

医療検査と自動化

(日本医療検査科学会誌)

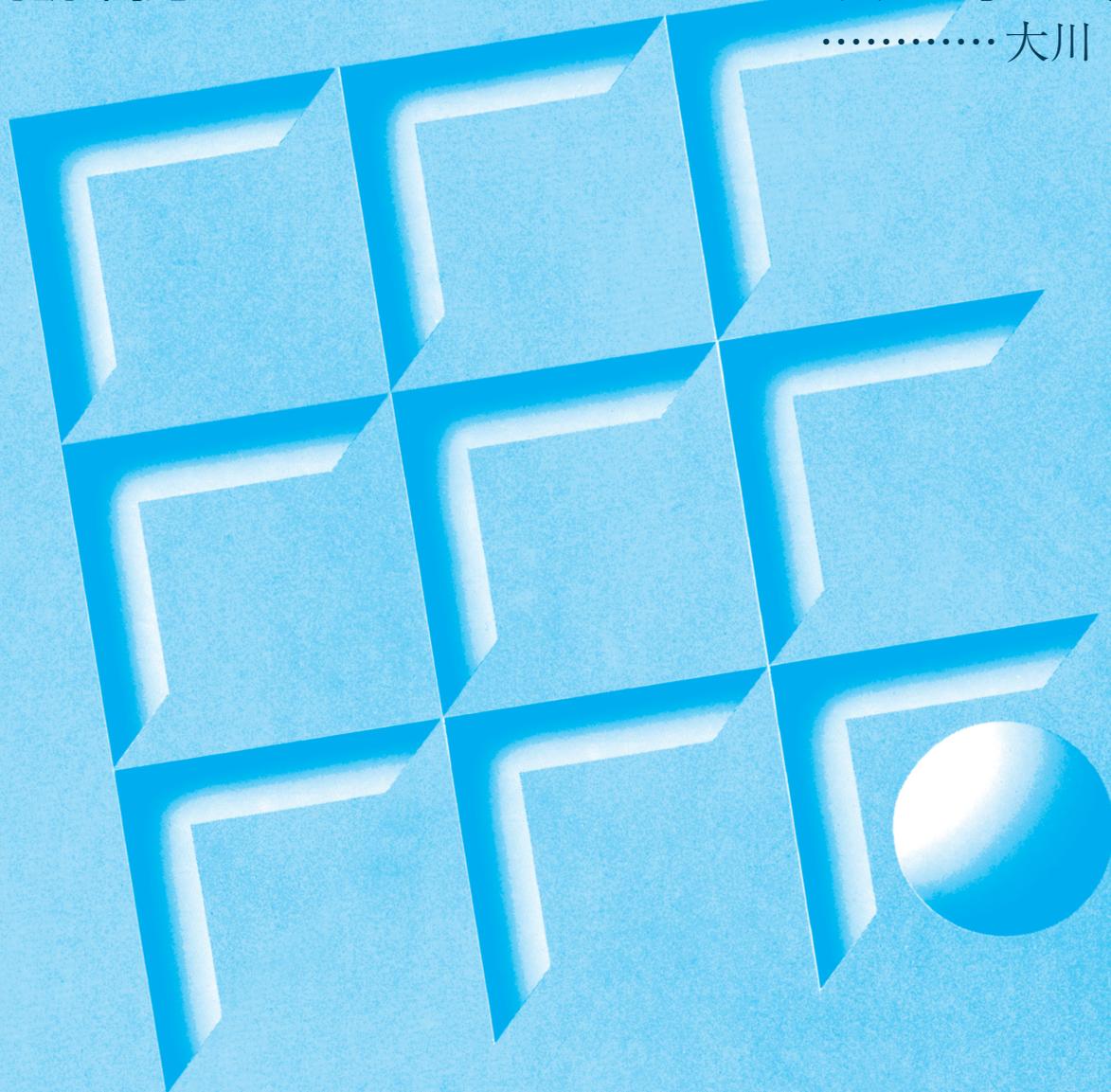
Clinical Laboratory Science Journal

第38回春季セミナー公告(第3報)

第56回大会公告(第3報)

総説:高比重リポタンパク — インパクトの大きい小さな粒子 —

..... 大川 龍之介



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275号 **2**

HITACHI
Inspire the Next

検査の未来を創り、実現する——

検査のワークフローにイノベーションを。

LABOSPECT 008 α

- 最大2,000テスト/時 (比色分析)
- 使いやすさに配慮した新画面デザイン
- LABOSPECT mobile (別売) との接続で装置を遠隔モニタリング

