させる意義が大きいと考えられる。

尿試験紙法を用手法で実施する施設では、判定までの各操作において、どの程度の逸脱まで影響がないかを確認した上で、目視判定では近似法を採用することが望ましいと考えられる。

## 5. 結語

今回、尿蛋白試験紙について、試料の保存温度、反応時間、ぬぐい操作の各要因が反応結果である色調変化に及ぼす影響を調べたところ、有意な影響は認められなかった。目視判定のバラツキに関して調べたところ、色覚認知による個人差は確実に存在するものの、判定方法として近似法の方が切り上げ法に比べてバラツキが小さいことから、より妥当な方法であることが判明した。試験紙法の誤差としては、操作の逸脱による誤差よりも目視判定によるバラツキこそが、リスクとして大きい。

本論文の一部は日本医療検査科学会第54回大会にて発表した。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業等はありません。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、疑似反応結果の目視判定に協力いただいた、つくば国際大学臨床検査学科3、4年生30名の皆様に感謝申し上げます。

## 文献

1) Roche Diagnostics. Compendium of urinalysis: urine test strips and microscopy, Roche Diagnostics; Geneva, 2010;17-33.

2) 日本臨床衛生検査技師会. 一般検査技術教本, 丸善出版;東京, 2017;9-12.

3) Cheryl M, Hayley M. Urinalysis using a test strip. *Br J Nurs* 2019;28:336-340.

4) 伊藤機一, 松尾取二. 臨床検査総論, 第1版, 医学書院;東京, 2013;54-56.

5) 尿試験紙検討委員会. 尿試験紙検査法JCCLS提案指針, 日本臨床検査標準協議会会誌 2001;16:41-42.

6) シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス. エームス尿試験紙たん白質検査用アルブスティックス, 第4版, シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス;東京, 2013.

7) Sharaki O, Abouzeid A, Hossam N, Elsherif Y. Self assessment of pre, intra and post analytical errors of urine analysis in Clinical Chemistry Laboratory of Alexandria Main University Hospital. *Saudi J Health Sci* 2014;3:96-102.

8) NCCLS: Urinalysis and Collection, Transportation and Preservation of Urine Specimens; Approved Guideline (ed2). NCLLS document GP16A, 2001.

9) 尿蛋白測定委員会. 日本腎臓学会腎機能(GFR)・尿蛋白測定委員会報告書, 日本腎臓学会誌 2001;43:1-19.

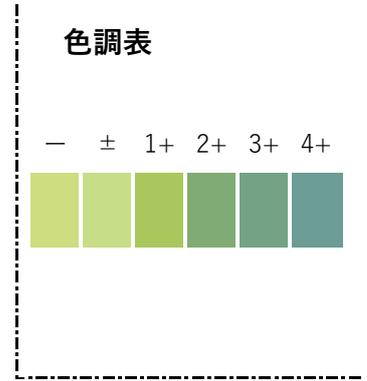
10) Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. Linear Methods for Regression, The Elements of Statistical Learning, Springer; New York, 2001:41-78.

11) 新村秀一. 行列表現による重回帰分析. *オペレーションズ・リサーチ* 1983;28:439-445.

12) Rasband WS. ImageJ, U.S.National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <https://imagej.net/ij/index.html/> [Accessed 4 April 2022].

13) 高木豊, 田村洋子, 三橋太ほか. 試験紙反射率を利用した高値尿検体の迅速定量測定の試み. *医学検査* 2017;66:463-470.

付録



判定	①	②	③	④	⑤
近似法					
切上法					
近似法					
切上法					
近似法					
切上法					
近似法					
切上法					
近似法					
切上法					
近似法					
切上法					
近似法					
切上法					

# COVID-19感染症重症化における 各種炎症性マーカーの比較検討

Comparative study of various inflammatory markers in the severity of COVID-19.

角野忠昭, 石山 進, 小林雅子

**Abstract** CRP, PCT, and IL-6 have been reported as biomarkers that can predict the severity of COVID-19. In this study, we added Presepsin (P-SEP) and Lipopolysaccharide binding protein (LBP). As a result, P-SEP and LBP were significantly higher in moderate I and moderate II than in mild cases, and P-SEP and LBP were significantly higher from the initial stage even in cases that became more severe during the course. It may also be used as a severity assessment and predictor of severity. By understanding and utilizing the characteristics of multiple markers, it is possible to predict the severity of patients with COVID-19, which can lead to appropriate treatment.

**Key words** COVID-19, inflammatory makers, Presepsin, Lipopolysaccharide binding protein

## 1. はじめに

COVID-19は、酸素飽和度や臨床所見から、軽症・中等症Ⅰ・中等症Ⅱ・重症の4つに重症度が分類される。感染し発症しても多くは無症状または軽症のまま経過し、重症化することは少ないが、重症化すると死に至る例もあり、発症時の重症化予測が重要である。これまで、COVID-19の重症化を予測するためのバイオマーカーについて種々報告されているが、特に侵襲性の少ない血液検体を用いたバイオマーカーが、診断や重症化予測の指標として活用されている。COVID-19の重症化に関連するバイオマーカーとして、C-reactive protein(CRP), procalcitonin (PCT), creatine kinase(CK), aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase (ALT), D-dimer, lactate dehydrogenase(LD)などが挙げられる<sup>1)</sup>。中でも、炎症性マーカーであるCRP, PCTやinterleukin-6(IL-6)は、重症化や死亡リスクとの関連性が報告されている<sup>2)3)4)</sup>。我々は、

COVID-19入院患者を対象にこれまでに報告のあったCRP, PCT, IL-6に加え、新たに炎症性バイオマーカーであるPresepsin(P-SEP), Lipopolysaccharide binding protein(LBP)を追加し、重症度判定や重症化予測における有用性について検討した。なお、本研究は金沢市立病院倫理委員会の承認を得た。

## 2. 対象

2020年4月から2021年12月までに入院したCOVID-19患者340例のうち、炎症性マーカーを測定した182例を対象とした。患者背景をTable 1に示す。対象患者は厚生省診療の手引き(第6.0版)に基づき重症度を分類した。

## 3. 方法

### 1) 重症度と各種炎症性マーカーの比較

入院時の血清検体を用いて、P-SEP(パスファーストPresepsin, LSIメディエンス), LBP(ケミルミBRAHMS LBP, SIEMENS), PCT(ケミルミ

Received Jul. 13, 2023; Accepted Sep. 4, 2023  
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, 〒921-8104, 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 COVID-19 Inpatient Background.

入院時診断	軽症 (38 例)	中等症 I (108 例)	中等症 II (34 例)
年齢	45.8±16.0	57.2±17.5	63.9±14.3
性別 (M/F)	25 / 13	57 / 51	23 / 11
血清クレアチニン (mg/dL)	0.81±0.22	1.05±0.59	1.06±0.61 *
推算 GFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	75.03±14.05	67.88±18.71 *	61.87±18.42 *
フェリチン (ng/mL)	242.42±206.54	332.92±370.85	513.19±389.29 *
HbA1c (%)	5.79±0.55	6.17±1.07	6.18±1.10
リンパ球数 (×10 <sup>2</sup> /μL)	12.5±4.6	11.6±4.2	10.7±6.5 *
血小板数 (×10 <sup>4</sup> /μL)	20.3±5.6	20.85±7.14	19.7±10.1
フィブリノゲン (mg/dL)	340.2±81.3	409.6±146.8	460.48±207.3

\* : p&lt;0.05

BRAHMS PCT, SIEMENS), IL-6(ケミルミ IL-6, SIEMENS), CRP(CRP-ラテックス X2「生研」NX, デンカ生研)を測定し、重症度との関連性を検討した。

## 2) 各種炎症性マーカーの重症化予測因子の比較検討

入院時軽症と診断され、軽症のまま治癒した例と、経過中に軽症例から中等症 I または中等症 II へと悪化した例の入院時各炎症性マーカーの値を比較した。同様に、入院時中等症 I または中等症 II と診断され、その後の経過で重症度が高くなった症例についても比較し、これらの炎症性マーカーの重症化予測因子としての有用性も併せて検討した。

## 3) 統計学的有意差検定

IBM SPSS Statistics(IBM)バージョン28を用いて独立したサンプルのt検定を行った。

## 3. 結果

### 1) 入院時重症度と炎症性マーカー

入院時の重症度毎の各種炎症性マーカーの値を Fig. 1 に示す。P-SEP, LBP, IL-6, CRP では、軽症例と比較し、中等症 I, 中等症 II で有意に高値を示した。一方、PCT は重症度が増すと高い傾向が

みられたが、有意な差は認められなかった。

### 2) 重症化予測因子

入院時に軽症と診断され、軽症のまま治癒した例と、経過中に中等症 I または中等症 II へと悪化した症例で、入院時各炎症性マーカーの値を比較した。その結果、いずれの炎症性マーカーでも軽症のまま治癒した例では、低値から高値まで測定値に幅が認められたものの、軽症から中等症 II へと悪化した症例のうち1例で、P-SEP, LBP, CRP, IL-6 で高値傾向を示した (Fig. 2)。同様に、入院時中等症 I または中等症 II と診断され、その後の経過で重症度が高くなった症例も比較したが、P-SEP, PCT, LBP, IL-6, CRP いずれも有意な差は認められなかった。

## 4. 考察

中等症 I 及び II の症例では、軽症例と比較し、P-SEP, LBP, IL-6, CRP のバイオマーカーが有意に高値を示した。IL-6, CRP はこれまでの武漢の報告<sup>2)</sup>や多くのメタ解析<sup>3)</sup>と同様の結果が得られた。LBP は、炎症時にマクロファージから放出された炎症性サイトカインが肝細胞に作用することで産生される急性期蛋白である。主に細菌感染、特に敗血

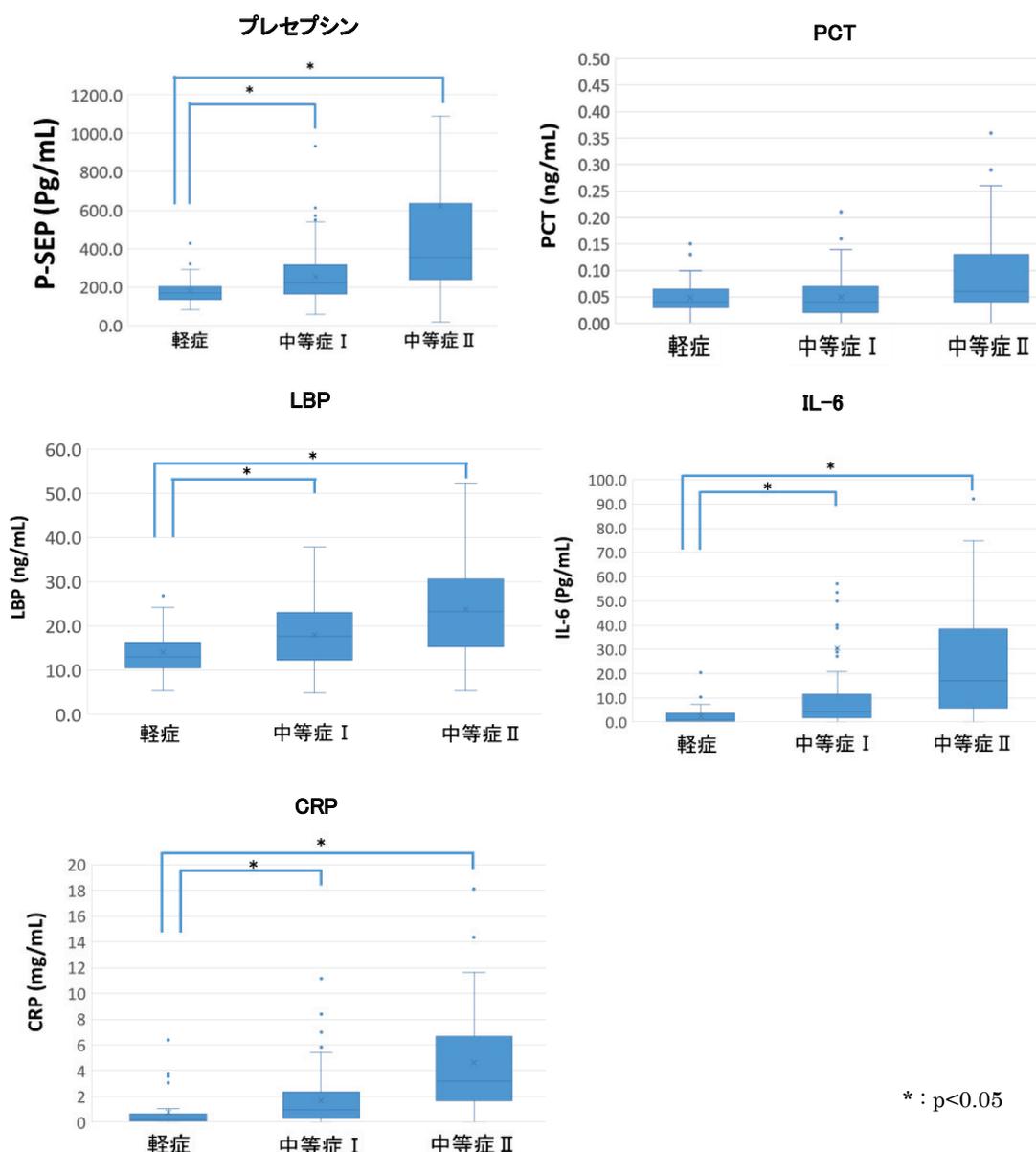


Fig. 1 Biomarker levels and COVID-19 severity. P-SEP, LBP, IL-6, and CRP were significantly higher in moderate I and II than in mild cases.

症で上昇するバイオマーカーとして活用されているが、これまで肺炎と気管支炎の鑑別における有用性や、敗血症時の重症化予測因子などの報告がある<sup>6)7)</sup>。重症の全身性炎症性疾患で、より上昇傾向がみられることから、COVID-19でも軽症例と比較し中等症以上の症例で有意に上昇することが考えられる。P-SEPは感染に伴う菌の貪食により特異的にCD14から産生され、細菌感染で特異的に上昇することが知られており<sup>8)</sup>、非細菌感染による炎症でも上昇する他のバイオマーカーと比べて敗血症診断に有用性

が高いとされている<sup>9)</sup>。今回、Fukuiらの報告<sup>10)</sup>と同様に非細菌性のCOVID-19症例でも上昇し、重症度の高い例でより高値となることが示された。近年、敗血症や細菌感染以外におけるP-SEPの上昇も注目されており、川崎病や重症の全身性エリテマトーデス患者での上昇も報告されている<sup>11)</sup>。COVID-19では凝固異常の合併が知られており、肺における広範な血管内血栓形成が報告されている<sup>12)</sup>。この機序としては好中球や炎症性マクロファージが肺に集積し、炎症性サイトカインが誘導され補体系や血液凝

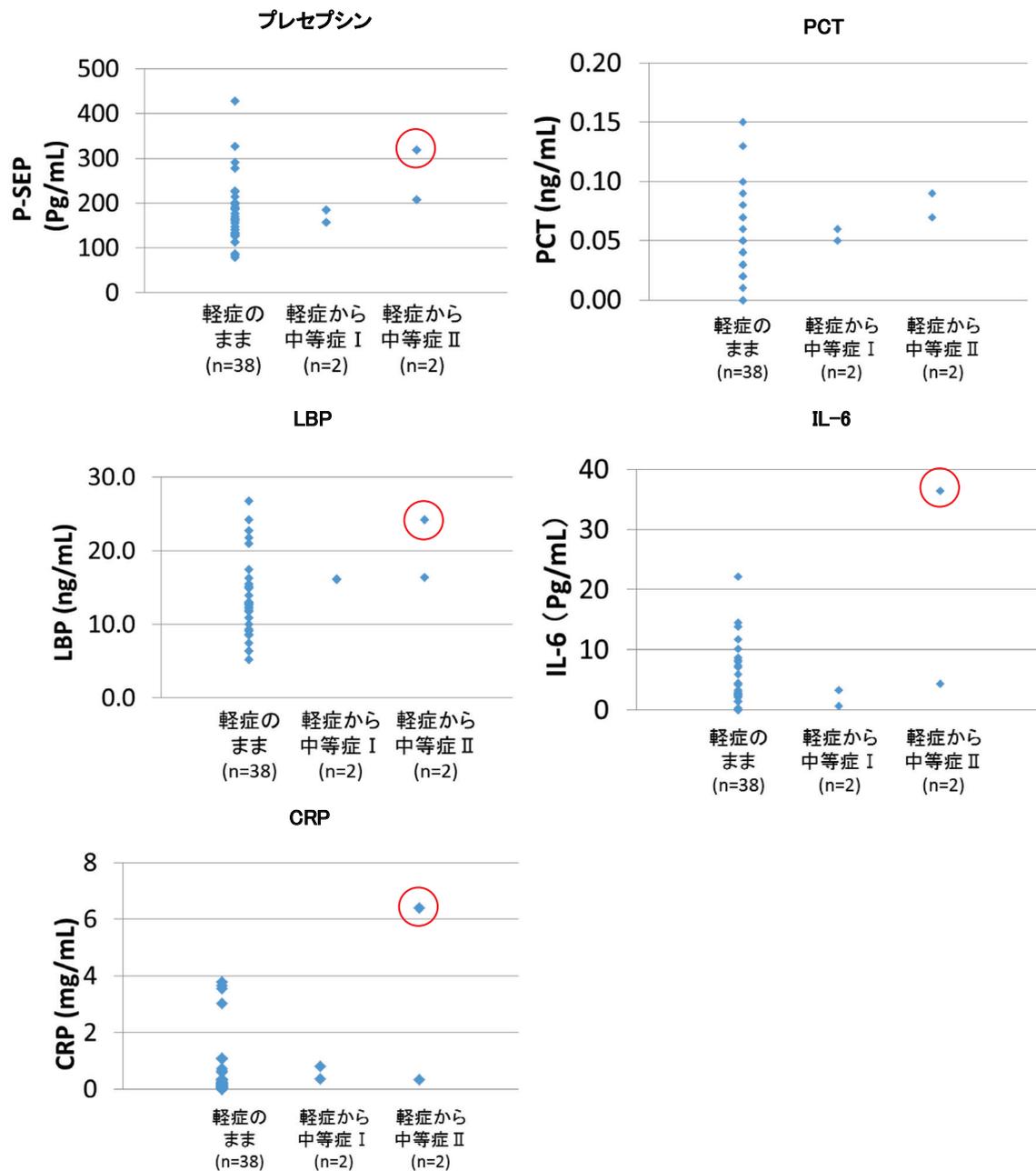


Fig. 2 Severity and various inflammatory markers. In mild cases, both markers were widely distributed from low to high, but in cases where the disease transitioned from mild to moderate II, P-SEP, LBP, IL-6, and CRP were all high.