製造販売届出番号：08B2X10005000041
一般的名称：ディスクリット方式臨床化学自動分析装置
一般医療機器 (特定保守管理医療機器該当、設置管理医療機器該当)

本写真は2モジュール構成です。操作部は含まれておりません。



検査室の頼れるパートナー。

LABOSPECT 006

- 最大1,000テスト/時 (比色分析)
- 最小検体分注量1μLを実現
- 搬送ラインと再検バッファーを兼備したラックローターでコンパクト設計

製造販売届出番号：08B2X10005000038
一般的名称：ディスクリット方式臨床化学自動分析装置
一般医療機器 (特定保守管理医療機器該当、設置管理医療機器該当)

Webで行く
展示会
ハイテックEXPO

こちらから▼



臨床検査に
携わる方のサイト
LabCircle

こちらから▼



製品情報は
こちらから



コンパクトボディに機能を集約。

LABOSPECT 003

- 最大320テスト/時 (比色分析、ISE含む)
- サンプル架設数110ポジション
- 緊急、免疫・特殊検査など幅広い用途に対応

製造販売届出番号：08B2X10005001007
一般的名称：ディスクリット方式臨床化学自動分析装置
一般医療機器 (特定保守管理医療機器該当、設置管理医療機器該当)



 株式会社 日立ハイテック

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

<https://www.hitachi-hightech.com/jp/ja/lm/>

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

日本医療検査科学会

第38回春季セミナー公告(第3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3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3月18日(月)まで事前参加登録を受け付けております。
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 ※臨床検査領域講習

「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 検査統括センター 人財育成本部)

「縮まる世界、広がる医療：日本の臨床検査技師の国際的役割」

演者：中川 央充(慶應義塾大学病院 臨床検査科)

「国際資格・国際学会で広がる臨床検査技師活躍の舞台」

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)

「臨床現場と国際研究の両立」

森 大輔(九州大学病院 検査部)

「感染症抑止に向けた微生物学検査の基盤整備に関わる国際貢献活動」

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 ビジョンインキュベイトと未来知実証センター」

講師：松本 邦夫(金沢大学/金沢大学ナノ生命科学研究所/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 医療技術部)

●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ック

【ランチョンセミナー】 12:20～13:10

「市中病院でもできる HPLC による薬物血中濃度測定」

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)

「抗菌薬血中濃度の院内測定開始までの経緯と実際の運用」

演者：菅原 義紀(宮城県立がんセンター 薬剤部/宮城県立がんセンター 感染対策室/

東北医科薬科大学 大学院医学研究科 医学専攻 感染症学)

「薬物血中濃度院内測定を施行した症例とその転帰 一速やかな結果がもたらしたもの」

原崎 頼子(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ック

【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

●NDE 株式会社

【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 ※臨床検査領域講習

「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 試薬・機器推進部 LPPIA ビジネス開発室)

「造血幹細胞移植後合併症である類洞閉塞症候群に対するオートタキシンの臨床的意義」

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/

大阪公立大学大学院医学研究科 臨床検査・医療情報医学)

「東京慈恵会医科大学と島津製作所の産学連携～LC-MS/MS 測定によるビタミン D 測定と基準範囲の設定～」

宮本 博康(東京慈恵会医科大学附属病院 中央検査部)

「新規臨床検査法の開発につながるシーズの創出」

徳原 康哲(香川県立保健医療大学 保健医療学部 臨床検査学科 情報解析検査学)

「AIと生体モニタリングにおける産学連携」

笹野 哲郎(東京医科歯科大学大学院 循環制御内科学分野)

閉会の挨拶 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 医療技術部)

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)

*シンポジウムⅠ、シンポジウムⅡは日本専門医機構 基本領域 臨床検査専門医 認定・更新のための「臨床検査領域講習」(1単位)対象セッションです。

*学会に参加された日本臨床衛生検査技師会会員の方は、生涯教育研修制度の点数・専門教科20点が付与されます。

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3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

特別講演：HIV感染症：世界の動向と日本(仮)

松下 修三(熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター

抗ウイルス療法・血液疾患研究共同研究講座)

教育講演1：高齢化社会への心構え：フレイルを背景とした心不全(仮)

大石 充(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 心臓血管・高血圧内科学分野)

教育講演2：電子カルテの未来像(仮)

宇都 由美子(鹿児島大学病院 医療情報部)

シンポジウム1：臨床検査とAI(仮)

シンポジウム2：難病に寄り添う臨床検査(仮)

シンポジウム3：臨床現場に生きる微生物検査

国際シンポジウム：国際交流委員会「次世代に繋ぐ国際交流(仮)」

国際交流委員会「JCLS国際糖尿病WGシンポジウム(仮)」

国際交流委員会「JCLS若手技師国際交流シンポジウム(仮)」

モーニングセミナー1：薬物代謝と臨床検査(仮)」

モーニングセミナー2：医療DXで加速する臨床検査：デジタルバイオマーカーの展望(仮)

技術セミナー

★科学技術セミナー

★遺伝子・プロテオミクス技術セミナー

★POCセミナー

★POC更新セミナー

- ★血液検査機器技術セミナー
- ★医療情報技術セミナー
- ★微生物検査・感染症技術セミナー
- ★生理検査技術セミナー
- ★一般検査技術セミナー

ランチョンセミナー
機器・試薬セミナー
サテライトセミナー

RCPC

論文賞受賞講演

優秀演題賞講演

JACLaS International Award 受賞講演

JACLaS Award I・II 受賞講演

日本医療検査科学会 第56回大会

(旧:日本臨床検査自動化学会)

大会テーマ **Knowledge, Heart and Humanity**
～知と愛と人と～

演題募集期間 **2024年4月1日(月)～4月30日(火)**

一般演題応募者へのご注意

- (1) 筆頭発表者は、応募時点で必ず正会員でなくてはなりません。ご入会手続き、年会費支払いのない方は演題申し込みができませんのでご注意ください。なお、共同発表者は必ずしも正会員である必要はありませんが、正会員であることが望まれます。正会員には抄録集と補冊が配布されます。年会費は7,000円です。

学会ホームページのオンライン会員システムよりご対応ください。

- (2) 本大会では一般演題の抄録は1ページに2演題の掲載となります。
- (3) 本大会の演題の発表時間その他は、7月下旬以降、発表者へメールでお知らせします。詳細は機関紙「医療検査と自動化」Vol.49-No.4：第56回大会抄録集(8月下旬発行予定)でお知らせします。
- (4) 今年度より「演題名」「氏名」「所属」の英語入力も必須となります。

大会演題発表形式

一般演題の発表形式は口演発表とします。

演題応募要領

会員マイページからの演題申込み(オンライン登録)を行います。



オンライン登録について

- (1) **登録方法**：学会ホームページ (<http://jcls.or.jp/>) の「演題登録」からオンライン登録サイトへお進み下さい。
- (2) **文字数**：本文 800 文字以内(演題名、所属機関、演者名を除く)。図表を含む場合は、図表 1 点のみで 200 字と計算して下さい(但し、2MB 以内)。本文は、他のソフトで作成しコピーペーストすることをお勧めします。Word から本文をコピーして本文に貼り付ける際、会員ページと Word では文字カウント数が異なります。
 - Word = 英単語ひとつで 1 文字としてカウント(例：japan = 1 文字)
 - 会員ページ = 半角 0.5 文字、全角 1 文字としてカウント(例：japan = 2.5 文字)特殊文字等につきましては登録画面を参照して下さい。

図表をアップロードするためには、あらかじめ図表をスキャナー等で取り込むなどして、ファイル形式を GIF、JPEG に変換して下さい。ファイルをオンライン登録画面の指示に従いアップロードして下さい。
- (3) **利益相反 (COI) について**

発表時に COI 情報を開示していただきます。該当する COI 状態については、発表スライドの最初に提示して下さい。提示スライド例は大会ホームページ(下記 URL)に掲載されています。

<https://jcls.or.jp/coi>
- (4) **登録受付期間**：2024 年 4 月 1 日(月)～4 月 30 日(火)

受付期間は延長される可能性があります。学会または大会ホームページにてご確認下さい。

特別講演、教育講演、シンポジウム、各種セミナーの演題登録

会員の場合は一般演題に準じて、会員マイページからのオンライン登録をお願いいたします。但し、特別講演、教育講演の本文文字数は1300字以内、シンポジウム、各種セミナーは800字以内（図表は1点のみで、200字として計算してください。但し、2MB以内）となります。