固系を活性化され血管内血栓形成に至ると考えられている<sup>13)</sup>。P-SEPの産生機序にはneutrophil extracellular traps (NETs)も関与しており<sup>14)</sup>、今回P-SEPが軽症例と比較し中等症 I 以上で有意に高値であった背景には、軽症例と比較し中等症 I・中等症 II で有意にeGFRが高く、腎機能低下による影響があったことが考えられるが、加えて、肺組織内で好中球・血小板複合体が形成されNETsを放出

し、集積した単球・マクロファージ複合体に惹起されP-SEPの産生が亢進した可能性も推察される。また、経過中に重症化する症例では、P-SEP、LBP、CRP、IL-6が初期から高値傾向を示す症例があり、入院時に軽症と診断された場合でも、複数の炎症性マーカーが同時に高値を示した場合、予測因子としても活用できる可能性がある。

## 5. 結語

今回の研究から、P-SEP、LBP、IL-6、CRPは重症度の評価に有用であり、さらに経過中の重症化予測にも有用なマーカーといえる。複数のマーカーの特性を理解し活用することで、COVID-19感染症患者の重症化予測が可能となり、適切な治療に繋げることができる。

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) Malik P, Patel U, Mehta D, et al. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis. *BMJ Evid Based Med* 2021;26:107-108.
- 2) Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020;395:1054-1062.
- 3) AZIZ M, Fatima R, Assaly R. Elevated interleukin-6 is associated with severity of COVID-19: A meta-analysis. *J Med Virol* 2021;93:35-37.
- 4) Laguna-Goya R, Utrero-Rico A, Talayero P, et al. IL-6-based mortality risk model for hospitalized patients with COVID-19. *J Allergy Clin Immunol* 2020;146:799-807.
- 5) Yaegashi Y, Shirakawa K, Sato N, et al. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *J Infect Chemother* 2005;11:234-8.
- 6) Hopstaken RM, L Cals JW, Dinant GJ. Accuracy of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and fibrinogen compared to C-reactive protein (CRP) in differentiating pneumonia from acute bronchitis in primary care. *Prim Care Respir J* 2009;18:227-230.
- 7) Villar J, Perez-Mendez L, Espinosa E, et al. Serum lipopolysaccharide binding protein levels predict severity of lung injury and mortality in patients with severe sepsis. *PLoS One* 2009;4:e6818.
- 8) Reinhart M, Meisner M. Biomarkers in the critically ill patient: procalcitonin. *Crit Care Clin* 2011;27:253-63.
- 9) Takahashi G, Shibata S, Ishikura H, et al. Presepsin in the prognosis of infectious diseases and diagnosis of infectious disseminated intravascular coagulation: a prospective, multicentre, observational study. *Eur J Anaesthesiol* 2015;32:199-206.
- 10) Fukui S, Ikeda K, Kobayashi M, et al. Predictive prognostic biomarkers in patients with COVID-19 infection. *Mol Med Rep* 2023;27(1):15.
- 11) Tanimura S, Fujieda Y, Kono M, et al. Clinical significance of plasma presepsin levels in patients with systemic lupus erythematosus. *MoD Rheumatol* 2018;28:865-71.
- 12) Ackerman M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary vascular endothelialities, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med* 2020;383:120-128.
- 13) Aid M, Busman-Sahey K, Vidal SJ, et al. Vascular disease and thrombosis in SRAS-CoV-2-infected Rhesus macaques. *Cell* 2020;183:1354-1366.
- 14) Ikegame A, Kondo A, Kitaguchi K, et al. Presepsin production in monocyte/macrophage-mediated phagocytosis of neutrophil extracellular traps. *Nature Scientific Reports* 2022;12:5978.

## 質量分析装置 Matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry の 細菌同定における外部精度管理調査報告

External quality control survey report in identification of Microorganism from  
Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

曾川一幸<sup>1)</sup>, 藤永あずみ<sup>2)</sup>, 奥村 元<sup>3)</sup>, 清祐麻紀子<sup>4)</sup>, 村田正太<sup>5)</sup>, 草場耕二<sup>6)</sup>  
上地幸平<sup>7)</sup>, 堀内一樹<sup>8)</sup>, 安田和成<sup>9)</sup>, 村上正巳<sup>10)</sup>, 中山智祥<sup>11)</sup>

**要 旨** Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) 質量分析装置は、2011年に医療機器として認定され、細菌同定のツールとして運用されている。日本医療検査科学会遺伝子・プロテオミクス技術委員会 MALDI-TOF MS ワーキンググループにおいて、同定一致率 (Score Value) で評価する外部精度管理実施要領を作成した。2022年度に実施した第2回 MALDI-TOF MS による細菌同定の外部精度管理調査について報告する。

**Key words** external quality control, identification of microorganism, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

Received Jun. 5, 2023; Accepted Jul. 18, 2023

Kazuyuki SOGAWA<sup>1)</sup>, Azumi FUJINAGA<sup>2)</sup>, Hajime OKUMURA<sup>3)</sup>, Makiko KIYOSUKE<sup>4)</sup>, Syota MURATA<sup>5)</sup>, Koji KUSABA<sup>6)</sup>, Kohei UECHI<sup>7)</sup>, Kazuki HORIUCHI<sup>8)</sup>, Kazunari YASUDA<sup>9)</sup>, Masami MURAKAMI<sup>10)</sup>, Tomohiro NAKAYAMA<sup>11)</sup>

- 1) 麻布大学生命・環境科学部生化学研究室  
Department of Biochemistry, School of Life and Environmental Science, Azabu University  
神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71  
1-17-71 Fuchinobe, chuo-ku, Sagami-hara, Kanagawa, Japan
- 2) ブルカー・ジャパン株式会社  
Bruker Japan K.K.  
神奈川県横浜市神奈川区守屋町 3-9  
3-9, Moriya, Kanagawa-ku, Yokohama-city, Kanagawa, Japan
- 3) ビオメリュー・ジャパン株式会社  
bioMérieux Japan Ltd.  
東京都港区赤坂 2-17-7 赤坂溜池タワー 2F  
Akasaka Tameike Tower 2F, 2-17-7 Akasaka, Minato-ku, Tokyo, Japan
- 4) 九州大学病院検査部  
Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital  
福岡県福岡市東区馬出 3-1-1  
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Japan
- 5) 千葉大学医学部附属病院検査部  
Department of Clinical Laboratory, Chiba University Hospital  
千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1  
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba, Japan

- 6) 佐賀大学医学部附属病院検査部  
Department of Laboratory, Saga university Hospital  
佐賀県佐賀市鍋島 5-1-1  
5-1-1 Nabeshima, Saga-city, Saga, Japan
- 7) 琉球大学病院検査・輸血部  
Department of Clinical Laboratory and Blood Transfusion, University Hospital of the Ryukyus  
沖縄県中頭郡西原町字上原 207  
207 Uehara, Nishihara-cho, Okinawa, Japan
- 8) 信州大学医学部附属病院臨床検査部  
Department of Laboratory Medicine, Shinshu University Hospital  
長野県松本市旭 3-1-1  
3-1-1 Asahi, Matsumoto, Japan
- 9) 三重大学医学部附属病院中央検査部  
Clinical Laboratory, Mie University Hospital  
三重県津市江戸橋 2-174  
2-174 Edobashi, Tsu, Mie 514-8507 Japan
- 10) 群馬大学医学部附属病院検査部  
Clinical Laboratory Center, Gunma University Hospital  
群馬県前橋市昭和町 3-39-15  
39-15, Showa-cho, Maebashi, Gunma, Japan
- 11) 日本大学医学部病態病理学系臨床検査医学分野  
Division of Laboratory Medicine, Department of Pathology and Microbiology, Nihon University School of Medicine  
東京都板橋区大谷口上町 30-1  
30-1, Ooyaguchi-kamimachi, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

Corresponding Author : 曾川一幸  
TEL: 042-754-7111 (内線 2372)  
E-mail: sogawa@azabu-u.ac.jp

## 1. はじめに

質量分析装置による細菌同定はサンプル調整が容易で、測定操作も簡便であり、一菌種約5分で同定結果が得られる<sup>1,2)</sup>。この特徴を活かして、煩雑な試料前処理を行わず、属や種を容易に識別することのできる手法として注目されている<sup>3-8)</sup>。国内では2011年に医療機器として認定され、細菌同定のツールとして運用されている。

2017年6月に検体検査の品質・精度確保に関する医療法等改正法案が可決・公布され、それに伴い改正された厚生労働省令（医療法施行規則、臨検法施行規則）が2018年7月に公布、同年12月1日に施行された<sup>9)</sup>。この改正により、臨床検査を実施している施設には精度管理の法的基準が導入されることとなった。

2017年4月にClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)において、「M58: Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry」が作成され、Quality ControlやWithin-Run Calibration等の品質保証に関する推奨事項が記載されている。

近年、微生物検査室を含む臨床検査室認定の国際規格「ISO 15189」（ISO: International Organization for Standardization, 国際標準化機構）の認定を取得する施設が増加している<sup>10)</sup>。微生物検査は、測定対象が微生物であるため、菌株、市販生培地、測定方法で変動が生じやすいという特徴がある。内部精度管理として、菌株はEscherichia coliを使用している施設が多い<sup>10)</sup>が、Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)の質量の校正として使用するため不适当である。市販生培地の種類による影響は、最終的な細菌同定結果には支障がないが<sup>11)</sup>、同定率 (Score Value) に影響がある。日本医療検査科学会遺伝子・プロテオミクス技術委員会MALDI-TOF MSワーキンググループにおいて、日常業務に適したMALDI-TOF MSによる細菌同定における内部精度管理の実施要領を作成した<sup>12,13)</sup>。

外部精度管理調査には、一般社団法人日本臨床衛生検査技師会（日臨技）や都道府県の臨床検査技師会が実施する外部精度管理調査と試薬機器メーカーが主催するユーザーサーベイがある。しかしながら、質量分析装置による細菌同定の外部精度管理調査は小規模でしか行われていない。日本医療検査科学会遺伝子・プロテオミクス技術委員会MALDI-TOF

MSワーキンググループにおいて、MALDI-TOF MSによる細菌同定における外部精度管理調査の実施要領を作成した<sup>14,15)</sup>。

今回我々は質量分析装置による細菌同定の外部精度管理調査について、同定一致率 (Score Value) で評価する実施要領に基づいて228施設で行ったので報告する。

## 2. 材料および方法

### 1) 対象菌株と菌株の培養法

使用する株はATCC® (American Type Culture Collection) から購入した*Enterococcus faecium* (ATCC 8459)と*Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637)を対象とした。

菌株配送元施設（1世代目の送付：麻布大学）にて標準菌株のペレットを溶解し、血液寒天培地に接種して一晚培養した。マイクロバンクに血液寒天培地上のコロニーを濃厚接種し、接種日、菌種、ATCC番号をラベリングし、宅急便で228施設に配布した。マイクロバンクは到着後-80℃で保管した。

菌株配送先施設（2世代目の作成）にてマイクロバンクから自施設で使用している血液寒天培地に接種し、18~24時間35℃で好気培養した。

### 2) 測定機器

ブルカージャパン株式会社のMALDI Biotyper, MALDI Biotyper smart, MALDI Biotyper siriusおよびMALDI Biotyper Sirius one, ピオメリユー・ジャパン株式会社のVITEK MSを使用した。得られたマススペクトルをブルカージャパン株式会社はMALDI Biotyper ver3.1もしくはMBT Compass ver4.1, ピオメリユー・ジャパン株式会社はIVD KB v3.0およびv3.2の専用解析ソフトで同定を行った。

### 3) 使用試薬

MALDI Biotyperの測定には、HCCA portioned 試薬（ブルカージャパン株式会社）、VITEK MSの測定にはMS-CHCAマトリックス試薬（ピオメリユー・ジャパン株式会社）を使用した。

### 4) 測定方法

血液寒天上のコロニーを適量かきとり、ターゲットプレートのスポットに薄く均一になるように塗布後、専用のマトリックス試薬を1・L添加し、十分に乾燥した後測定を行った。1菌種、血液寒天培地1種類につき、ターゲットプレートに3スポット接種して同時に測定した。

### 5) 測定・データ回収期間

2022年12月26日から2023年2月28日。

6) 同定一致率・同定確率の算出について

同定一致率は各MALDI-TOF MSの測定で菌種名が得られた割合とし、ブルカージャパン株式会社は信頼性の指標である Score Value を用い、菌種レベルの同定は2.000~3.000である。Score Value において、属レベルの同定は1.700~1.999、同定不可は0.000~1.699と数値で表示される<sup>7,8)</sup>。また、ピオメリユー・ジャパン株式会社は信頼性の指標である同定確率を用い、同定菌種名が1菌種であり、同定確率99.9%とされるものが菌種レベルの同定とした。

7) 判定基準

MALDI Biotyperは信頼性の指標である Score Value、VITEK MSは信頼性の指標である同定確率を用い、平均値と標準偏差 (SD) を算出した。

判定基準として、Aは菌種の同定がされており平均値±2SD、Bは菌種の同定がされており平均値-2SD以下、Dは1スポット以上で菌種の同定がされていない。

3. 成績

*E. faecium* と *S. maltophilia* において、185施設でMALDI Biotyper、43施設でVITEK MSで測定・同定した。

MALDI Biotyperの185施設は血液寒天培地で発育した*E. faecium* と *S. maltophilia* のコロニーを同定したところ、信頼性の指標である Score Value (3スポットを平均した値) は、*E. faecium* において平均値は2.43、最大値2.58、最小値2.06であり、SDは0.08となり、8施設で平均値±2SD (2.27~2.59) の範囲外であった。1施設において、3スポットのうち1スポットでScore Valueは、1.76であり同定不可であった (Table 1, 3)。*S. maltophilia* において平均値は2.38、最大値2.56、最小値2.06であり、SDは0.09となり、3施設で平均値±2SD (2.20~2.56) の範囲外であった (Table 1, 3)。

MALDI Biotyperの測定機器は、MALDI Biotyperで143施設、MALDI Biotyper smartで10

Table 1 Evaluation by MALDI Biotyper and VITEK MS

Bacterial strain	Rating		
	A (Average ± 2SD)	B (Below average - 2SD)	D (Not identification)
<b><i>Enterococcus faecium</i></b>			
MALDI Biotyper	177	7	1
VITEK MS	42	0	1
<b><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>			
MALDI Biotyper	182	3	0
VITEK MS	43	0	0

Table 2 MALDI Biotyper score values for different device and bacteria

MALDI-TOF MS	Number of facilities	Score rate			
		Average	Standard deviation	Minimum value	Maximum value
<b><i>Enterococcus faecium</i></b>					
MALDI Biotyper	143	2.43	0.07	2.14	2.58
MALDI Biotyper smart	10	2.36	0.12	2.06	2.52
MALDI Biotyper sirius	23	2.42	0.08	2.15	2.51
MALDI Biotyper sirius one	9	2.40	0.06	2.27	2.48
<b><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>					
MALDI Biotyper	143	2.38	0.09	2.06	2.56
MALDI Biotyper smart	10	2.38	0.05	2.29	2.44
MALDI Biotyper sirius	23	2.37	0.08	2.21	2.47
MALDI Biotyper sirius one	9	2.33	0.09	2.14	2.46

**Table 3** MALDI Biotyper and VITEK MS score values for different database and bacteria

Database	Number of facilities	Score rate			
		Average	Standard deviation	Minimum value	Maximum value
<b><i>Enterococcus faecium</i></b>					
MALDI Biotyper	185	2.43	0.08	2.06	2.58
Version 4 (5627)	1	2.18	-	-	-
Version 5 (5989)	4	2.39	0.03	2.34	2.43
Version 6 (6903)	5	2.43	0.11	2.21	2.54
Version 7 (7311)	6	2.42	0.09	2.24	2.52
Version 8 (7854)	26	2.43	0.05	2.35	2.52
Version 9 (8468)	59	2.43	0.08	2.06	2.55
Version 10 (9607)	39	2.42	0.09	2.14	2.58
Version 11 (10833)	45	2.43	0.06	2.28	2.54
VITEK MS	43	99.9 %	0.00 %	99.9 %	99.9 %
IVD Knowledge Base 3.0	6	99.9 %	0.00 %	99.9 %	99.9 %
IVD Knowledge Base 3.2	37	99.9 %	0.00 %	99.9 %	99.9 %
<b><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>					
MALDI Biotyper	185	2.38	0.09	2.06	2.56
Version 4 (5627)	1	2.17	-	-	-
Version 5 (5989)	4	2.42	0.09	2.31	2.51
Version 6 (6903)	5	2.37	0.14	2.08	2.45
Version 7 (7311)	6	2.41	0.06	2.33	2.5
Version 8 (7854)	26	2.38	0.08	2.21	2.52
Version 9 (8468)	59	2.39	0.08	2.18	2.56
Version 10 (9607)	39	2.37	0.08	2.21	2.53
Version 11 (10833)	45	2.37	0.09	2.06	2.49
VITEK MS	43	99.9 %	0.00 %	99.9 %	99.9 %
IVD Knowledge Base 3.0	6	99.9 %	0.00 %	99.9 %	99.9 %
IVD Knowledge Base 3.2	37	99.9 %	0.00 %	99.9 %	99.9 %

施設, MALDI Biotyper siriusで23施設, MALDI Biotyper Sirius oneで9施設使用している。*E. faecium*のScore Valueは, MALDI Biotyperで2.43 ± 0.07, MALDI Biotyper smartで2.36 ± 0.12, MALDI Biotyper siriusで2.42 ± 0.08, MALDI Biotyper Sirius oneで2.40 ± 0.06であった (Table 2)。*S. maltophilia*のScore Valueは, MALDI Biotyperで2.38 ± 0.09, MALDI Biotyper smartで2.38 ± 0.05, MALDI Biotyper siriusで2.37 ± 0.08, MALDI Biotyper Sirius oneで2.33 ± 0.09であった (Table 2)。

MALDI Biotyperのデータベースは, Version 4で1施設, Version 5で4施設, MALDI Version 6で5施設, Version 7で6施設, Version 8で26施設, Version 9で59施設, Version 10で39施設, Version 11で45施設使用している (Table 2)。*E. faecium*のScore Valueは, Version 4で2.18,

Version 5で2.39 ± 0.03, Version 6で2.43 ± 0.11, Version 7で2.42 ± 0.09, Version 8で2.43 ± 0.05, Version 9で2.43 ± 0.08, Version 10で2.42 ± 0.09, Version 11で2.43 ± 0.06であった (Table 2)。*S. maltophilia*のScore Valueは, Version 4で2.17, Version 5で2.42 ± 0.09, Version 6で2.37 ± 0.14, Version 7で2.41 ± 0.06, Version 8で2.38 ± 0.08, Version 9で2.39 ± 0.08, Version 10で2.37 ± 0.08, Version 11で2.37 ± 0.09であった (Table 2)。

VITEK MS/PRIMEの43施設は血液寒天培地で発育した*E. faecium*と*S. maltophilia*のコロニーを同定したところ, 信頼性の指標である同定確率 (3スポットを平均した値) は, *E. faecium*において平均値は99.9, 最大値99.9, 最小値99.9であり, SDは0.00となり, 42施設で平均値 ± 2SD (99.9) であった。1施設は同定確率99.9%で*E. faecalis*と報告した施設があった。これは報告時に菌種名を誤って記入し

ており実際の測定では *E. faecium* 99.9% と同定されていることが確認されている (Table 1, 3)。 *S. maltophilia* において平均値は 99.9, 最大値 99.9, 最小値 99.9 であり, SD は 0.0 となり, 43 施設すべてで平均値  $\pm 2SD$  (99.9) であった (Table 1, 3)。

#### 4. 考察・結語

患者診療において, 検体検査の結果は, 診断の確定と治療方針の決定を左右する。このため, その検査システムの精度保証・精度管理は極めて重要である。国内における微生物検査ならびにその内部精度管理は主に米国の臨床検査標準協会の基準をもとに実施されている。微生物検査の内部精度管理の実施状況について 2017 年に一般社団法人日本病院会が実施した調査では, 一般・生化学検査や血液学検査については 9 割以上の施設が内部精度管理を実施しているのに対し, 微生物検査では 54.8% とその半数ほどの施設でしか内部精度管理を実施していなかった<sup>16)</sup>。また, 外部精度管理については, 一般・生化学検査や血液学検査は 98.0% 以上の施設が実施しているが, 微生物検査では 90.4% と低い実施状況である<sup>14)</sup>。質量分析装置による細菌同定の外部精度管理は評価法が標準化されていない。日本医療検査科学会遺伝子・プロテオミクス技術委員会 MALDI-TOF MS ワーキンググループにおいて, 質量分析装置による細菌同定の外部精度管理調査について, 同定一致率 (Score Value) で評価する実施要領を作成した<sup>14, 15)</sup>。

標準菌株は, 構造上ペプチドグリカン層が薄くリポソーム由来タンパクがイオン化されやすいグラム陰性桿菌の *S. maltophilia*<sup>17)</sup> 及び細胞壁に厚みがあり構造が頑丈のためリポソーム由来タンパクがイオン化されにくいグラム陽性球菌の *E. faecium*<sup>17)</sup> を用いた。

MALDI Biotyper の施設において, 判定 B の同定一致率 (Score Value) が平均値  $\pm 2SD$  の範囲外は *S. maltophilia* において 3 施設, *E. faecium* において 7 施設であった。 *S. maltophilia* の 1 施設と *E. faecium* の 1 施設は, 3 スポットの CV が 10.0% 以上と高く, ターゲットプレートのスポットにコロニーが薄く均一に塗布されていないことが示唆される。この要因は測定者の技量により影響する。微生物検査は自動分析装置による検査だけではなく, 塗抹検査や検体分離操作, コロニーの観察と釣菌, 同定検査や薬剤感受性検査のための菌液調整など, 検体受付から報告までの一連の工程において検査技師の手技が多く入る検査である<sup>18)</sup>。検査技師の技能によって検査結

果に影響が出る可能性があるため, 外部精度管理の対象には機器だけではなく, 検査室のスタッフの技能も含むことが重要である。 *S. maltophilia* の 6 施設と *E. faecium* の 2 施設は, ファインチューニングが 1 年以上行われていない。ファインチューニングの期間はブルカー・ジャパン株式会社の MALDI Biotyper で 6 か月~1 年, ビオメリュー・ジャパン株式会社の VITEK MS で約 2500 検体と推奨期間が定められている。

2022 年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書の微生物検査において, *Haemophilus influenzae* と *Klebsiella pneumoniae* の同定検査サーベイが実施され, MALDI Biotyper と VITEK MS の同定正解率は 100% であり, 機器間差はないことが示されている。本調査においても *S. maltophilia* と *E. faecium* の同定検査において, MALDI Biotyper と VITEK MS の同定正解率はほぼ 100% であり, 同様の結果が得られた。

MALDI Biotyper の測定機器は, MALDI Biotyper, MALDI Biotyper smart, MALDI Biotyper sirius, MALDI Biotyper Sirius one の 4 機種を使用しているが, 同定一致率 (Score Value) に有意な違いは認められなかった。また, MALDI Biotyper のデータベースは, Version 4, Version 5, Version 6, Version 7, Version 8, Version 9, Version 10, Version 11 の 8 種類を使用しているが, 同定一致率 (Score Value) に有意な違いは認められなかった。

VITEK MS の 43 施設において, *E. faecium* および *S. maltophilia* の同定確率は全ての施設で 99.9% であった。同定確率に全くバラつきがなかったため, VITEK MS の精度管理に有効な菌株の選定が必要である。

第 1 回 MALDI-TOF MS による細菌同定の外部精度管理調査は, 測定を行う直前に質量分析装置のファインチューニングを行い, 質量分析装置の状態を一定にし, 血液寒天培地の種類により影響を考慮し, 1 種類に限定して行った。第 2 回 MALDI-TOF MS による細菌同定の外部精度管理調査は, ファインチューニングを行わずに, 血液寒天培地も自施設の培地を使用し, より日常検査に近い条件で行った。日常検査に近い条件においても菌種同定は MALDI Biotyper で Score Value および VITEK MS の同定確率はほぼすべて平均値  $\pm 2SD$  の範囲内で種レベルの同定ができた。今回作成した実施要領に従い外部精度管理の評価法を同定一致率 (Score Value) で行うことは有用であった。今後, VITEK MS の

精度管理に有効な菌株の選定を行い、MALDI-TOF MSによる細菌同定の外部精度管理実施要領を用いて、関連学会と連携して行っていく予定である。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

## 文献

- 1) Freiwald A, Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Prot* 2009;4:732-742.
- 2) Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009;49:543-551.
- 3) van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper Ed J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J Clin Microbiol* 2010;48:900-907.
- 4) Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol* 2010;48:1549-1554.
- 5) De Bel A, Wybo I, Piérard D, et al. Correct Implementation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Routine Clinical Microbiology. *J Clin Microbiol* 2010;48:1991-1992.
- 6) Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:74-82.
- 7) Sogawa K, Watanabe M, Sato K, et al. Use of the MALDI BioTyper™ system with MALDI-TOF mass spectrometry for the rapid identification of microorganisms. *Anal Bioanal Chem* 2011;400:1905-1911.
- 8) Sogawa K, Watanabe M, Sato K, et al. Rapid identification of microorganisms by mass spectrometry: improved performance by incorporation of in-house spectral data into a commercial database. *Anal Bioanal Chem* 2012;403:1811-1822.
- 9) 西山宏幸. 微生物学的検査. *Medical Technology* 2018;46:1280-1288.
- 10) Akimowicz M, Bucka-Kolendo J. MALDI-TOF MS - application in food microbiology. *Acta Biochim Pol* 2020;67:327-332.
- 11) Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, et al. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:58-64.
- 12) 曾川一幸, 清祐麻紀子, 服部佳奈子, 村田正太, 渡智久, 奥村元, 関口幸恵, 藤永あずみ, 中山智祥. 質量分析装置Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometryの細菌同定における内部精度管理実施要領の検討. *医療検査と自動化* 2020;45:255-259.
- 13) Sogawa K, Kiyosuke M, Hattori K, et al. Examination of conditions for regular internal quality control in identification of microorganisms using MALDI-TOF MS. *Biocontrol Sci* 2021;26:99-104.
- 14) 曾川一幸, 上地幸平, 清祐麻紀子, 村田正太, 草場耕二, 佐伯裕二, 堀内一樹, 安田和成, 奥村元, 藤永あずみ, 村上正巳. 質量分析装置Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometryの細菌同定における外部精度管理実施要領の検討. *医療検査と自動化* 2022;47:569-575.
- 15) Sogawa K, Uechi K, Kiyosuke M, Murata S, Kusaba K, Saeki Y, Horiuchi K, Yasuda K, Okumura H, Fujinaga A, Murakami M. Examination of conditions for external quality control in identification of microorganisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biocontrol Sci* 2022;27:179-184.
- 16) 日本病院会医療制度委員会. 検体検査・精度管理の状況に関する緊急調査－集計結果 平成29年6月. 2017. ([https://www.hospital.or.jp/pdf/06\\_20170628=01.pdf](https://www.hospital.or.jp/pdf/06_20170628=01.pdf))
- 17) 山下剛永. MALDI-TOF MSによる菌同定向上法 (Matrix sandwich method). *JSBMS Letters* 2017;42:45-48.
- 18) 濱本隆明. 微生物検査の精度管理. *臨床検査* 2020;64:995-1001.

## 2ステップサンドイッチ法による 高感度エストラジオール測定試薬の基礎的検討

Fundamental study of high sensitivity estradiol measurement reagent  
by two-step sandwich method

八木道隆, 阿部正樹, 俵木美幸, 中田瞳美

**要旨** 化学発光酵素免疫測定 (CLEIA) 法を原理とする分析装置 AIA-CL1200 [東ソー (株)] を用いて、新規に開発された2ステップサンドイッチ法による高感度エストラジオール測定試薬 AIA-パック CL hs-E2 [東ソー (株)] の基礎的検討を行った。検討の結果、再現性、直線性、共存物質の影響、現行法との相関関係について良好であった。また、エストロン、エストリオール、プロゲステロン、テストステロンとの交叉反応性が低く、エストラジオールに対する特異性が高いと考えられた。定量限界 (LOQ) は、20%CV で1.02 pg/mLであり、現行法と比較して大幅な感度の向上が確認できたため、高感度測定が要求される卵巣機能低下症の診断や不妊治療などの日常診療に特に有用であることが示唆された。

**Key words** estradiol, E2, two-step sandwich method, high sensitivity, CLEIA

### 1. はじめに

エストラジオール (Estradiol:E2) は、主に女性の卵巣から産生・分泌される性ステロイドホルモンであるエストロゲンの一種であり、エストロゲンの中で最も生物活性が高く、プロゲステロンとともに卵巣機能をよく反映することからその測定は臨床で広く用いられている<sup>1)</sup>。不妊治療の際には、排卵時期の決定やヒト絨毛性ゴナドトロピンによる排卵誘発時のモニタリングの指標となる。また更年期では、卵巣機能の低下や機能不全が更年期症状の発症に大きく関与しており、婦人科領域では、診断と治療にE2の測定が多用されている<sup>2)3)</sup>。さらに、小児科領域における血中E2測定の意義としては、思春期発来異常と卵巣機能の評価、エストラジオール製剤の治療効果の判定、エストロゲン産生過剰の診断が挙げられる<sup>4)</sup>。

現在広く用いられているディレイ1ステップ競合

法を応用した電気化学発光免疫測定 (ECLIA) 法やCLEIA法でのLOQは、25~30 pg/mL程度であり、閉経後女性のE2値 (10~20 pg/mL以下)<sup>5)</sup>や女兒のE2値 (8~10歳で4~31 pg/mL以下)<sup>6)</sup>を正確に測定することが出来なかった。E2の高感度測定法としてRIA法<sup>7)</sup>、HPLC-RIA法<sup>8)</sup>などが報告されているが、反応時間の長さや前処理の煩雑さから検体の大量処理には適さない。

今回、新たに2ステップサンドイッチ法を原理とする高感度E2測定試薬AIA-パックCL hs-E2が開発され、有用性の検討を行ったので報告する。

### 2. 対象

対象検体として、当院検査部にE2の測定依頼があり残検体の研究利用に同意が得られている患者血清を用いた。本検討については、東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を得て実施した [審査番号: 31-136(9635)]。

Received May 9, 2023; Accepted Jul. 5, 2023  
Michitaka YAGI, Masaki ABE, Miyuki HYOKI,  
Hitomi NAKADA  
東京慈恵会医科大学附属第三病院 中央検査部  
Central Clinical Laboratory, the Jikei University Daisan  
Hospital

〒201-8601 東京都狛江市和泉本町4-11-1  
4-11-1, Izumihoncho, Komae-shi, Tokyo, 〒201-8601, Japan  
Corresponding author: Michitaka YAGI  
TEL: 03-3430-8686  
E-mail: m.yagi@jikei.ac.jp

### 3. 方法

検討機器として、全自動化学発光酵素免疫測定装置 AIA-CL1200（以下、AIA-CL1200）を用いた。検討試薬は、新規で開発されたAIA-パックCL hs-E2を用いた。比較に用いた測定試薬は、1ステップ競合法を原理としたAIA-パックCLエストラジオール [東ソー(株)] およびエクルーシス試薬 E2IV [ロシュ・ダイアグノスティクス(株)] である。

基礎的検討として、以下の内容を行った。

#### 1) 再現性

併行精度として3濃度の患者プール血清を用い、10回連続測定を行った。また、室内再現精度として等量分注した3濃度の患者プール血清を-30℃で凍結保存し、測定当日に解凍し10日間連続測定を行った。

#### 2) 希釈直線性

3濃度の患者血清について専用希釈液を用いて希釈系列を作成し、各3重測定を行った。

#### 3) 共存物質の影響

シスメックス社製の干渉チェックAプラスおよびRFプラスを用いて共存物質の影響について検討した。

#### 4) 定量限界

エストラジオール低濃度血清を5日間2重測定してLOQを求めた。

#### 5) 相関関係

AIA-パックCL hs-E2とAIA-パックCL エストラジオールならびにエクルーシス試薬E2IVとの相関関係を103名の患者血清を対象として求めた。

#### 6) 交叉反応性

薬剤の影響について検討するため、エストロン

(Estrone:E1), エストリオール (Estriol:E3) は1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調整し、プロゲステロン、テストステロンは10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調整した試料をAIA-パックCL hs-E2で測定した。

### 4. 測定原理

本試薬の測定原理は、2種類のモノクローナル抗体を用いた2ステップサンドイッチCLEIA法である (Fig. 1)。本試薬においてサンドイッチ法によるE2測定が可能になった理由は、免疫複合体を認識する抗E2免疫複合体マウスモノクローナル抗体が開発されたためである。反応試薬の試薬カップには2つのセル [セル(1), セル(2)] があり、セル(1)には磁性微粒子に固定化された抗E2ウサギモノクローナル抗体を含む凍結乾燥体が、セル(2)にはアルカリ性ホスファターゼが標識された抗E2免疫複合体マウスモノクローナル抗体の凍結乾燥体が封入されている。この試薬カップのセル(1)に分注水と検体を、セル(2)には分注水を加え、それぞれ凍結乾燥試薬を溶解する。検体が注入されたセル(1)においては凍結乾燥試薬が溶解すると同時に第一反応が開始する。一定時間、一定温度でインキュベートした後、洗浄水で洗浄することにより、未反応の検体成分を除去する (B/F分離)。B/F分離後、セル(2)の内容物を一定量、セル(1)に移すことにより第二反応が開始される。一定時間、一定温度でインキュベートした後、洗浄水で洗浄することにより、未反応の酵素標識抗体を除去する (B/F分離)。B/F分離後、磁性微粒子に結合した酵素活性を測定するために基質としてDIFURAT (3-(5-tert-ブチル-4,4-ジメチル-2,6,7-トリオキサビシクロ [3,2,0] ヘプト-1-イル) フェニルリン酸エステル ジナトリウム塩) を添加し、酵

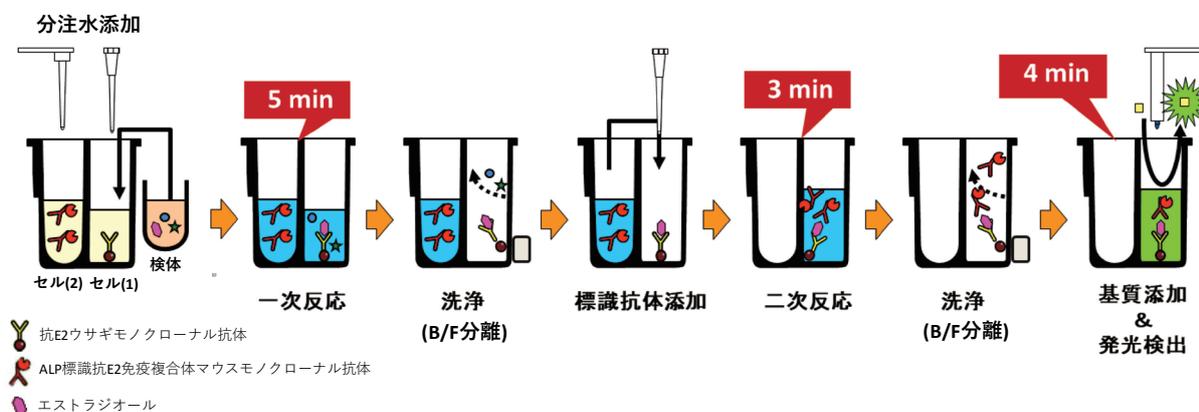


Fig. 1 Measuring principle

Table 1 Precision

hs-E2(pg/mL) Pool serum(n=10)	Within-run reproducibility			Between-day reproducibility		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High
Mean	42.7	331.4	1290.5	43.1	329.8	1251.2
SD	1.49	11.96	19.52	1.05	6.21	17.41
CV%	3.5	3.6	1.5	2.4	1.9	1.4

素による分解で得られる発光強度を測定することにより、検体中のE2濃度を知ることができる。

## 5. 結果

### 1) 再現性

併行精度はCV1.5~3.6 %であり、室内再現精度はCV1.4~2.4 %であった (Table 1)。

### 2) 希釈直線性

測定範囲である2,000 pg/mLまで直線性が認められた (Fig. 2)。

### 3) 共存物質の影響

遊離型ビリルビン20.8 mg/dL, 抱合型ビリルビン12.4 mg/dL, 溶血ヘモグロビン500 mg/dL, 乳び1,730 FTU, リウマチ因子500 IU/mLまで影響が認められなかった (Fig. 3)。

### 4) 定量限界

LOQを求めた結果、AIA-パックCL hs-E2は20%CVで1.02 pg/mLであった。現行法であるAIA-パックCL エストラジオールは20%CVで18.45 pg/mL, エクルーシス試薬E2IVは20%CVで20.06 pg/mLであった (Fig. 4)。

### 5) 相関関係

AIA-パックCL エストラジオールとの相関は  $r = 0.986$ ,  $y = 0.96x + 8.8$  であった。また、エクルーシス試薬E2IVとの相関は  $r = 0.989$ ,  $y = 0.90x - 11.2$  であった (Fig. 5)。

### 6) 交叉反応性

E1 (エストロン), E3 (エストリオール), プロゲステロン, テストステロンとの交叉反応性は全て0.1 %以下であった (Table 2)。

## 6. 考察

2ステップサンドイッチ測定法を原理とするAIA-パックCL hs-E2の基礎的検討を実施した。その結果、併行精度、室内再現精度ともに良好で、測定上限である2,000 pg/mLまで直線性が認められた。なお、共存物質の影響も良好な結果であったが、抱

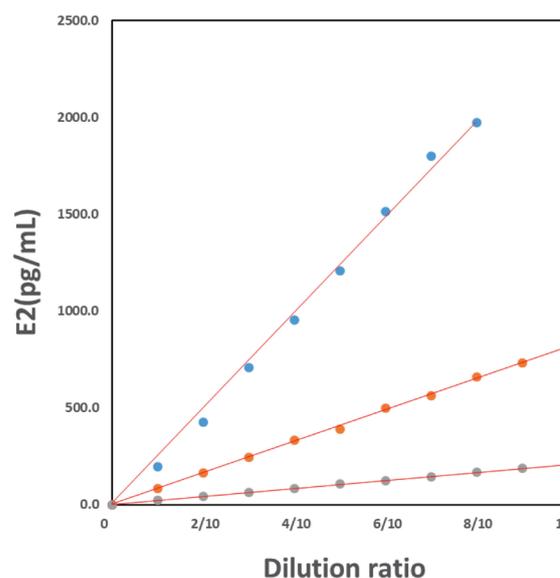


Fig. 2 Dilution linearity

合型ビリルビンの添加濃度上昇に伴って測定値が若干の低値傾向を示した。また、今回の検討で得られたLOQは、CV20%となるE2値が1.02 pg/mLであった。現行法であるAIA-パックCL エストラジオールは、20%CVで18.45 pg/mL, エクルーシス試薬E2IVは、20%CVで20.06 pg/mLであったことから、現行法と比較して、低濃度域における大幅な感度向上が確認できた。閉経後女性のE2値や女兒のE2値などは、現行法では感度以下となるケースがあったが、本試薬では測定できることが示された。サンドイッチ法である本法が競合法と比較して高感度になった理由は以下のことが考えられる。競合法では低濃度検体のシグナルのバラツキが生じた場合、サンドイッチ法に比して最終的な濃度換算が過大評価されやすい傾向がある。さらに、競合法における感度下限付近の低濃度の反応液中では、酵素標識抗原が相当量固定化抗体と反応しているため、