非会員の場合は、指定の word での提出となります。

詳しくは学会ホームページ (<https://jcls.or.jp>) の「大会情報はこちら」よりご確認ください。

一般演題分類コード

1. 遺伝子・核酸(感染症)	21. 骨マーカー	38. 遠隔医療
2. 遺伝子・染色体(感染症以外)	22. 免疫関連蛋白・検査 (Ig、補体、QFT など)	39. POCT(ベッドサイド検査、在宅 検査など)
3. コンパニオン診断、がん遺伝子	23. 感染症(梅毒など)	40. 救命救急検査・緊急検査
4. プロテオミクス・メタボロミクス	24. 自己抗体(リウマトイド因子など)	41. 先端検査・フロンティア技術
5. その他(遺伝子)	25. 血中薬物・ビタミン	42. 生理検査
6. 細胞機能	26. 腎機能	43. 病理・細胞診
7. 血球計数・形態	27. 尿分析	44. 輸血検査
8. 血小板・凝固・線溶	28. その他(化学・尿)	45. 管理運営(経営、効率、教育など)
9. その他(血液・凝固)	29. 脳脊髄液・便・体液	46. 第三者認定(ISO など)
10. 蛋白・含窒素・生体色素	30. 微生物検査	47. 統計・データマイニング
11. 脂質・リポ蛋白	31. 標準物質・標準化・不確かさ	48. チーム医療・検査相談・臨床 支援・患者関連
12. 金属・電解質	32. 精度管理 (IQC、EQC、QA、QMS など)	49. 病態解析・治験
13. 酵素	33. 検査情報システム (搬送、LAS、HIS)	50. 症例・事例検討
14. 内分泌(ホルモン測定など)	34. 情報分析	51. 症例・事例報告
15. 肝機能	35. 医療情報システム	52. 検査教育
16. 肝炎マーカー	36. 採血・検体採取・前処理	53. 予防医学
17. 腫瘍マーカー	37. 装置の性能評価	54. 小児臨床化学
18. 心筋マーカー		55. その他
19. 糖尿病マーカー		
20. 炎症マーカー		

本大会では、優秀演題の筆頭者に対して、優秀演題賞を授与します。対象者は本学会会員とします。受賞者は抄録集に発表され、賞状並びに副賞の授与を行います。

一般社団法人日本医療検査科学会(以下、JCLS)と一般社団法人日本臨床検査機器・試薬・システム振興協会(以下、JACLaS)は、臨床検査を習得する学生を対象に日本医療検査科学会第56回大会において学生演題を幅広く募集し、優秀者には優秀演題賞としてJACLaS Awardを顕彰致します。

対象者は2024年10月の時点で専門学校生・短期大学生・学部生、または大学院生とします(ただし社会人大学院生を除く)。受賞者は抄録集に発表され、賞状並びに副賞の授与を行います。詳しくは学会ホームページ(<https://jcls.or.jp>)の「大会情報はこちら」よりご確認ください。

学術委員会 2024 年度活動予定

1. 科学技術委員会

第1回委員会 4月13日(土)

金沢市文化ホール(現地および Zoom 会議)

第2回委員会 10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定

パシフィコ横浜(現地および Zoom 会議)

○技術セミナーの開催

テーマ: 極端値・パニック値対応マニュアル Ver.2

10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定 パシフィコ横浜

○発刊予定

科学技術委員会マニュアル第23集 2025年1月発刊予定

テーマ: 未定

2. 遺伝子・プロテオミクス技術委員会

第1回委員会

4月13日(土)

金沢市文化ホール(現地および Zoom 会議)

第1回 MALDI-TOF MS WG

4月13日(土)

金沢市文化ホール(現地および Zoom 会議)

第1回がんゲノム検査の評価と規制に関する基本的考え方 WG

4月13日(土)

金沢市文化ホール(現地および Zoom 会議)

第2回委員会

10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定

パシフィコ横浜(現地および Zoom 会議)

第2回 MALDI-TOF MS WG

10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定

パシフィコ横浜(現地および Zoom 会議)

第2回がんゲノム検査の評価と規制に関する基本的考え方 WG

10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定

パシフィコ横浜(現地および Zoom 会議)