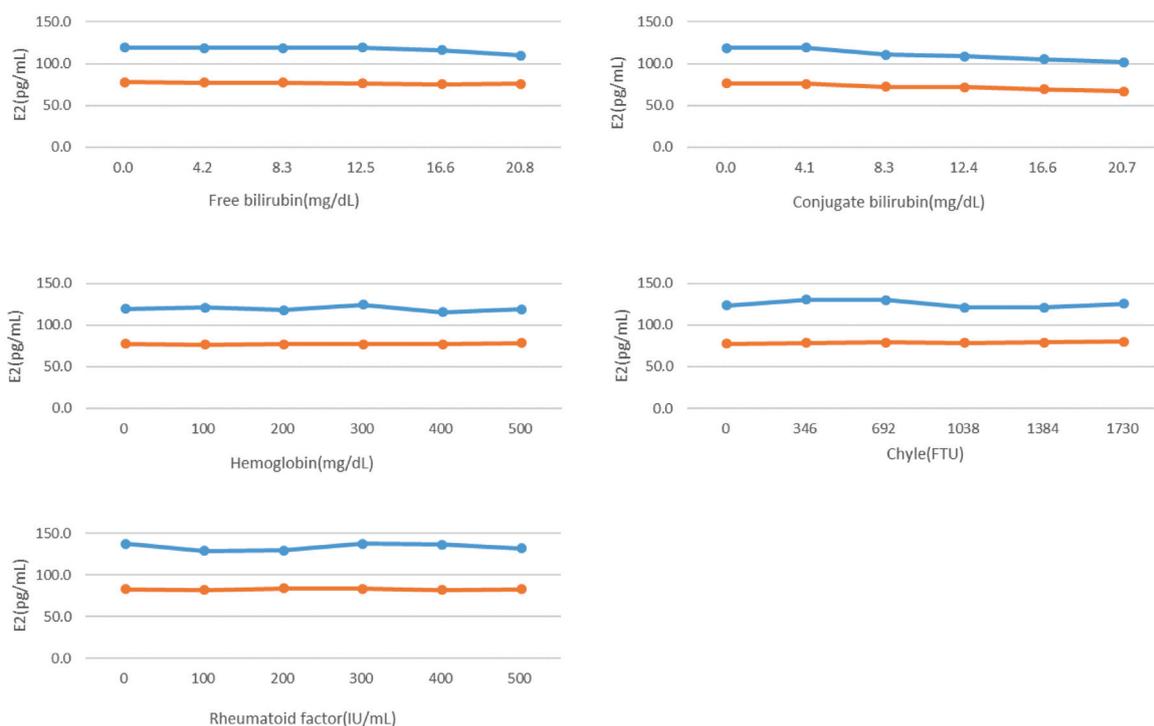


Fig. 3 Effects of interfering substances

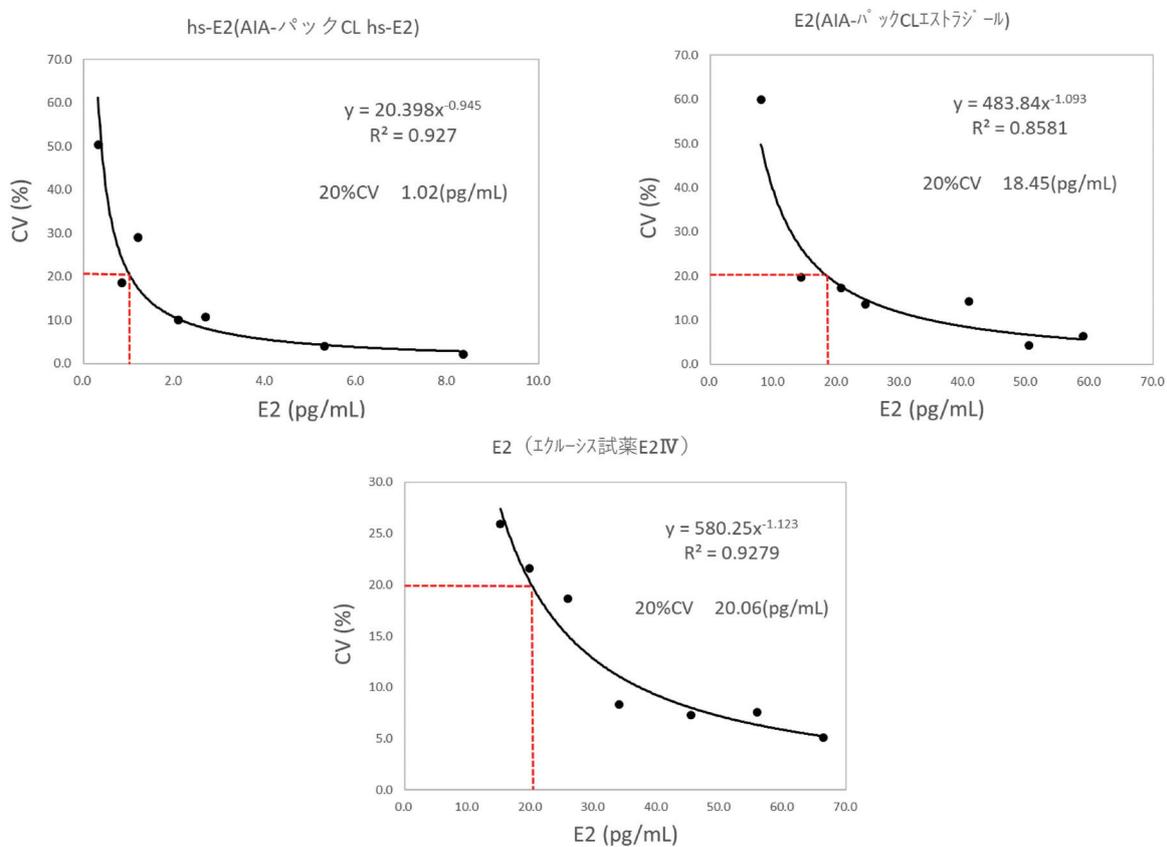


Fig. 4 Limit of quantification (LOQ)

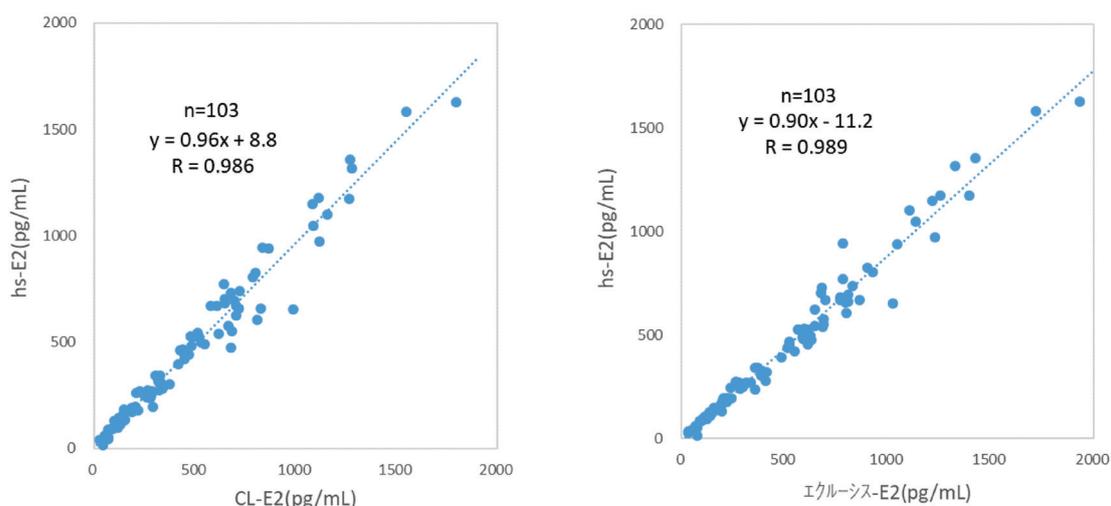


Fig. 5 Evaluation of correlation

反応基質の酵素分解によるシグナルが相当量発生する。そこには溶液分注、発色量などのバラツキが生じやすい。これらの理由により感度差が生じたものと考えられる。

近年、従来競合法でのみ測定可能であったアルドステロン測定において、本法同様にサンドイッチ法を原理とした測定試薬が開発されており、競合法に比して低濃度域においても高い精度および再現性性能を示していると報告されている<sup>9)10)</sup>。これらのことから、今後さらにサンドイッチ法を原理とした本法のような試薬が開発されることで、現状競合法で測定されている低分子量ホルモンを正確に測定できることが期待される。

本試薬とAIA-パックCL エストラジオールならびにエクルーシス試薬E2IVとの相関関係は良好な相関性が認められるとともに、E1、E3、プロゲステロン、テストステロンに対する交叉反応性も極めて低い結果が得られた。このことから、抱合型エストロゲン製剤であるプレマリンの主要な中間代謝産物であるE1の影響も少ないものと思われ、ホルモン剤の影響を受けにくい特異性の高い試薬であることが推察された。

## 7. 結論

全自動化学発光酵素免疫測定装置AIA-CL1200を使用し、高感度エストラジオール測定試薬AIA-パックCL hs-E2の基礎的検討を行った結果、良好な成績が得られた。また、ホルモン剤の影響を受けにくく特異的にE2を測定していると考えられた。本法は現行法と比較し高感度であり、高感度測定が要

Table 2 Cross-reactivity test

	Addition concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	cross-reactivity (%)
estrone	0.1	0.027
	1	0.006
estriol	0.1	0.053
	1	0.027
progesterone	1	N.D.
	10	N.D.
testosterone	1	0.00039
	10	0.00037

求される卵巣機能低下症の診断や不妊治療などの日常診療に有用であると考えられた。

本論文の要旨は日本医療検査科学会第54回大会(2022年)にて報告した。

本論文に関連し開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

## 文献

- 清水幸子. エストロゲン:エストロン(E1), エストラジオール(E2), エストリオール(E3)およびエストロール(E4). 日本臨牀 2010;68(増刊号7):448-461.

- 2) 矢内原巧, 赤松達也. 高齢婦人と内分泌. 産科と婦人科 1996;63(8):1033-1040.
- 3) 金井眞理, 峯岸 敬. エストラジオール(E2), エストリオール(E3). 臨床検査ガイド 2013-2014 2013;443-8
- 4) 曾根田瞬, 大串健一郎. エストラジオール, プロゲステロン. 小児内科 2017;49(増刊):480-485.
- 5) 村上敬一, 山本豊, 岩瀬弘敬. 閉経期乳癌における内分泌療法を選択—高感度エストラジオール(E2)測定を参考に—. 乳癌の臨床 2010;25(1):37-42.
- 6) 長谷川行洋, 有安大典. 内分泌. 小児科診療 2005;68(5):797-802.
- 7) Abraham, G.E. et al. Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and estradiol-17 $\beta$  during the menstrual cycle. J. Clin. Endocrinol. 1972;34:312.
- 8) 長屋直樹, 戸井雅和, 砂原誠司ほか. 高感度 Hyper Pressure Liquid Chromatography-Radioimmunoassay (HPLC-RIA) による乳癌組織中 Estrone (E1), Estradiol (E2) 濃度測定とその臨床的意義. 癌と化学療法 1997;24(3):329-336.
- 9) 度會理佳, 菊地良介, 後藤香緒里ほか. ルミパルスプレスト アルドステロンの妥当性評価. 医学検査 2022;71(3):450-456.
- 10) 佐藤文俊, 小野美澄, 手塚雄太ほか. サンドイッチ法による CLEIA を原理とした血清, 血漿および尿中アルドステロン測定試薬(ルミパルスプレスト(R)アルドステロン)の基礎的検討. 医学と薬学 2019;76(12):1819-1826.

# プログラニューリン (PGRN) の測定方法の確立と臨床的意義 —RA患者におけるTNF関連生物学的製剤治療による変化—

Establishment and clinical significance of progranulin (PGRN) measurement.  
— Changes by TNF-related biologic agent infliximab treatment in RA patients. —

藤垣英嗣<sup>1)</sup>, 竹村正男<sup>1)2)</sup>, 山本康子<sup>1)</sup>, 佐藤正夫<sup>3)</sup>, 四戸隆基<sup>4)</sup>, 石田秀和<sup>1)</sup>  
竹村恵里奈<sup>5)</sup>, 出田貴康<sup>2)</sup>, 清水雅仁<sup>2)</sup>, 斎藤邦明<sup>1)6)</sup>

**要旨** プログラニューリン (PGRN) の測定方法の確立を目的として新たに開発されたPGRN測定試薬の基礎的検討をおこなった。未治療の関節リウマチ (RA) 患者50例と変形性ひざ関節症 (OA) 患者37例, 健常者100例についてPGRN測定試薬を用いて測定した。さらにRA治療薬のTNF関連生物学的製剤Infliximab (IFX) 投与患者5例について経時変を観察した。再現性は2濃度の併行精度4.4%, 4.2%, 5日間の室内再現精度8.7%, 7.8%であった。健常者のPGRN (Mean ± SD ng/mL) は男性37.9 ± 8.9ng/ml, 女性40.5 ± 8.7ng/mlであった。RA患者は62.9 ± 12.4ng/ml, OA患者55.1 ± 12.0ng/mlでありRA患者が有意に高値であった。またIFX治療患者では治療前から約1年後のPGRNは軽度 (約20%) の上昇が認められた。本試薬の基礎的検討は良好であり, RA患者ではOA患者, 健常者対照に比べて有意に高く従来の報告と一致していた。

**Key words** Progranulin (PGRN), GP88, Rheumatoid arthritis (RA), Infliximab (IFX), Biologic agent

## 1. はじめに

プログラニューリン (Progranulin; PGRN) はGP88, グラニューリン-エピテリン前駆体, PC細胞由来成長因子等で同定されてきたが, その組成は分子量80~88kDaの糖タンパクで特異的プロテアー

ゼによる分解プロセッシングを受ける同一のタンパクである<sup>1)</sup>。生理活性は分解過程における産物のペプチド構成により抗炎症性作用から組織修復, 腫瘍形成などの増殖・成長因子を含み, さらには炎症性機能に至るまで多様性を有する糖タンパクである<sup>2)-4)</sup>。近年, PGRN分子が細胞死関連のTNFシグナル伝

Received Jun. 20, 2023; Accepted Aug. 8, 2023  
Fujigaki Hidestugu<sup>1)</sup>, Takemura Masao<sup>1)2)</sup>, Yamamoto Yasuko<sup>1)</sup>, Sato Masao<sup>3)</sup>, Shinohe Ryuki<sup>4)</sup>, Ishida Hidekazu<sup>1)</sup>, Takemura Erina<sup>5)</sup>, Ideta Tkayasu<sup>2)</sup>, Shimizu Masahito<sup>2)</sup>, Saito Kuniaki<sup>1)6)</sup>

<sup>1)</sup> 藤田医科大学大学院 保健学研究科 先進診断システム探索部門

Advanced Diagnostic System Research Laboratory, Fujita Health University, Aichi, Japan.

<sup>2)</sup> 岐阜大学大学院医学系研究科 生体管理医学臨床検査学

Department of Informative Clinical Medicine, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, Japan.

<sup>3)</sup> 海津市医師会病院 整形外科・リウマチセンター  
Department of Orthopaedic Surgery and Rheumatology Kaizu Medical Association Hospital,

Kaizu City, Gifu, Japan.

<sup>4)</sup> JA西美濃厚生病院 整形外科・リウマチ科

Department of Orthopaedic Surgery and Rheumatology, Nishimino Welfare Hospital, Yoro City, Gifu, Japan.

<sup>5)</sup> 松波総合病院 薬剤部

Department of Pharmacy, Matsunami General Hospital, Kasamatsu City, Hashima, Gifu, Japan.

<sup>6)</sup> 藤田医科大学大学院 保健学研究科 病態制御解析学部門

Department of Disease Control and Prevention, Fujita Health University Graduate School of Health Sciences, Toyoake, Aichi, Japan.

〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98

連絡責任者: 竹村正男

E-mail: takem@fujita-hu.ac.jp

達において関節炎モジュレーターとしての可能性がPGRN-KOマウスの実験結果から報告された<sup>5)</sup>。すなわちPGRNはTNF/TNFリセプター(R)結合においてTNF-RにPGRN分子が結合し関節炎のシグナルを制御する可能性が考えられている<sup>6)</sup>。すでに先行報告ではPGRN値の増加は関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)等の自己免疫疾患において、その機能について興味もたれている<sup>7,8)</sup>。

今回、我々は新たに開発されたPGRN測定試薬を用いて臨床的有用性についてRA患者を対象に検討したので報告する。

## 2. 方法と対象

### 1) 対象症例

リウマチ専門外来初診患者で本研究に同意が得られた未治療RA患者50例および変形性ひざ関節症(OA)患者37例である。また、外来通院患者での生物学的製剤(TNFレセプター抗体Infliximab; IFX)投与患者5例について治療前から8週, 24週目, 52週目の4ポイントでのPGRN値の経過観察を行った。また、健常者の分布を確認するため同意書が確認されている健康診断受診者100名(男性45名:24歳~67歳,平均44.7歳,女性55名23歳~64歳,平均44.4歳)を健康科学リソースセンター(RECHS)より供与された血清を用いた。本研究は岐阜大学医学研究科倫理委員会の承認(No.2019-17)を受けている。

### 2) PGRN測定方法

PGRN測定試薬は(仮称「プログラニュリンELISA」)(株式会社エイアンドティー(A&T);横浜市)を用いた。測定原理はSerrero(A&G Pharma.;Maryland,US)ら<sup>4)</sup>により新たに樹立されたGP88モノクローナル抗体(Progranulin;PGRN)

をELISAプレートに固相化した2ステップサンドイッチ法である。すなわち本試薬はGP88抗体固相化ELISAプレート(CORNING)に専用希釈液で20倍希釈した被検血清を100μL添加し室温で1時間静置(一次反応)。反応後、専用洗浄液で3回洗浄を行い検出抗体試薬(抗ヒトGP88抗体ウサギIgG; A & G Pharma.) 100μL加えて室温で1時間静置(二次反応)した。さらに反応後、洗浄操作を3回繰り返し、ペルオキシダーゼ標識抗体(抗ウサギIgGヤギ血清) 100μL添加し1時間静置した。反応後、洗浄操作を3回を行い発色液(TMB) 100μL加え30分後、反応停止液100μLを加え主波長450nm,副波長620nmで吸光度を測定した。測定値は試薬添付GP88標準血清(0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 10.0 ng/mL)を用いてSIEMENS ELISA processor-IIIより自動作成された標準曲線から算出した。希釈倍率から換算すると2~200ng/mLが測定可能となる。各群間の比較検定はMann-Whitney U testを用いて行ないp値0.05以下を統計学的有意差とした。

## 3. 結果

### 1) 再現性について

濃度の異なる二種類の血清を用いて再現性の検討を行なった。併行精度(n=10)の変動係数(CV)は血清1(4.4%),血清2(4.2%)ともに良好であった。異なる試薬プレートによる5日間の室内再現の変化について検討を行なった結果、室内再現精度(n=5)の変動係数(CV)は血清1(8.7%),血清2(7.8%)で大きなバラツキは認められなかった(Table 1)。

### 2) 共存物質の影響

血清中の共存物質の影響について検討を行った。干渉チェック・Aプラス(シスメックス)を用いて

Table 1 Reproducibility of Progranulin by ELISA method. (within-run (n=10) and between day (n=5) coefficient of variation)

within-run (n=10)	Sample 1	Sample 2
Mean (ng/mL)	50.2	129.7
S D	2.21	5.46
C V (%)	4.4	4.2
Day to day (n=5)	Sample 1	Sample 2
Mean (ng/mL)	46.4	107.4
S D	4.03	8.42
C V (%)	8.7	7.8

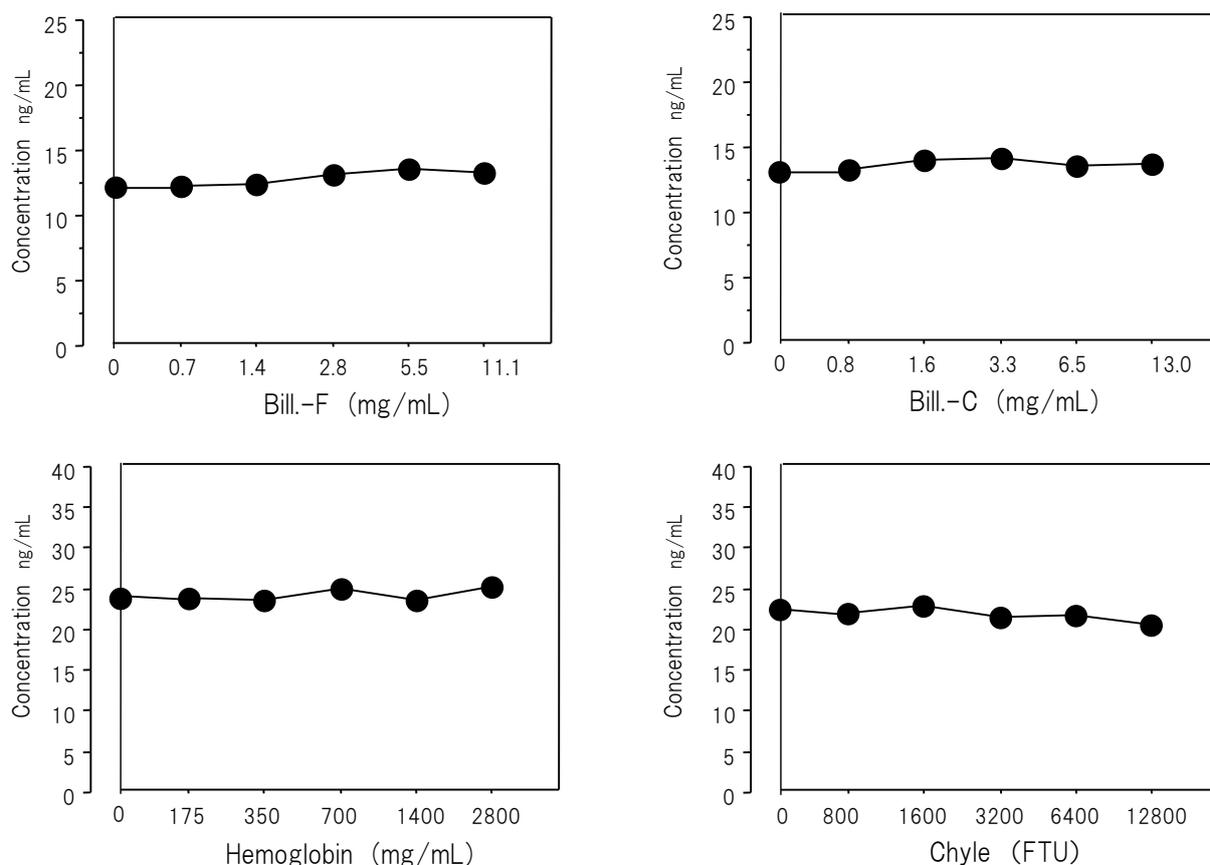


Fig. 1 Influence of coexisting substances on progranulin measurement.

Bill-F, Bill-C, ヘモグロビン, 乳び (ホルマジン濁度) について検討した。各濃度における干渉域については大きく変化するのは認められなかった (Fig. 1)。

### 3) 従来法との比較

従来法としてすでにELISAによる測定系を考案し報告されている方法を用いて<sup>8)</sup>, 本試薬との相関について検討を行った。RA患者, OA患者, 健常者の血清86検体を無作為に選択し同時に行った。従来法との関係は $r=0.884$ ,  $y=0.75x+7.0$ であった (Fig. 2)。

### 4) 血清と血漿との比較

臨床材料としての検体測定値について, 日常検査に検査依頼があった血清と抗凝固剤添加血漿 (ヘパリン, EDTA・2Na) 30検体について検討した。血清検体に対してヘパリン加検体 ( $r=0.990$ ), EDTA・2Na検体 ( $r=0.986$ ) であり, 両者共に高い相関関係であった (Fig. 3)。

### 5) 健常者のPGRN濃度

健常者全体の血中PGRNを年齢と性差について検討した。男女別の検討結果 (Mean  $\pm$  SD ng/

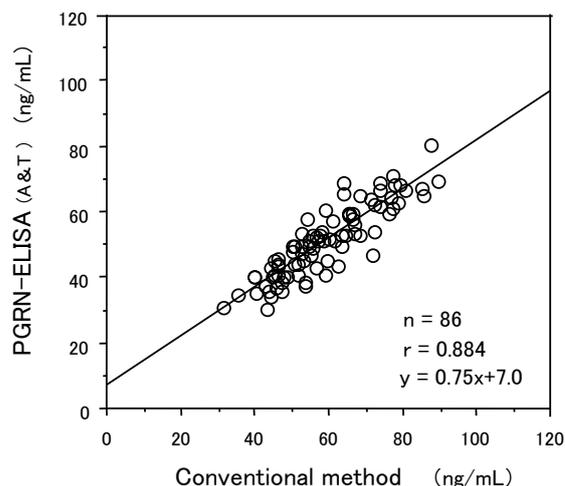


Fig. 2 Correlation between the conventional progranulin method and the new kit (A & T) method.

mL) では男性 $37.9 \pm 8.9$ ng/mL, 女性 $40.5 \pm 8.7$ ng/mLで, 女性でやや高値傾向であるが統計学的性差を認めず, 全体値 $39.2 \pm 8.8$ ng/mLであった (Fig. 4)。また, 加齢との関係については統計学的な関係は認

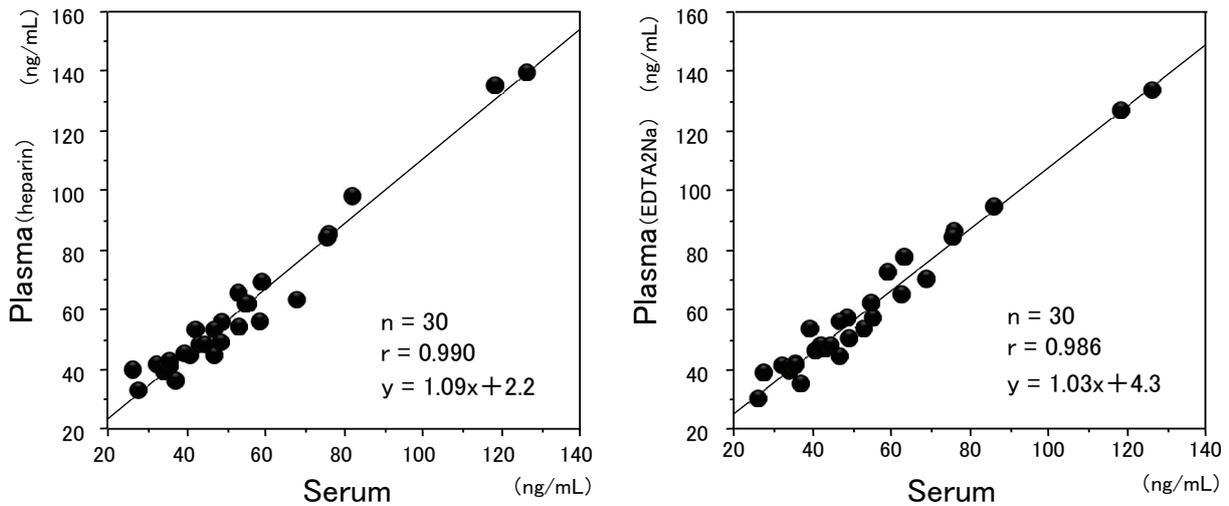


Fig. 3 Comparison of serum and plasma (heparin and EDTA 2Na) progranulin levels.

められなかった。

6) 関節リウマチ患者のPGRN値

RAではすでにPGRNは高値であると報告されているが<sup>8)</sup>、本試薬による未治療RA患者を対象に測定をおこなった。RA患者 (Mean ± SD ng/mL) では62.9 ± 12.4ng/ml, OA患者55.1 ± 12.0ng/mlであり、従来の報告と同様でOA群、健常対照群に比べてRA群で有意に高値であった (Fig. 5)。

7) TNF関連生物学的製剤 (IFX) 治療による血清PGRNとIL-6の変化

RA治療戦略において従来の抗リウマチ薬に加え生物学的製剤の出現で患者QOLは飛躍的に向上した。本試薬を用いてIFX治療で予後良好患者5例について経過観察を行った。治療前 (pre) から8週目, 24週目, 52週目の4ヶ所で約1年間のPGRNの変化について検討し炎症の指標であるIL-6についても同時に検討した。

IFX治療前のIL-6, PGRNの測定値の平均値比較ではIL-6は投与前 (Mean ± SE pg/mL) 36.2 ± 21.2pg/mLから投与回数に伴い54週後では16.2 ± 10.5pg/mLまで低下を認め治療効果が反映されているものと推測されるが個体差が大きくバラツキがある。一方, PGRN (Mean ± SE ng/mL) は治療前47.5 ± 2.4より54週目には57.3 ± 6.2へと軽度の上昇 (約20%) が認められ, 治療に伴う効果の変動と推測されるが臨床的意義付けは例数が少なく不明である (Fig. 6)。

4. 考察

PGRNは特異酵素により様々な機能を有する分解

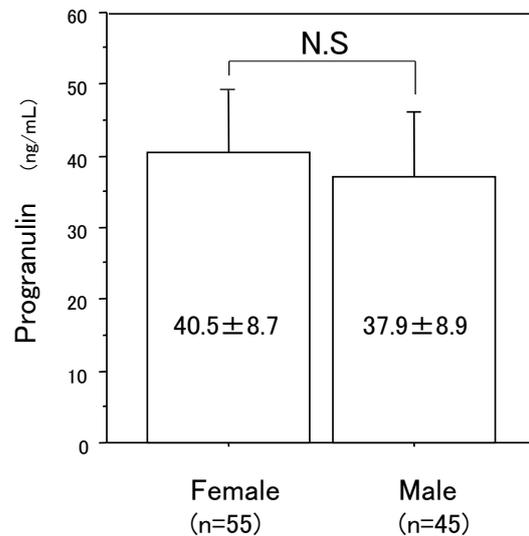


Fig. 4 Gender distribution of progranulin in healthy subjects.

産物に分解され, その分解ペプチド分子により異なる作用を示し, 組織への浸潤細胞やがん化細胞などオートクリン的な機能を有している。PGRNは糖鎖修飾の違いにより2種類の蛋白分子として88kDa (分泌型) と不完全な55~66kDa (非分泌型) が認められ, 抗炎症作用から増殖・細胞保護の機能を有するものと考えられている<sup>2)9)</sup>。また, PGRNはエラスターゼなどの分解作用を受けグラニューリン (Granulin;GRN) 分子のシステインリッチペプチド (7個の約6kDa) まで分解され炎症作用を有する<sup>10)</sup>。これらの一連のPGRN, GRN分子カスケードは炎症組織において炎症と抗炎症の作用バランス

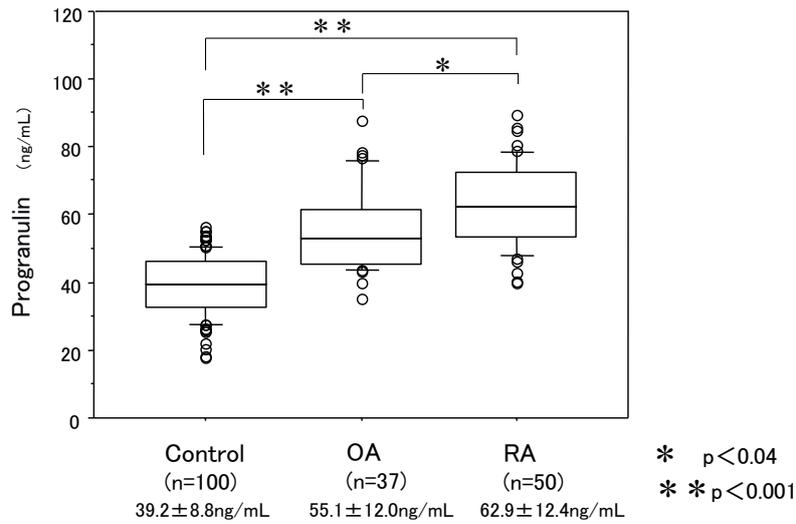


Fig. 5 Serum progranulin concentration values in arthritis (RA, OA) and healthy controls.

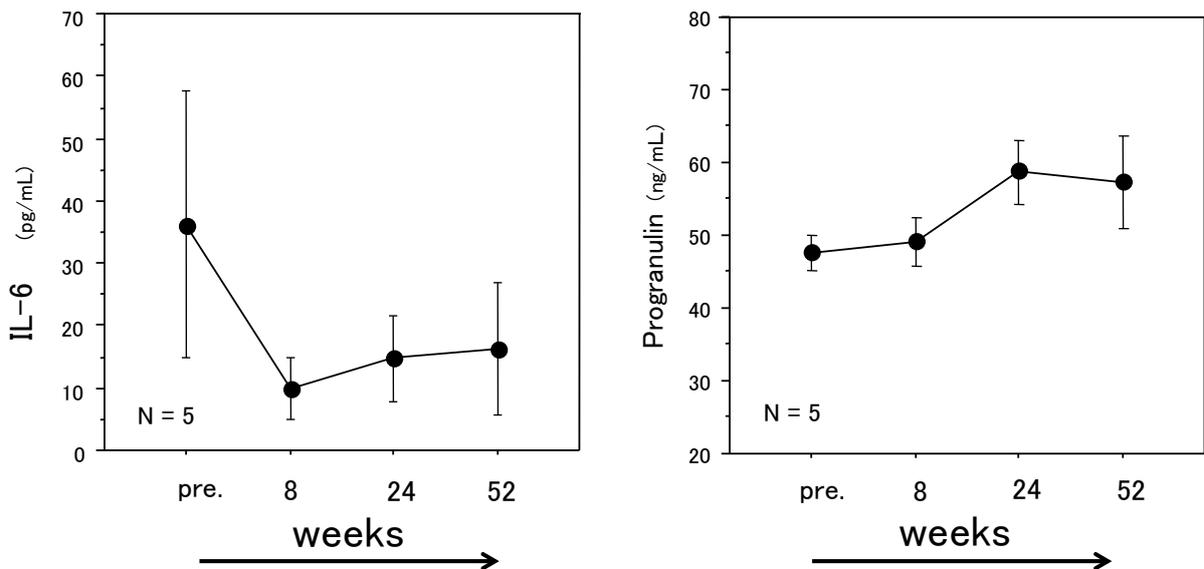


Fig. 6 Changes in progranulin and IL-6 due to infliximab treatment.

Changes in PGRN and IL-6 at 4 sites before treatment (pre), 8 weeks, 24 weeks, and 52 weeks for about 1 year

を取っているものと推測されている<sup>11)</sup>。

今回の検討は本測定試薬の特性について臨床材料を用いて行ったが、大きな問題はないものと思われた。即ち、日常検査での再現性や共存物質による大きな変動は認められず、健常者の検討においても男女間や加齢の影響は低いものと思われる。ただ、今回の検討では高齢者や幼児・小児等の検討がなされおらず今後の検討が必要と考えられた。

一方、RA患者では初診外来の早期症例と健常者の比較では統計学的に有意差 ( $p < 0.001$ ) を認め従

来の報告と同様であり<sup>8)12)</sup>、今後長期の罹病患者についての検討が必要である。治療薬IFXとの関係では例数は少ないが治療経過から全体的に軽度の上昇傾向が観察されておりPGRNのTNF-R結合特性との関連について検討が必要と考えている。すなわちこれらのPGRN分子の動態は診断と治療のターゲットとして注目されており<sup>13)</sup>、抗炎症性に作用している可能性や他の炎症に拘わるサイトカインの変化も考えあわせ判断する必要がある。PGRNは多くの報告から多機能を有する生理学的メディエーター

としての可能性を有しており様々な呼称で報告されてきた結果からも推測される。Serreroらによって樹立された抗GP88抗体は乳がん細胞におけるエストロゲン・レセプターの高発現細胞に強く証明され、乳がんのバイオマーカーとして開発された<sup>4)</sup>。しかしながら、TNF-Rへの結合様式やPGRN-KOマウスの関節炎作用機序におけるTNFモジュレーター機能はApoptosis関連と細胞保護・増殖作用の両面からの可能性が考えられている<sup>5)14)</sup>。特に神経細胞の保護作用については詳細な検討がされており、PGRN-KOマウスの実験では脳傷害時にミクログリアの過剰な活性化を抑制し炎症反応を軽減する<sup>15)</sup>。またヒトでは視神経脊髄炎の脳脊髄液ではPGRNはIL-6との相関が認められ炎症の予後バイオマーカーとなる可能性の報告がある<sup>16)</sup>。さらに中枢神経系での非癌性神経疾患と転移癌細胞を区別することは治療と予後を決定する上で重要であり、脳脊髄液中のPGRN値が高くCT画像上の脳内リンパ腫診断補助や治療のモニタリングへの可能性についても報告されている<sup>17)</sup>。

## 5. 結論

今回の検討結果はPGRNの日常の臨床検査への可能性について基礎的な検討の一部であるが、再現性などの精度には大きな問題は生じないものと思われる。ただ測定方法はELISA法の原理を応用されており、長時間の測定過程が(約3時間)が必要となり迅速性への改良が望まれる。今後、免疫化学発光法などの自動分析機器への応用が可能となり、更なるデータの蓄積が可能となれば日常検査での臨床的意義付けが明確になるものと考えられる。

なお、本研究の一部は全米リウマチ学会(ACR-2014 supp.No.1383 : Boston)で報告した。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

## 文献

- 1) Bateman A, Bennett HP. Granulins: The structure and function of an emerging family of growth factors. *J Endocrinol* 1998;158(2):145-151.
- 2) He Z, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis *J Mol Med (Berl)* 2003 Oct; 81(10):600-612. doi:10.1007/s00109-003-0474-3.
- 3) Serrero G. Progranulin/GP88, A complex and multifaceted player of tumor growth by direct action and via the tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1329:475-498. doi: 10.1007/978-3-030-73119-9
- 4) Serrero G, Hawkins DM, Yuel B, et al. Progranulin (GP88) tumor tissue expression is associated with increased risk of recurrence in breast cancer patients diagnosed with estrogen receptor positive invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Research* 2012;14:Article number:R26 Open Access
- 5) Tang W, Lu Y, Tian QY, et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science* 2011;332:478-484. doi:10.1126/science.1199214
- 6) Liu C-ju and X Bosch. Progranulin: A growth factor, a novel TNFR ligand and a drug target. *Pharmacol Ther* 2012;133:124-132. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.10.003
- 7) Tanaka A, Tsukamoto H, Mitoma H, et al. Serum progranulin levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus, reflecting disease activity. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R244. doi:10.1186/ar4087.
- 8) Yamamoto Y, Takemura M, Serrero G, et al. Increased serum GP88 (Progranulin) concentrations in rheumatoid arthritis. *Inflammation* 2014. doi:10.1007/s10753-014-9911-4
- 9) Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, et al. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischaemic stroke. *Brain.* 2015;138:1932-48. doi:10.1093/brain/awv079.
- 10) Zhu J, Nathan C, Jin W, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell.* 2002;13:111:867-878.
- 11) Kessenbrock K, Fröhlich L, Sixt M, et al. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating anti-inflammatory progranulin.