○技術セミナー開催

テーマ: 未定

10月4日(金)(予定) パシフィコ横浜

定員: 100名(予定) ※事前登録要

○発刊予定

遺伝子・プロテオミクス技術委員会監修による

日本医療検査科学会誌・補冊

テーマ：遺伝子・プロテオミクス技術委員会の活動に関連した内容を検討中

3. POC 技術委員会

第1回委員会 4月13日(土)

金沢市文化ホール(現地および Zoom 会議)

第2回委員会 10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定

パシフィコ横浜(現地および Zoom 会議)

○ POC セミナーの開催

第91回 POC セミナー (Web)

テーマ：認定試験対策基礎講座(1)

7月～8月予定

第92回 POC セミナー (Web)

テーマ：認定試験対策基礎講座(2)

7月～8月予定

第93回 POC セミナー

テーマ：大量出血時の止血戦略と POCT(仮題)

10月4日(金)(予定) パシフィコ横浜

定員：120名(予定) ※事前登録要

第94回 POC セミナー(第71回日本臨床検査医学会学術集会との共催予定)

テーマ：未定

11月28日(木)～12月1日(日)のいずれかで開催予定 大阪

○第15回認定 POC コーディネーター更新セミナー

テーマ：POC コーディネーターの活動経験を聞き問題点を共有しましょう(仮)

10月6日(土)(予定) パシフィコ横浜

○認定 POC コーディネーター試験

10月7日(日) 15:00～17:00 パシフィコ横浜

※事前申請要

4. 血液検査機器技術委員会

第1回委員会 4月13日(土)

金沢市文化ホール(現地およびZoom会議)

第2回委員会 10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定

パシフィコ横浜(現地およびZoom会議)

○技術セミナー開催

テーマ:「ここまで進歩したフローサイトメトリー検査(仮)」

10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定 パシフィコ横浜

○発刊予定

2025年度発刊予定テーマ:「血液検査に役立つ自動血球計数装置の基礎知識と再検方法および症例解析」

5. 微生物検査・感染症委員会

第1回委員会 4月中(Zoom会議):議題 技術セミナーの内容

第2回委員会 9月中(Zoom会議):議題 技術セミナーの役割者

○技術セミナー開催

テーマ:未定

10月4日(金)(予定) パシフィコ横浜

定員:100名(予定) ※事前登録要

6. 医療情報委員会

第1回委員会 4月13日(土)

金沢市文化ホール(現地およびZoom会議)

第2回委員会 10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定

パシフィコ横浜(現地およびZoom会議)

○技術セミナー開催

テーマ:調整中

10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定 パシフィコ横浜

7. 生理検査委員会

第1回委員会 4月13日(土)

金沢市文化ホール(現地およびZoom会議)

第2回委員会 10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定

パシフィコ横浜(現地およびZoom会議)

○技術セミナー開催

テーマ:生理検査四分野の外部精度管理を考える

10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定 パシフィコ横浜

8. 国際交流委員会

- 第1回委員会 4月13日(土)
金沢市文化ホール(現地およびZoom会議)
- 第2回委員会 10月4日(金)～6日(日)で開催予定
パシフィコ横浜(現地およびZoom会議)

○シンポジウムの開催

- テーマ：次世代に繋ぐ国際交流(仮)
- 10月4日(金) 13:00～15:00(予定) パシフィコ横浜
「JCLS 国際糖尿病 WG シンポジウム(仮称)」
- 10月6日(日) 13:00～15:00(予定) パシフィコ横浜
「JCLS 若手技師国際交流シンポジウム(仮称)」

9. 一般検査委員会

- 第1回委員会 4月13日(土)
金沢市文化ホール(現地およびZoom会議)
- 第2回委員会 10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定
パシフィコ横浜(現地およびZoom会議)

○技術セミナーの開催

- テーマ：未定
- 10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定 パシフィコ横浜

10. 編集委員会

- 第1回委員会 10月4日(金)～6日(日)のいずれかで開催予定
パシフィコ横浜(現地およびZoom会議)

目次

学会ニュース

総説

高比重リポタンパク — インパクトの大きい小さな粒子 — 大川龍之介… (75)

第55回大会シンポジウム講演要旨

●凝固検査の課題と今後の展開

凝固検査における Turnaround time についての進歩と課題 及川 真依… (88)

凝固波形を活用した血栓止血分野の新展開 徳永 尚樹… (91)

抗リン脂質抗体関連検査 山崎 哲… (97)

●LC-MS/MS (質量分析装置) による臨床検査としての薬物濃度測定

LC-MS/MS の臨床検査応用における自動化への取り組みと欧州の最新動向 川上 大輔… (103)

LC-MS/MS 法による血中免疫抑制剤濃度の測定と検査部での運用の実際 鈴木 瑛真… (108)

造血幹細胞移植における免疫抑制剤の薬物血中濃度測定の意義 井山 諭… (112)

●POCTの精度管理、危機管理を探る ～精度保証できていますか？～

POCT 機器管理・精度管理が出来ていない状況について 津田 喜裕… (117)

ISO 取得施設の POCT 機器の機器管理・精度保証の実態 後藤 慎一… (121)

技術

脳神経外科領域の髄液細胞検査における多項目自動血球分析

装置 XN-3000 BF モードの有用性について 深谷 仁… (126)

Rivaroxaban は凝固因子インヒビター模擬検体および

サーベイ検体として有用である 荒尾ほほみ… (133)

全自動化学発光酵素免疫測定システムルミパルス L2400 を用いた

「SARS コロナウイルス抗原キットルミパルスプレスト SARS-CoV-2 Ag」の

性能評価 大久保 学… (141)

SARS-CoV-2 検査における唾液検体処理に関する検討 及川 真依… (147)

理事会議事録 (153)

CONTENTS

JCLS News

Review

High-density lipoprotein — small particles with a big impact — Ryunosuke OHKAWA···(75)

Symposium of the 55th Congress

● Challenges and future developments in coagulation testing

Progress and challenges of turnaround time in coagulation testing. Mai OIKAWA···(88)

New development in the field of thrombosis

and hemostasis using clot waveform Naoki Tokunaga···(91)

Laboratory testing for antiphospholipid antibodies Satoshi YAMAZAKI···(97)

● Therapeutic drug monitoring with LC-MS/MS

Automated LC-MS/MS for Clinical Laboratories

and Recent Trends in Europe Daisuke Kawakami···(103)

Analysis of immunosuppressant drug in blood by LC-MS/MS method

and practical application in laboratory. Ema SUZUKI···(108)

Significance of therapeutic drug monitoring of immunosuppressive agents

for hematopoietic stem cell transplantation. Satoshi IYAMA···(112)

● Exploring accuracy and crisis management around POCT

~ Are you ready to guarantee accuracy? ~

The situation of the lack of POCT instrument management

and accuracy control Yoshihiro Tsuda···(117)

Equipment management and accuracy assurance of POCT equipment

in ISO certified facilities Shinichi Goto···(121)

Reports

Utility of the body cavity fluid mode of automated hematology analyzer XN-3000

in cerebrospinal fluid examination in neurosurgery Hitoshi FUKAYA···(126)

Rivaroxaban is useful as the simulated specimen of inhibitor to

coagulation factor and the survey specimen. Hohomi ARAO···(133)

Basic performance of the reagent kit LUMIPULSE Prest

SARS-CoV-2 Ag using the automatic immune analyzer L2400 Manabu OKUBO···(141)

Investigation about saliva sample treatment in Lumipulse

SARS-CoV-2 antigen test. Mai OIKAWA···(147)

Boad Meeting Minutes (153)

高比重リポタンパク — インパクトの大きい小さな粒子 —

High-density lipoprotein — small particles with a big impact —

大川龍之介

1. はじめに

脂質異常症診断基準の一つとして、現在、血清高比重リポタンパクコレステロール (High-density lipoprotein-cholesterol; HDL-C) の定量がおこなわれており、HDL-C 40 mg/dL未満が低HDL-C血症として、冠動脈疾患や脳梗塞（主にアテローム血栓性脳梗塞）の発症リスク因子に規定されている（日本動脈硬化学会 動脈硬化性疾患予防ガイドライン2022年版）。これはHDLが抗粥状動脈硬化能を有するからであり、HDL-Cの定量によっておよそのHDL粒子の量を把握できるからである。一方、血清中のHDL-C濃度が高いあるいは薬剤によってHDL-Cを増加させた人々が必ずしも冠動脈疾患のリスクが低いわけではないことが明らかになっており、これはHDL-Cの量＝抗粥状動脈硬化能ではないことを意味している。それではなぜ、このようなことが起こるのか、それはHDLが様々な種類の粒子の総称であり、それぞれの機能が異なることに起因している。