- J Clin Invest. 2008;118:2438-2447. doi: 10.1172/JCI34694.
- 12) Cerezo LA, Kuklová M, Hulejová H, et al. Progranulin is associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:740357. doi: 10.1155/2015/740357.
- 13) Wei J, Hettinghouse A, Liu C. The role of progranulin in arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1383:5-20. doi: 10.1111/nyas.13191.
- 14) Li M, Liu Y, Xia F, et al. Progranulin is required for proper ER stress response and inhibits ER stress-mediated apoptosis through TNFR2. *Cell Signal* 2014;26:1539-48. Doi:10.1016/j.cellsig.2014.03.026.
- 15) Tanaka Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, et al. Exacerbated inflammatory responses related to activated microglia after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice. *Neuroscience* 2013;231:49-60. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.11.032.
- 16) Kimura A, Takemura M, Saito K, et al. Increased cerebrospinal fluid progranulin correlates with interleukin-6 in the acute phase of neuromyelitis optica spectrum disorder. *J Neuroimmunol.* 2017;15,305:175-181. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.01.006.
- 17) Kimura A, Takemura M, Serrero G, et al. Higher levels of progranulin in cerebrospinal fluid of patients with lymphoma and carcinoma with CNS metastasis. *J Neuro-Oncology* 2018;137:455-462.

# MMP-3測定用改良試薬「マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 キット LZテスト ‘栄研’ MMP-3」の基礎的検討

Validation of improved MMP-3 measurement reagent  
“Matrix Metalloproteinase-3 kit LZ test ‘EIKEN’ MMP-3”

豊田咲希<sup>1)</sup>, 青木絵美<sup>1)</sup>, 中川央充<sup>1)</sup>, 酒井昭子<sup>1)</sup>, 野口昌代<sup>1)</sup>, 大野明美<sup>1)</sup>  
横田浩充<sup>1)</sup>, 涌井昌俊<sup>1, 2)</sup>, 松下弘道<sup>1, 2)</sup>

**要旨** 生化学自動分析装置用MMP-3測定試薬「マトリックスメタロプロテイナーゼ-3キット LZテスト ‘栄研’ MMP-3」の改良試薬における基礎的性能を検討した。この改良試薬は、併行精度、室内精度、希釈直線性、検出限界および定量限界に関して従来試薬と同等の成績が得られ、従来試薬と強い相関性を示した。従来試薬でみられたオンボード経過期間に応じた測定値低下傾向がなくなり、架設後35日目までの安定性を確認した。また、従来試薬に含まれていた劇薬成分がなくなったことで、保管場所等取り扱いの柔軟性が上がった。これらのことより、本試薬は従来試薬と比較し優れた性能を有すると考える。

**Key words** matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), improved MMP-3 measurement reagent, rheumatoid arthritis, reagent stability

## 1. はじめに

マトリックスメタロプロテイナーゼ-3（以下MMP-3）は、過形成となった滑膜表層細胞や軟骨細胞に発現がみられる蛋白分解酵素で、軟骨基質を構成するコラーゲンや細胞外マトリックス成分の分解活性を有する。MMP-3は炎症性サイトカインにより誘導されるものであり、関節軟骨マトリックスを破壊することを通じて関節リウマチ（RA）における軟骨破壊の中心的な役割を担っている。血中MMP-3値は持続的滑膜炎と一致して変動するものであり、疾患活動性や治療効果および予後予測の指標として有用である<sup>1-3)</sup>。

現在、当院ではMMP-3測定試薬として「マトリ

ックスメタロプロテイナーゼ-3キット LZテスト ‘栄研’ MMP-3」（栄研化学株式会社、以下栄研化学）を使用している。試薬のオンボード経過期間に応じて経日的に精度管理試料の測定値低下が認められるため、試薬の混和や頻回な再検量を行い、それでも不良の場合には試薬を使い切らずに廃棄する等の対応を行っている。また、本試薬は第1試薬の緩衝液に2-メルカプトエチルアミン塩酸塩を含有する劇薬であるため、保管場所等の取り扱い方法に注意が必要である。今回、栄研化学から試薬オンボード安定性が高く、劇薬成分を含まない改良試薬が開発された。そこで我々は、改良試薬の基礎的性能評価を行ったため、その結果を報告する。

Received Jun. 8, 2023; Accepted Sep. 21, 2023

Saki TOYOTA<sup>1)</sup>, Emi AOKI<sup>1)</sup>, Terumichi NAKAGAWA<sup>1)</sup>, Akiko SAKAI<sup>1)</sup>, Masayo NOGUCHI<sup>1)</sup>, Akemi OHNO<sup>1)</sup>, Hiromitsu YOKOTA<sup>1)</sup>, Masatoshi WAKUI<sup>1,2)</sup>, Hiromichi MATSUSHITA<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> 慶應義塾大学病院 臨床検査科

Clinical Laboratory, Keio University Hospital

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>2)</sup> 慶應義塾大学医学部 臨床検査医学

Department of Laboratory Medicine, Keio University School of Medicine

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Corresponding author: 豊田咲希

TEL: 03-3353-1211

E-mail: saki.toyota@adst.keio.ac.jp

## 2. 対象および方法

### 1) 対象

当院の外来患者検体のうちMMP-3の依頼のあった残余検体を、匿名化して使用した。なお、本検討は慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得て行った（承認番号：20211117）。

### 2) 試薬および測定機器

測定試薬は改良試薬、従来試薬ともにマトリックスメタロプロテイナーゼ-3キット LZテスト‘栄研’MMP-3（栄研化学）を用いた（改良試薬<非劇薬>：Lot. SMAY004, 従来試薬<劇薬>：Lot.BAX003）。検量は、専用キャリブプレート LZ-MMP-3キャリブプレート‘栄研’（栄研化学）を用いた。コントロールは、L-コンセラ I AH（以下L-CON I, 日本製薬株式会社, 現島津ダイアグノスティクス株式会社）および、QC-MMP-3-L‘栄研’（以下MMP-3-L, 栄研化学）、QC-MMP-3-H‘栄研’（以下MMP-3-H, 栄研化学）を用いた。測定機器は、日立自動分析装置LABOSPECT008a（株式会社日立ハイテク）を用い、試薬メーカー指定のパラメータにて測定した。

### 3) 測定原理

検体に抗ヒトMMP-3マウスモノクローナル抗体感作ラテックス粒子を添加すると、抗原抗体反応により凝集が起こる。このとき生成した凝集物の量を濁度の変化としてとらえ、主波長570 nm, 副波長800 nmで測定し、検体中のMMP-3濃度を測定する。

### 4) 結果の解析

各検討の解析には、日本臨床化学会が配布している定量測定法のバリデーション算出プログラム Validation-Support-V6.1を用いた。なお、相関性の解析には、MedCalc（MedCalc Software Ltd.）を使用した。

## 3. 成績

### 1) 併行精度

L-CON I, MMP-3-L, MMP-3-Hを用い、各々20回連続測定した。その結果、標準偏差（以下SD）はL-CON I, MMP-3-L, MMP-3-Hでそれぞれ0.9 ng/mL, 1.0 ng/mL, 1.2 ng/mLであった。また、変動係数（以下CV, 括弧内は平均値）はL-CON I, MMP-3-L, MMP-3-Hでそれぞれ4.6% (19.3 ng/mL), 0.9% (102.8 ng/mL), 0.4% (304.2 ng/mL)であった（Table 1）。

### 2) 室内精度

L-CON I, MMP-3-L, MMP-3-Hの2重測定を1回とし、1日2回、15日間測定した。測定初日にの

**Table 1** Repeatability of the improved reagent

Mean values, SD and CV of control samples (L-CON I, MMP-3-L and MMP-3-H) are shown. Each sample was measured 20 times.

	(n=20)		
	L-CON I	MMP-3-L	MMP-3-H
Mean (ng/mL)	19.3	102.8	304.2
SD (ng/mL)	0.9	1.0	1.2
CV (%)	4.6	0.9	0.4

**Table 2** Intermediate precision of the improved reagent

Mean values, SD and CV of control samples (L-CON I, MMP-3-L and MMP-3-H) are shown. Each sample was measured four times a day for 15 days (n=60).

	(n=60)		
	L-CON I	MMP-3-L	MMP-3-H
Mean (ng/mL)	19.3	102.7	302.8
SD (ng/mL)	1.0	1.2	1.8
CV (%)	5.1	1.1	0.6

み検量を行い、その後試薬は装置の試薬保冷庫内に架設したまま測定に用いた。その結果、総合CV（括弧内は平均値）はL-CON I, MMP-3-L, MMP-3-Hでそれぞれ5.1% (19.3 ng/mL), 1.1% (102.7 ng/mL), 0.6% (302.8 ng/mL)であった（Table 2）。

### 3) 希釈直線性

メーカー提供のMMP-3高濃度試料（約2000 ng/mL）を、生理食塩水を用いて10段階に希釈し、各2重測定をして測定値の直線性を確認した。その結果、残差変動の分散と変動の分散比の有意確率より1236 ng/mLまでの直線性を確認した（Fig. 1）。

### 4) 抗原過剰チェック

メーカー提供のMMP-3高濃度試料（約2000 ng/mL）を、生理食塩水を用いて10段階に希釈し、各2重測定をしてポストゾーン現象の有無を確認した。理論値と10%以上低値側に乖離がみられた場合をポストゾーン現象有りと判定した。その結果、理論値が1600 ng/mLから2000 ng/mLでは、測定値が理論値と10%以上乖離しポストゾーン現象を認めしたが、本試薬の測定上限である1200 ng/mL以下を示す試料はなかった（Fig. 2）。

### 5) 検出限界と定量限界

生理食塩水（大塚製薬株式会社）を12回、5日間測定してブランク上限（以下、LoB）を求め、添付文書の測定下限（10.0 ng/mL）付近に調製した10試料を2重測定で5日間測定して検出限界（以下、

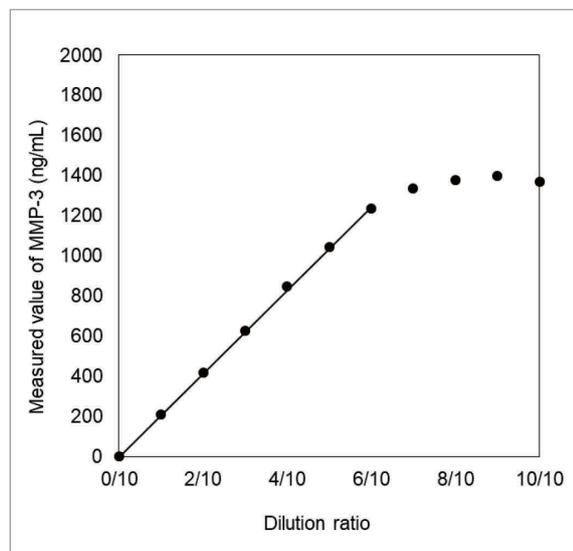


Fig. 1 Dilution linearity of the improved reagent

To compare the measured values with the theoretical values, a 10-step dilution of the MMP-3-High reagent (~2,000 ng/mL) was carried out. Each point in the figure represents the mean value of duplicate measurements.

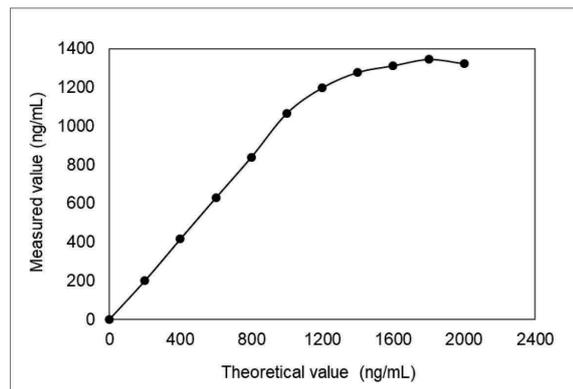


Fig. 2 Post-zone phenomenon recognized in the use of the improved reagent

A 10-step dilution of MMP3-High reagent (~2,000 ng/mL) was utilized to evaluate the post-zone phenomenon. Each point in the figure represents the mean value of duplicate measurements.

LoD) および定量限界 (以下, LoQ) を求めた。LoDは, 5日間の測定値の合成標準偏差を用い,  $LoD = LoB + 合成標準偏差 \times 1.645$  の式から求めた。LoQは precision profile 法にて CV20% の計算とした。その結果, ノンパラメトリック法で LoD は 1.67 ng/mL, precision profile 法で CV20% での LoQ は 5.01 ng/mL であった (Fig. 3)。

### 6) 相関性

外来患者血清 117 例を改良試薬と従来試薬で測定

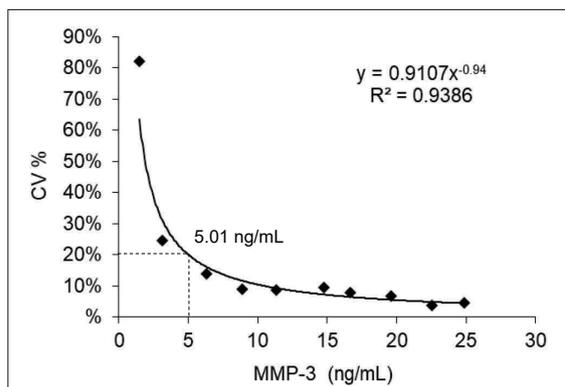


Fig. 3 Limit of quantitation of the improved reagent

To confirm Limit of quantitation (LoQ), measured values and their variabilities for ten samples (2.5 - 25.0 ng/mL) are shown. Each point in the figure represents the mean of measured values of each sample (n=10).

し, 相関性を確認した。従来試薬を x 軸, 改良試薬を y 軸として, 相関分析により相関係数を算出し, Passing Bablok 回帰分析を用いて回帰式を求めた。その結果, 相関係数  $r = 0.999$ , 回帰式  $y = 1.02x - 1.15$  ( $n = 117$ ) であった (Fig. 4(a))。Bland Altman 分析では, 200~400 ng/mL 付近では改良試薬の高値傾向を, 600 ng/mL 以上では低値傾向を認めた (Fig. 4(b))。

### 7) 試薬オンボード安定性

L-CON I, MMP-3-L, MMP-3-H を 2 重測定で 1 日 1 回, 35 日目まで, 改良試薬と従来試薬で測定した。測定は, 試薬開封日を 0 日目とし, 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35 日目に行い, 0 日目の測定値の平均値を 100% としたときの相対値 (%) を求め, 測定値の変動を調べた。試薬開封日にのみ検量を行い, その後試薬は装置の試薬保冷庫内に架設したまま測定に用いた。その結果, 35 日目の各試料の測定値の相対値 (%) は, 改良試薬ではすべての精度管理試料を通して 98.2~98.9% であった。一方, 従来試薬では L-CON I で 38.3%, MMP-3-L で 79.7%, MMP-3-H で 85.8% であった (Fig. 5)。

## 4. 考察

本検討では, 生化学自動分析装置用 MMP-3 測定試薬である「マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 キット LZ テスト '栄研' MMP-3」の改良試薬について, 従来試薬との比較を含めた基礎的性能の評価を行った。

改良試薬の測定値は, 従来試薬との強い相関性を認めたが, 測定値の増加に伴い従来試薬より高値傾向を認め, 一方, 概ね 400 ng/mL を境に低値傾向

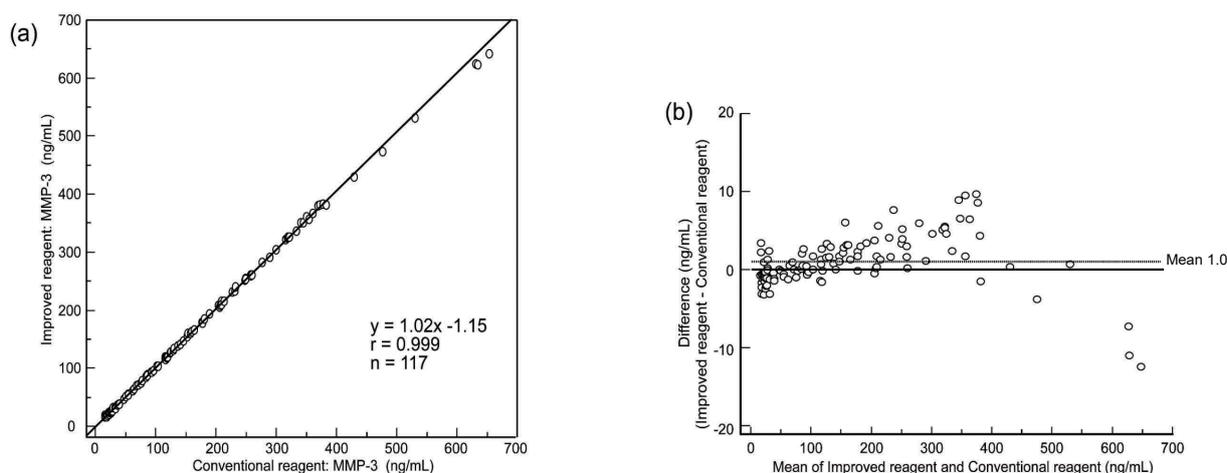


Fig. 4 Correlation between the improved and conventional reagents

(a) A comparison of the two methods by Passing Bablok regression is shown. The vertical and horizontal axes denote the values measured by the improved and conventional reagents, respectively. Each dot in the figure represents the measured values of each sample.

(b) The difference between the two methods is shown by Bland Altman plot. Dotted line indicates the mean of differences.

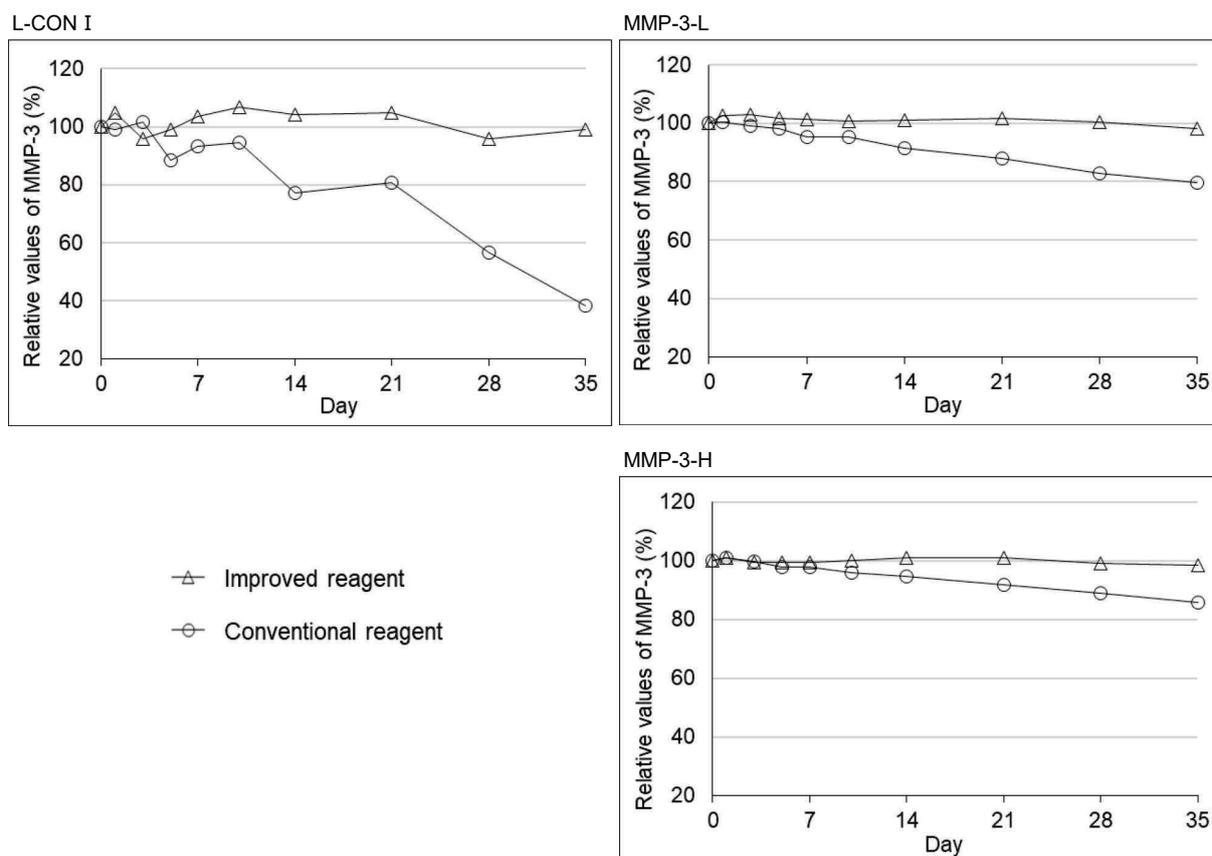


Fig. 5 Stability of the improved and conventional reagent

The figure shows the time-dependent changes in measurement values of the indicated control samples in the improved reagent and the conventional reagent. Each point in the figure represents the mean of duplicate measurements on day 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 and 35, respectively.