本稿では、HDLの多様性について、主に当研究室で明らかにした知見を中心に述べ、日ごろHDL-Cを検査しあるいは検査値として取り扱っている読者のみなさまに、HDLの奥深さ、面白さを知っていただきたい。

2. HDL-Cの検査

HDL-Cの測定は古くから行われており、多くの心血管疾患のリスクファクターを明らかにした大規模コホート研究であるFramingham Studyにおいて

も、およそ50年前にはHDL-C濃度と冠動脈疾患発症イベントとは逆相関することが既に報告されている^{1,2)}。また我が国においても、低HDL血症の患者は虚血性心疾患の発症リスクが高いことが示されている³⁾。これは、HDLの多彩な抗粥状動脈硬化能（後述）によると考えられており、そのため、これまでに薬剤を用いてHDL-Cを増加させる試みが行われてきた。水溶性ビタミンであるナイアシンあるいはその徐放製剤を服薬すると、血清HDL-C濃度の平均6~7 mg/dLの増加が認められた^{4,5)}。しかしその一方、心血管疾患イベント発症のリスクの軽減効果は認められなかった。そこで、よりHDL-C濃度を増加させる効果のあるコレステロールエステル転送タンパク (cholesteryl ester transfer protein; CETP) 阻害剤が次々と開発され (トルセトラピブ⁶⁾、アナセトラピブ⁷⁾、エバセトラピブ⁸⁾、ダルセトラピブ⁹⁾)、それらの薬剤の臨床試験が試みられた。これらの薬剤は最大でHDL-Cの約60 mg/dLもの濃度の増加に成功したが、ナイアシンと同様にリスクの軽減は認められなかった。それでは本当にHDL-Cは高ければ良いのだろうか。疫学的研究により、HDLが極端に高い群で、むしろ冠動脈疾患の死亡リスクが高いことも報告されており¹⁰⁾ (Fig. 1), またこれは海外だけでなく、日本人を対象とした調査でも同様であった¹¹⁾。これまでの数々の報告により、HDL-Cの定量が動脈硬化性疾患の評価に有用であることは間違いないが、すべての患者を反映しているわけではなく、相反する患者も存在する。こういった矛盾が生じる一つの理由として、HDL粒子の複雑さゆえに起こる、HDLコレステロール濃度とHDL抗粥状動脈硬化能の不一致が挙げられる。それでは、このHDL粒子とは一体何であろうか。

3. HDLとは

コレステロールはリン脂質とともに細胞膜の主要な構成成分として、また中性脂肪はエネルギー源と

Ryunosuke OHKAWA
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
〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45
TEL : 03-5803-5374
E-mail : ohkawa.alc@tmd.ac.jp