となった。400 ng/mLを境に値が変化したのは、この付近に検量点があるためであり、この差を各濃度での濃度比で評価すると、全て2.5%未満であることから、検量誤差に起因するものであると考えた。この結果より、測定の実験過程において、改良試薬と従来試薬の試薬構成成分の差異は測定値に影響していないと考えた。また、LoDおよびLoQは、それぞれ1.67 ng/mL、5.01 ng/mLであった。試薬添付文書に記された測定範囲の下限は10.0 ng/mLであり、添付文書と相違ない性能を確認できた。

精密度を評価した併行精度は、いずれのコントロールにおいてもCV5.0%以内、室内精度は、MMP-3-LおよびMMP-3-HではいずれもCV1.5%以内となり、十分な精密さを確認できた。L-CON Iでは、CV5.1%となったが、これはL-CON Iの試料濃度(平均値: 19.3 ng/mL)が他コントロールと比べ低値であるためである。血清中のMMP-3は、関節局所の炎症状態や関節破壊の予後を反映する因子として特にその高値化が臨床的意義を持つ<sup>4)</sup>。L-CON Iの濃度は、血清MMP-3の基準範囲上限である121.0 ng/mL(男性)、59.7 ng/mL(女性)<sup>4)</sup>と比較し十分に低いことから、この濃度域でのばらつきが臨床判断に影響を与える可能性は少なく、試薬性能には問題がないと考えた。

希釈直線性では、1236 ng/mLまで直線性が認められた。試薬添付文書による測定範囲の上限は1200 ng/mLであり、相違ない結果が得られた。抗原過剰チェックでは、ポストゾーン現象が認められたが、理論値が1400 ng/mLから2000 ng/mLの検体においてその測定値が測定上限である1200 ng/mL以下を示すものはなかった。このことから、2000 ng/mLまでの検体では本試薬の測定上限以上であっても見逃される恐れがないことが明らかとなり、発見後希釈再検することにより正しい測定値を報告可能であると考えられた。

試薬オンボード安定性は、改良試薬では開封後28日で、すべての精度管理試料を通して96.0~100.5%を示し、室内精度における2SD以内を保っていることを確認できた。開封後35日目においては、測定値の相対値(%)は98.2~98.9%であった。一方従来試薬では、専用コントロールMMP-3-LおよびMMP-3-Hにおいて、14日目では91.4~94.7%、21日目では87.9~91.9%まで低下した。また、L-CON Iでは、試薬開封後21日で初日の測定値の80.7%まで低下した。さらに28日目、35日目において著しい低下を認め、その低下率は専用コントロールと比較し有意に大きかった。

従来試薬では、精度管理試料の測定値低下が認められた場合、試薬を十分に混和した後に再測定を行っている。これは、一般的にラテックス試薬では、ラテックス粒子の沈殿が測定値の低値化、もしくは高値化に影響すると考えられているためである。しかし、本試薬は混和では改善せず、低値化はラテックス粒子以外の原因によると考えられた。今回の試薬改良では、第1試薬中でタンパク質ジスルフィド結合の還元剤として用いられている2-メルカプトエチルアミン塩酸塩が他の還元剤に変更された。同様に還元剤として使用される2-メルカプトエタノールは、大気中で容易に酸化される安定性の低い試薬として知られている<sup>5)</sup>。2-メルカプトエチルアミン塩酸塩は、2-メルカプトエタノールと比較し非常に穏やかな還元性を持つことが特徴であり、免疫グロブリンでは重鎖間のジスルフィド結合のみを切断し、重鎖と軽鎖の結合を保存する。しかし両者は、ともにチオール基を有した構造をもつ分子であり、2-メルカプトエタノール同様、2-メルカプトエチルアミン塩酸塩も安定性が低いことが予想される。還元剤の含まれる第一試薬のpHを測定したところ、改良試薬ではpH 7.44(試薬SDSによるとpH 7.20~7.40)、従来試薬ではpH 6.89(試薬SDSによるとpH 6.60~6.80)であった。2-メルカプトエタノールは高いpHにおいてその安定性がより低下することが知られているため<sup>6)</sup>、従来試薬では改良試薬と比較し第一試薬の緩衝液が酸性に調製されていたと考えられる。変更後の物質の詳細については明らかにされていないが、今回の結果から、2-メルカプトエチルアミン塩酸塩と同等の還元性を持ち、かつ安定性の高い還元剤に変更されたことで、試薬オンボード安定性が改善されたと考えられる。

L-CON Iは血清を模した多項目用精度管理試料であり、MMP-3以外の血清成分が多く含まれている。前述のように、オンボード経過期間に応じて経日的に測定値が低下する原因が第1試薬中の還元剤の不安定性にあるとすれば、その還元剤がL-CON Iに含まれる蛋白成分のジスルフィド結合切断のために消費されることで、専用コントロールと比較しL-CON Iにおいて測定値の低下率が大きくなったと考えられる<sup>5)</sup>。実際の患者検体はL-CON Iと同様の挙動をとると考えられ、劣化した試薬での測定では専用コントロールで確認した10%の低値化を上回る影響があったことが示唆される。

従来試薬では、試薬オンボード安定性が低いために、再検量または試薬を廃棄するなどの対応を行っており、精度管理業務の煩雑化だけでなくコスト面

においても課題があった。しかし、今回試薬安定性が改良されたことで、原則ロット変更時の検量のみで運用可能になる。正確な測定結果の提供だけでなく、日常業務の負担軽減に大きく貢献すると思われる。

## 5. 結論

今回、LABOSPECT008 *a* によるMMP-3測定用改良試薬「マトリックスメタロプロテイナーゼ-3キット LZテスト ‘栄研’ MMP-3」の基礎的検討を行った結果、基本性能は良好であった。従来試薬にて確認された、オンボード経過期間に応じた測定値の低下は、改良試薬では改善されていた。また、試薬緩衝液中に劇薬を含まなくなったことで、保管場所等取り扱いの柔軟性が上がった。これらのことより、本試薬は従来試薬と比較し優れた性能を有すると考えられた。

本論文の発表に関連して、開示すべき対象となるCOI関係にある企業はありません。

## 文献

- 1) 安田知弘 他, 関節リウマチにおける血清MMP-3値の臨床的意義, 臨床リウマチ, 2012;24:113-117
- 2) 長澤逸人 他, 関節リウマチ患者における血清マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 (MMP-3) の臨床的意義, 炎症・再生, 2005;25:60-64
- 3) 大内栄子, 岩田和士, 山中寿, 関節リウマチにおける血清MMP-3測定の有用性, Inflammation and Regeneration, 2004;24:154-160
- 4) 三森経世, 自己免疫疾患に関する検査, 奥村伸生 他編, 臨床検査法提要, 第35版, 金原出版: 東京, 2020:957-958
- 5) A. Foroumadi, M. Saeedi, Mercaptoethanol, 2-, Philip Wexler, Encyclopedia of Toxicology, 3rd ed, Elsevier: Amsterdam, 2014:201-202
- 6) Han J.C., Han G.Y., A Procedure for Quantitative Determination of Tris(2-Carboxyethyl) phosphine, an Odorless Reducing Agent More Stable and Effective Than Dithiothreitol, Analytical Biochemistry, 1994;220:5-10

# ICU患者血清検体での血餅浮遊（泡噛みフィブリン）に関する検討

Investigation of floating clots in the serum samples of the intensive care unit

金山幸貴<sup>1)</sup>, 奥村敬太<sup>1)</sup>, 野村鮎美<sup>1)</sup>, 山本裕之<sup>1)</sup>, 服部真一<sup>1)</sup>, 下間雅夫<sup>1)</sup>  
山田幸司<sup>1)</sup>, 稲葉 亨<sup>1),2)</sup>

**Key words** floating clots, samples of the intensive care unit, samples handling

## 1. 緒言

遠心処理後の血清中において血餅が浮遊するいわゆる“泡噛みフィブリン”の発生は、手動による開栓および血餅除去に伴う感染リスクや、再遠心処理の必要性による結果報告の遅延などが懸念される。

当院では、2021年7月から9月にかけて、ICUに入院している患者から採取した血清検体において、頻繁に溶血および血餅浮遊が確認された（最高1日6検体中4検体）。実地で行った聞き取り調査の結果を踏まえて、採血後の検体混和や静置状態と血餅浮遊との因果関係を検討した。

## 2. 対象および方法

健康人5人を対象に、23 G翼状針（ニプロ(株)、大阪）とシリンジ（ニプロ）を併用し、各人静脈血16 mLを採取し、それぞれ血液分注器（極東製薬工業(株)、東京）を用いて生化学・血清学検査用採血管（極東製薬工業）4本に4 mLずつ分注し、各々以下の処理を行った。

- a) 緩やかに5回転倒混和後、縦向き静置
- b) 緩やかに5回転倒混和後、横向き静置

c) 5秒間用手法にて1秒間に5回程度で激しく振盪混和後、縦向き静置

d) 5秒間用手法にて1秒間に5回程度で激しく振盪混和後、横向き静置

いずれも15分後に遠心処理(1500 g, 室温, 10分間)を行い、血清の色調および血餅浮遊の有無を観察した（京都府立医科大学医学倫理審査委員会承認 ERB-C-2263）。

## 3. 結果

a) およびb) において、遠心後の血清中には全例で血餅浮遊は観察されず、血清の色調にも変化は見られなかった。一方、c) の場合は5人中1人(20%)で明らかな血餅浮遊が観察され、d) の場合は全例で明らかな血餅浮遊が観察された。さらに、c) およびd) の全ての検体で目視的な溶血が認められた（Fig. 1）。

## 4. 考察

救急外来やICUから提出される検体は、他の部署からの検体と比較して、検査誤差がより頻繁に発生することが知られている。また、溶血の頻度は約

Received Apr. 24, 2023; Accepted Jul. 20, 2023  
Kouki KANEYAMA<sup>1)</sup>, Keita OKUMURA<sup>1)</sup>, Ayumi NOMURA<sup>1)</sup>, Hiroyuki YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Shinji HATTORI<sup>1)</sup>, Masao SHIMOTSUMA<sup>1)</sup>, Yukiji YAMADA<sup>1)</sup>, Tohru INABA<sup>1),2)</sup>

<sup>1)</sup> 京都府立医科大学附属病院臨床検査部  
Faculty of Clinical Laboratory

<sup>2)</sup> 京都府立医科大学感染制御・検査医学  
Department of Infection and Clinical Laboratory,

Kyoto Prefectural University of Medicine  
〒602-8566 京都府京都市上京区河原町広小路上る梶井町465  
Kamaramachi-Hirokoji, Kamigyō-ku, Kyoto 602-8566, JAPAN.

Corresponding author: 金山幸貴  
TEL: 075-251-5653 FAX: 075-251-5687  
E-mail: kk-0508@koto.kpu-m.ac.jp

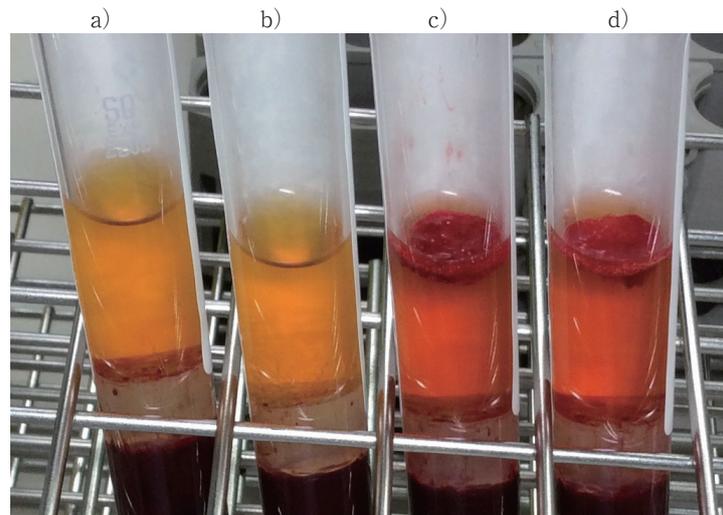


Fig. 1 Gross characteristics of the representative samples after centrifugation.

- Gentle mixing by means of inversions for 5 cycles, followed by vertical placement.
- Gentle mixing by means of inversions for 5 cycles, followed by horizontal placement.
- Manual intense agitation for 5 seconds at rate of 5 cycles per second, followed by vertical placement.
- Manual intense agitation for 5 seconds at rate of 5 cycles per second, followed by horizontal placement.

30%と報告されている<sup>1),2)</sup>。中島らは、調査期間中に行われた全溶血検体のうち、97-100%が救急外来からのものであったことを報告している<sup>3)</sup>。しかし、血餅浮遊に関する詳細な報告は確認できなかった。

当院のICUにおいて、血餅浮遊が頻繁に発生する時期があった。血餅浮遊は、気泡を含んだ血液が凝固することで血餅上部が低比重となり、遠心分離時に一部がちぎれて生じる現象である<sup>4)</sup>。当時、血液は主に血管留置カテーテルからシリンジで採血し、各種採血管に分注された。生化学検査用採血管は、他の抗凝固剤入り採血管と一緒に激しく振盪混和した後、ベッドサイドで横向き静置されていた。今回の検討でも、採血直後に激しく振盪混和し横向き静置した検体では、全例で明らかな血餅浮遊が認められた。今回使用した採血管には凝固促進剤としてシリカが含まれており、これには消泡効果がある。しかし、横向きに静置した場合、採血管内の液体表面積が大きくなり気泡が分散するため、消泡効果が低減すると考えられた。当院のICUでは、血液をシリンジで採血した後、分注器を使用して各採血管に分配しているが、分注器を使用する際には気泡が発生しやすいとされている。血餅浮遊を防ぐためには、血液採取や転倒混和時において、採血管内に気泡が生じていないことを確認することが重要である<sup>5)</sup>。

## 5. 結語

採血や血液の分注では、気泡発生を抑えると共に

気泡消失を妨げない検体の取り扱いに関する周知が重要である。

本研究の発表に関して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

## 文献

- Grant MS. The effect of blood drawing techniques and equipment on the hemolysis of ED laboratory blood samples. *J Emerg Nurs* 2003;29:116-121.
- Soederberg J, Jonsson PA, Wallin O, et al. Haemolysis index – an estimate of preanalytical quality in primary health care. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:940-944.
- 中島美沙, 佐伯綾子, 丸山晃二ほか: 救急外来検体に対する溶血軽減の試み～低陰圧・低容量採血管は末梢静脈留置針からの採血時の溶血を減らす～. *日本臨床検査医学会誌* 2021;69:654-657.
- 松崎廣子. 血清分離剤. *検査と技術* 1994;22:957-963.
- 日本臨床検査標準協議協議会 (JCCLS) JCCLS 標準採血法検討委員会: 標準採血法ガイドライン GP4-A3 学術広報社: 東京, 2019:30-35

再修正

## レボヘム™ APTT SLAを用いたWas-ALD50法による クロスミキシングテストの解釈方法

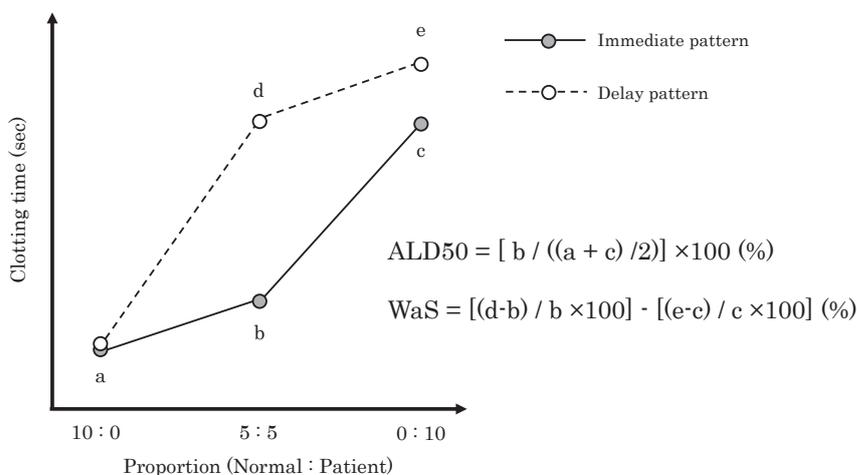
Matrix evolution of cross-mixing test by Was-ALD50 method using Revohem™  
APTT SLA

下村大樹<sup>1)</sup> 熊野穰<sup>2)</sup> 上田香織<sup>3)</sup> 北野圭介<sup>4)</sup> 新井信夫<sup>4)</sup> 嶋田昌司<sup>1)</sup> 上岡樹生<sup>1)</sup>

p.185 (2) 判定方法、Fig. 1

誤)  $ALD50 = [b / (a + c)] \times 100 (\%)$

正)  $ALD50 = [b / ((a + c) / 2)] \times 100 (\%)$



**Fig. 1** Definition of clotting time points for the quantitative indexes in cross-mixing test  
The clotting time points of 10:0, 5:5 and 0:10 for the immediate pattern and 5:5 and 0:10 for delay pattern are defined as a, b, c, d, and e, respectively. The formulas of APD50 and WaS are shown in the figure.

一般社団法人 日本医療検査科学会  
2023年度 第4回理事会

開催日時： 2023年9月3日（日）13時00分～15時00分  
 開催場所： 日本医療検査科学会事務局より web 会議  
 出席者： 高橋聡理事長、清宮正徳理事、石山雅大理事、中山智祥理事、藤巻慎一理事、  
 萩原三千男監事、橋口照人オブザーバー  
 出席方法： 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。  
 欠席者： 大川龍之介理事、堀田多恵子理事、柳原克紀監事  
 議長： 高橋聡理事長  
 議事録作成者： 佐久間 良太

議 題

1. 理事長挨拶

高橋理事長より、ご参集頂いたことへの謝辞があった。

2. 報告事項

2-1. 役割、学術担当について（高橋理事長）（資料1）

各理事の役職および学術担当について資料に基づき報告があった。

2-2. 第37回春季セミナー収支報告（藤巻理事）（資料2）

第37回春季セミナー収支報告について資料に基づき報告があった。

2-3. その他

特になし

3. 審議事項

3-1. 副理事長、指名理事について（高橋理事長）

副理事長として清宮正徳理事を選定および指名理事として橋口照人社員（鹿児島大学）と増田亜希子社員（虎の門病院）を指名する提案があり、審議の結果申請通り承認された。また指名理事については臨時社員総会の議案にて審議することを確認した。

3-2. 委員会委員異動申請（POC、血液）（中山理事）（資料3-5）

POC技術委員会と血液検査機器技術委員会の異動について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. 微生物検査・感染症委員会議事録（中山理事）（資料6）

微生物検査・感染症委員会議事録について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。高橋理事長よりセミナーの実技内容として JACLaS EXPO での機器見学ツアーをする旨の追

加説明があり、藤巻理事よりセミナーに参加いただく企業の選定方法についての質問あった。現状では選定方法などについての規約や主意書などによる明文化もされていないことが指摘に上がった。規約の作成などについて今後の検討課題とすることとなった。

### 3-4. 遺伝子・プロテオミクス技術委員会より外部精度管理調査について(中山理事)(資料7-11)

遺伝子・プロテオミクス技術委員会より外部精度管理調査について資料に基づき説明があった。実施にあたり、今後本学会の外部精度管理調査が参加施設を増やし受検先として推奨されるようにするために「外部精度管理調査の内容書・意向伺い・請求書などの作成」「公正性を図るための菌株・寒天培地の再見積もり」「細かな費用の計算と詳細内容」などを見直す必要があるとの意見があった。審議の結果、実施については承認された。詳細内容については再度審議を続けることとなり、実施日についても延期することとなった。

### 3-5. 第89回POCセミナーについて(藤巻理事)(資料12)

第89回POCセミナー開催概要について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。

### 3-6. 評議員推薦(石山理事)(資料13)

1名の評議員推薦について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. 国際シンポジウムについて国際交流委員会より(橋口オブザーバー)(資料14)

①JACLaS International Awardに選出されなかった学生を対象とする展示会場でのポスター発表掲示に関する申請があり、審議の結果申請通り承認された。

②JACLaS International Awardを受賞した学生に同伴する教員ならびにポスター発表者の計7名の大会参加費免除に関する申請があり、第55回大会では参加費を免除する事とし、次大会以降に関しては再度見直しと規定を作成することとなった。

③Young Scientists Symposiumに関連する海外からの参加者60名の参加費を今回の初年度に限り免除する旨の申請があった。「参加費免除の人数を制限する」等の意見があった。審議の結果、高橋理事長兼大会長と橋口委員長で再度話し合いをすることとなった。

④海外からの参加者に学会参加証明書(英語表記)の発行する旨の申請があり、審議の結果申請通り承認された。

### 3-8. 第56回大会のテーマについて(橋口オブザーバー)

第56回大会テーマ[Knowledge, Heart and Humanity ~知と愛と人と~]について説明があり、審議の結果申請通り承認された。

### 3-9. 2025年(第39回)春季セミナー例会長について(高橋理事長)

第39回例会長について石山雅大先生(弘前大学)が推薦され、石山先生にご検討いただくことになった。

### 3-10. 2024年度事業計画書(清宮理事)(資料15)

定時社員総会議事案および送付資料について資料に基づき内容を確認した。審議の結果、記載内容の修正を確認し申請通り承認された。

### 3-11. 2024年度予算書(清宮理事)(資料16)

定時社員総会議事案および送付資料について資料に基づき内容を確認した。審議の結果、申請通り承認された。

### 3-12. 臨時社員総会について(清宮理事)

(1)開催案内確認(資料17)

(2) 式次第および資料の確認(資料 18)

(3) 出欠はがき確認(資料 19)

3-13. 会員総会資料について(清宮)(資料 20)

会員総会議事案および送付資料について資料に基づき内容を確認した。審議の結果、申請通り承認された。

3-14. その他

中山理事より理事会日程について開催日時の検討の要望があった。審議の結果、開催日程について検討することとなった。

4. その他

4-1. 次回開催日程

(1) 第5回理事会・プログラム委員会

2023年10月6日(金) 10:30~12:50(昼食有) パシフィコ横浜 511&リモート

(2) 臨時社員総会・会員総会・委員会報告

2023年10月7日(土) 16:00~17:30 パシフィコ横浜第1会場&リモート

(3) JCLS/JACLaS 役員集合写真

2023年10月7日(土) 17:40~17:50 横浜ベイホテル東急クイーンズグランドボールルーム

(4) JACLaS 合同情報交換会・各種授賞式

2023年10月7日(土) 18:00~17:50 横浜ベイホテル東急クイーンズグランドボールルーム

以上

2023年9月12日

一般社団法人日本医療検査科学会

議長 高橋 聡 

議事録署名人 萩原 三平   
(出席監事)

一般社団法人日本医療検査科学会  
2023年度 第5回理事会

開催日時： 2023年10月6日（金）10時30分～12時00分  
開催場所： パシフィコ横浜 511+512号室  
出席者： 高橋聡理事長、清宮正徳副理事長、石山雅大理事、大川龍之介理事、  
中山智祥理事、藤巻慎一理事、堀田多恵子理事、  
萩原三千男監事、柳原克紀監事、  
橋口照人オブザーバー、増田亜希子オブザーバー  
欠席者： なし  
議長： 高橋聡理事長  
議事録作成者： 佐久間 良太

1. 理事長挨拶

高橋理事長より、ご参集頂いたことへの謝辞があった。本理事会にオブザーバーとしてご参加いただいた橋口照人先生と増田亜希子先生の紹介があった。また橋口先生と増田先生を指名理事として選出する予定であることを報告した。

報告事項

2-1. 副理事長職務報告（清宮理事）

特になし

2-2. 臨時社員総会について（清宮理事）

(1) 出欠はがき返信数確認（資料1）

資料に基づき下記の説明があった。

評議員：144名

- ・出席：64名（44%）
- ・ハガキによる議決権行使：59名（41%）
- ・合計返信数：123名（85%）
- ・未返信数：21名

出席および書面をもって意思表示した評議員が過半数を有しているため、社員総会の開催が成立することを確認した。

(2) 議事録署名人の選出について

議事録署名人を山崎真一社員（広島大学病院）と稲葉亨社員（京都府立医科大学附属病院）に依頼することを確認した。

(3) 式次第および提出資料の確認（資料2）

式次第およびスライド掲載資料の説明があり、訂正箇所がないことを確認した。

(4) その他

特になし

2-3. 会員総会について（資料3）（清宮理事）

(1) 式次第および提出資料の確認

式次第およびスライド掲載資料の説明があり、訂正箇所がないことを確認した。

(2) その他

特になし

2-4. その他

特になし

3. 審議事項

3-1. 学術委員会議事録（中山理事）（資料4-6）（石川）

「第1回科学技術委員会議事録」「第1回遺伝子・プロテオミクス技術委員会議事録」「第1回生理検査委員会議事録」について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. 委員会異動申請（血液）（資料7-8）（中山理事）（資料）

血液検査機器技術委員会からの委員の異動申請について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. 遺伝子プロテオミクス技術委員会より外部精度管理調査（資料9-14）（中山理事）

遺伝子・プロテオミクス技術委員会の外部精度管理調査について、前回の理事会にて検討事項となっていた「参加費等に関する細かな費用の詳細内容」「外部精度管理調査の実施案内および請求書について」「菌株・寒天培地の再見積もり」を中心に資料に基づき説明があった。これら提出資料について前回までに指摘されていたことは解決されたと思われた。これを踏まえて追加審議の結果以下の様な意見が出た。

- ・高橋理事長より領収書の作成が必要との指摘があった。
- ・高橋理事長より作業にあたる委員への人件費が無くて良いのかとの意見があり、下記の様な意見が出た。

萩原監事：委員会活動内の調査ではあるが、学会の行う事業として正確性を伴う作業となるため品質を担保するための労力への対価としてお支払いするのが良い。

増田オブザーバー：委員会業務であっても規定を設けて、日当や謝金としてお支払いしても良いと思う。

審議の結果、再度検討をすることとなった。また今後は委員活動について規定を作成していく方針となった。

- ・萩原監事より「菌株の輸送会社の選定方法に関する案内」、「輸送時の精度管理（温度管理等）のチェックとそれに伴う報告書の作成」が必要であると意見があった。審議の結果、精度管理を正確に行える輸送業者を選定するために再検討することとなった。
- ・藤巻理事より物価や輸送費などが上がっているため参加費を5,000円程度に上げて良いのではとの意見があった。審議の結果、参加費の見直しをすることとなった。

- ・増田オブザーバーより、参加費を伴う調査のためGoogleフォームではなく有償フォームを利用すべきではないかとの意見があった。審議の結果、会員システム等での管理できるかを確認することとなった。

3-4. 抄録集のPDF化について(資料15)(高橋理事)

高橋理事長より大会抄録集を電子版(PDF化)に切り替える提案があった。審議の結果、実施については承認された。掲載方法などについて、高橋理事長と橋口理事と事務局にて話し合いの上検討することとなった。

3-5. その他

- ・高橋理事長より今後の課題として大会運営や委員会活動に関する規定の作成が挙げられた。
- ・委員会活動について予算作成方法を検討することとなった。
- ・増田オブザーバーより、大会参加費の見直しの際に税区分の確認が必要との提言があった。

4. その他

4-1. 次回開催日程

(1) 理事会

2024年1月28日(日)13:00-14:00(再調整) Web会議

前回の理事会にて会議の開催日時検討の要望があり、理事長より上記日程の前後にて検討し役員に相談することとなった

4-2. その他

特になし

以上

2023年10月/8日

一般社団法人日本医療検査科学会

議長 高橋 聡 

議事録署名人 柳原 克紀   
(出席監事)

議事録署名人 藤子 正男   
(出席監事)

## 一般社団法人日本医療検査科学会

## 2023 年度 臨時社員総会 議事録

日 時： 2023 年 10 月 7 日（土）16:00 ～ 16:20  
会 場： パシフィコ横浜 第 1 会場（503 号室）および Web 会議（Zoom 利用）  
出 席 社 員： 評議員 64 名 はがきによる議決権行使 59 名  
社員の出席方法： 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： 高橋聡理事長、清宮正徳副理事長、石山雅大理事、大川龍之介理事、中山智祥理事、藤巻慎一理事、堀田多恵子理事、萩原三千男監事  
出 席 方 法： 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。  
欠 席 役 員： 柳原克紀監事  
議 長： 高橋聡理事長  
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高橋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、総務担当の清宮副理事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 144 名中、出席者総数 64 名（社員 56 名、役員 8 名）で、葉書による議決権行使者 59 名を含めて全体として 123 名（85%）との報告があった。これを受けて高橋理事長より、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

高橋理事長より議事録署名人として山崎真一社員と稲葉亨社員が選出され、審議に入った。

## 4. 議案

## 第 1 号議案 2024 年度事業計画書

- ・清宮副理事長より、2024 年度事業計画書について、資料に基づき説明があった。
- ・その後質疑応答に入り、特に意見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 2024 年度予算書

- ・清宮副理事長より、2024 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、特に意見なく採決に進み満場一致をもって可決承認された。

## 第 3 号議案 指名理事選出

高橋理事長より指名理事として以下 2 名が推挙された。

- ① 橋口 照人（鹿児島大学病院 検査部）
  - ・意見等はなく採決に進み満場一致をもって可決承認された。
- ② 増田 亜希子（虎の門病院分院 臨床検査部）

・意見等はなく採決に進み満場一致をもって可決承認された。

第4号議案 新規社員（評議員）選出

- ・高橋理事長より規定に則って、新規社員（評議員）4名（平本卓、泉絢子、町田弘樹、宿谷賢一）を選任する説明があった。
- ・その後質疑応答に入り、特に意見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 2025年度春季セミナー（第39回）例会長

高橋理事長より、2025年度春季セミナー例会長に石山雅大先生（弘前大学医学部附属病院）が選出されたと報告があった。

6. 本年度大会（第55回）大会長挨拶

高橋大会長より、挨拶があった。10月7日（大会2日目）時点で2,699名の参加登録があると報告があり、ご参加頂いたことへの謝辞があった。

7. 2024年度春季セミナー（第38回）例会長挨拶

大川例会長より挨拶があった。2024年4月14日（日）に金沢市文化ホールにて「臨床検査のオープンイノベーション」をテーマに開催を予定し、産学連携と国際化との2つの開くべき窓として様々なプログラムを用意しているとの報告があった。

8. 2024年度大会（第56回）大会長挨拶

橋口次期大会長より挨拶があった。2024年10月4日（金）～6日（日）パシフィコ横浜での開催に向け鋭意準備進めているとの報告があった。

9. その他

特になし

10. 閉会

理事長より閉会が告げられた。

以上

2023年11月16日

一般社団法人日本医療検査科学会

議長 高橋 聡



議事録署名人

稲葉 亨



議事録署名人

山崎 真一



# 投稿規定

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

## 原稿作成要領

1. 投稿原稿はA4判用紙にWordファイルで作成した1行40字×1ページ40行（1600字）の原稿をプリントアウトしたものを原則とする。書体は日本語は明朝体、英語はCentury体を本文の基本書式とし、図表はExcel、WordまたはPowerPointファイルで作成する。欧文と数字は1文字のときは全角、2文字以上は半角で入力する。数字と単位の間には半角スペースを入れて記述する。また、入力ソフト名・タイトル・著者名・所属機関名を明記した電子媒体（CDなど）を提出する。原稿の表紙には次の事項を記載する。
  - 1) 表題（和文および英文）
  - 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。本文中の引用箇所は肩付きで、右片括弧にいれて記載する。文献の記載法を別表1に示す。
3. 技術原稿もこれに準ずる、但し英文要旨に替えて和文要旨を要する。
4. 原著の規定頁数は原則として1編につき刷り上がり8頁以内、技術および症例は6頁以内とする（1頁分は1600字に相当する）。  
図と表は、あわせて10枚以内とする（図表は1枚、400字に相当する）。  
短報は刷り上がり2頁以内、図と表はあわせて3枚以内とする。

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

上記の規定頁数を超過した場合はその分の実費を徴収する。

- 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:頁一頁(通巻頁で最初と最後)。

例) 奈良信雄, 室橋郁夫, 松本文枝ほか. マイコプラズマ感染症の診断におけるDNAプロー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)頁一頁。

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; Connecticut, 1994; 370-389.

(抄録集)

発表者名、演題名、抄録集名(学会誌名 発行年(西暦)巻):頁

例) 佐藤勇樹, 近藤崇, 盛合美加子ほか. 新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)新規検出法の検出率に関する検討. 日本医療検査科学会第52回大会抄録集(医療検査と自動化2020; 45(4)): 446.

(ただし、基本的には本学会の抄録集より引用することとする)

## 別表2 度量衡の単位

a) 接頭語には次のものを用いる。

$10^{-18} = a$ (atto)	$10^{-6} = \mu$ (micro)	$10 = da$ (daca)	$10^9 = G$ (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。 $\mu\mu g$  ( $\gamma\gamma$ )  $\rightarrow pg$

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

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

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。 $7g/dL \rightarrow 70g/L$ ,  $100mg/dL \rightarrow 1g/L$  ( $1,000mg/L$ ) 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)  $mol/min/L \rightarrow mol/(minL^{-1})$ , または $mol \cdot min^{-1} \cdot L^{-1}$ 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 Ver.2

1. 投稿者は(一社)日本医療検査科学会会員であるか……………
2. 共著者で非会員がいる場合は「臨時会員入会届」を提出済であるか……………
3. 同じ内容の論文を他誌に発表していないか……………
4. 研究倫理に関して投稿規定に沿っているか……………
5. 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……………
6. 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……………
7. 全著者は本論文投稿への関与を確認し、自署して下さい。

著者名	会員番号 または臨時会員

著者名	会員番号 または臨時会員

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

様式 2-A (論文投稿用)

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

著者名: \_\_\_\_\_

(共著者を含む)

論文題名: \_\_\_\_\_

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

項目	該当の状況	有であれば著者名：企業名などの記載
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) \_\_\_\_\_ ㊞

(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)

(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) \_\_\_\_\_ 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

シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス(株)	141-8673	東京都品川区大崎1-11-1 ゲートシティ大崎ウエストタワー
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

アークレイマーケティング(株)	160-0004	東京都新宿区四谷1-20-20 大雅ビル 3F
アイ・エル・ジャパン(株)	108-0073	東京都港区三田1-3-30 三田神田ビル
(株)アイディエス	861-8038	熊本県熊本市東区長嶺東8-14-30
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
LGC Clinical Diagnostics	01757	37 Birch Street, Milford, MA01757, United States
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
(株)シノテスト	252-0331	神奈川県相模原市南区大野台5-16-41
(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
島津ダイアグノスティクス(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
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
ニッポーメディカル(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)	104-6007	東京都中央区晴海1-8-10 トリトンスクエアオフィスタワー-X 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
PHC(株)	105-0003	東京都港区西新橋3-7-1 ランティック第2新橋ビル7F
(株)日立製作所	105-6412	東京都港区虎ノ門1-17-1 虎ノ門ヒルズビジネスタワー12F
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
富士フイルムヘルスケアマニュファクチャリング(株)三重事業所	510-1222	三重県三重郡菰野町大強原2613-2
富士レビオ(株)	163-0410	東京都新宿区西新宿2-1-1 新宿三井ビル
古野電気(株)	662-0934	兵庫県西宮市西宮浜2-20
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)バリタス	105-0013	東京都港区浜松町1-18-16 住友浜松町ビル6F
(株)ヘレナ研究所	330-0061	埼玉県さいたま市浦和区常盤9-21-19
(株)堀場製作所	601-8510	京都府京都市南区吉祥院宮の東町2
(株)ミズホメディー	841-0048	佐賀県鳥栖市藤木町5-4
ミナリスメディカル(株)	104-6004	東京都中央区晴海1-8-10
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
ロシユ・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5年12月25日現在)

## 編集後記

令和5年は、新型コロナウイルス感染症は終焉したとの世間一般の感覚と、未だに免疫低下者では問題となっている医療施設・社会福祉施設、そして、しばらくは大人しくしていた感があるRSウイルス感染症、インフルエンザなどの流行が見られ、ある意味、医療者にとっては戸惑いと翻弄が続いた年になったのではないかと思います。昨今の燃料費の高騰など医療施設・社会福祉施設にとっては向かい風ばかりの中、昨年と同様に、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、多忙な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。

第49巻1号も無事に発行することができました。総説として、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科血管代謝病理解析分野の橋口照人先生に「自己免疫性後天性凝固因子欠乏症」というタイトルの玉稿を賜りました。この領域における先生の造詣の深さがその行間からも滲み出るか如くの詳細の解説のみならず、総説中の表では各因子の特徴や相違を明確に

教えてくださいました。早速、不勉強を恥じながらしっかり頭に入れようと読み切った次第です。そして、本誌ならではの臨床検査に関する研究内容を丁寧にもとめていただいた原著3篇、技術4編と短編1編についても、本学会の目指すところであるメディカルテクノロジーと産学連携という観点に沿った質の高い論文が掲載されています。さらに、日本医療検査科学会遺伝子・プロテオミクス技術委員会MALDI-TOF MSワーキンググループがまとめてくださった外部制度管理調査報告も掲載されています。形にしてくださったワーキンググループの皆さまに感謝すると共に、委員会やそのワーキンググループの積極的な活動を皆さまにお伝えすることができ日本医療検査科学会理事長・編集委員長として嬉しく思います。

最後になりましたが、会員の皆さまのご多幸とご発展を祈念させていただきます。

(「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

編集幹事 盛田俊介, 横田浩充

編集委員 阿部正樹, 氏家真二, 大川龍之介, 長田 誠, 上岡樹生, 小飼貴彦, 谷直人, 清宮正徳, 千本松孝明, 竹越一博, 中山智祥, 南木 融, 萩原三千男, 春木宏介, 日高 洋, 藤巻慎一, 外園栄作, 前田育宏, 松下 誠, 松村 聡, 三島清司, 柳原克紀, 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49巻 第1号 (通巻第274号)

2024年2月1日発行

発行 一般社団法人 日本医療検査科学会

発行人 高橋 聡

事務所 〒113-0033 東京都文京区本郷4-2-5

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

ホームページ <https://jcls.or.jp> e-mail : [office@jcls.or.jp](mailto:office@jcls.or.jp)

制作 「医療検査と自動化」編集委員会

〒113-0033 東京都文京区本郷2-31-2

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

e-mail : [t-gaku@gk9.so-net.ne.jp](mailto:t-gaku@gk9.so-net.ne.jp)

### 送付先変更等の手続きのご案内

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