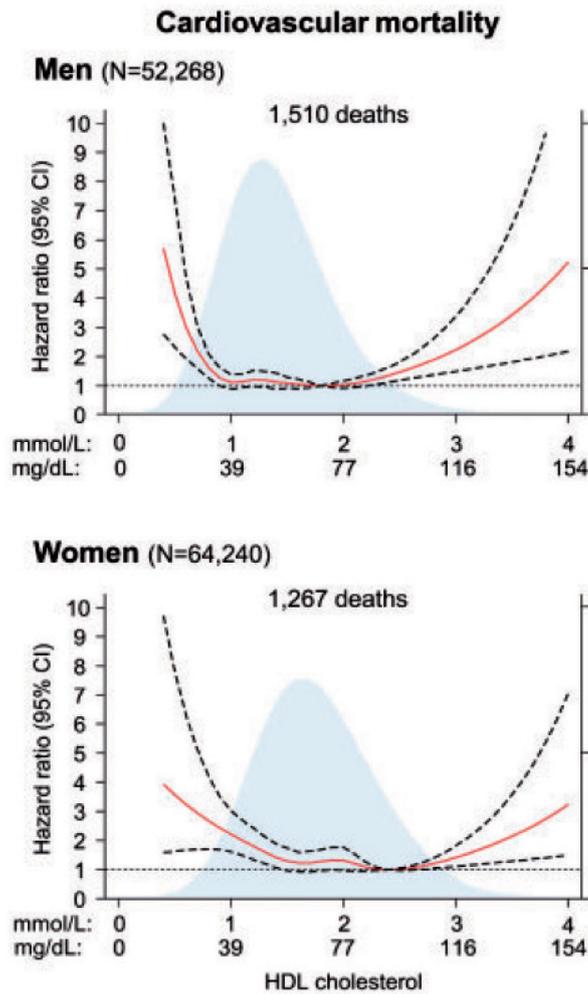


Fig. 1 HDL-C濃度と冠動脈疾患関連死（ハザード比）との関係
 年齢, BMI, 喫煙（喫煙歴も含む）, 飲酒, 運動, 収縮期血圧, 糖尿病, 脂質低下療法, LDL-C, 中性脂肪, 年齢, 閉経の有無, ホルモン補充療法（女性）による調整済み。実線:ハザード比, 破線:95%CI, 薄色のグラフはHDL-Cの分布。(引用文献10より抜粋)

して全身の組織に必要な不可欠である。したがって、食事や肝で合成されたコレステロールや中性脂肪は各組織に血液を介して運搬される必要がある。しかしながら、コレステロールや中性脂肪は水にほとんど溶けないため（コレステロールの水への溶解度約 $95\mu\text{g/L}$ (30°C)) であるため、直接血液中には溶解せず、リポタンパクと称される両親媒性のリン脂質とタンパク（アポリポタンパク；apolipoprotein; apo）からなる被膜に包まれた粒子体に包含され運搬される。リポタンパクは構成する脂質やapoの種類や量の違いによって比重が異なり、密度（ d ）の小さい方からカイロミクロン（Chylomicron; CM）（ $d < 0.96$ ）、超低比重リポタンパク（very low-density lipoprotein; VLDL）（ $d = 0.96 \sim 1.006$ ）、中

間比重リポタンパク（IDL）（ $d = 1.006 \sim 1.019$ ）、低比重リポタンパク（low-density lipoprotein; LDL）（ $d = 1.019 \sim 1.063$ ）、HDL（ $d = 1.063 \sim 1.210$ ）（あるいはHDLのサブクラスとしてHDL₂（ $d = 1.063 \sim 1.125$ ）とHDL₃（ $d = 1.125 \sim 1.210$ ））の6つのリポタンパク分画として分類される。生体内において、CMは主に食事から得られる中性脂肪、VLDLは肝臓で合成された中性脂肪、LDLは肝臓で合成されたコレステロールを末梢に運搬するなど、それぞれのリポタンパクで異なる役割を担っている。HDLはリン脂質とタンパクに富んだ粒子であり、最も粒子サイズが小さく比重が高いリポタンパクである。よく知られている役割としては、末梢から肝臓へコレステロールを運搬するコレステロール逆輸

送であるが、HDLは他のリポタンパクとは大きく異なり、より多くの種類が存在し、それに応じて多彩な機能を有している（後述）。

4. HDLの代謝

HDLの生体内における誕生は、肝や小腸で合成され分泌されたapoA-Iというタンパクから始まる。分泌されたapoA-Iは末梢組織のATP結合カセット輸送体A1（ATP binding cassette transporter; ABCA1）からコレステロールやリン脂質を受け取る。脂質を受け取ると徐々に比重が軽くなり、やがて円盤状のHDLになる。円盤状のHDLはレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（lecithin : cholesterol acyltransferase; LCAT）の作用によって、含有するホスファチジルコリン（レシチン）の脂肪酸が遊離コレステロールに転移され、コレステリルエステルに変化する。これにより、より極性の低いコレステリルエステルは粒子の内部に移行し、HDLが球状へと変化する。成熟したHDLは、最終的に肝臓のスカベンジャー受容体を介して取り込まれ、胆汁中にコレステロールが排出される（HDLのコレステロール逆輸送）。また、HDLはCETPの働きによってコレステロールをVLDLに渡し、逆にVLDLから中性脂肪を受け取る。コレステロールを受け取ったVLDLはIDLを経てLDLへと変化する。この際に、HDLは他のリポタンパクと様々なapoの交換も行っている。また最近われわれは、このHDLのコレステロール逆輸送に赤血球も深く関与していることや、HDLやLDLが赤血球とコレステロールを多量に交換しあっていることなども示している^{12,13)}。

このように、HDLは血液を循環する過程で、他のリポタンパクや組織から様々な脂質やタンパクを受け取ることが知られており、これがHDLの多様化を生み出す理由の一つと考えられている。

5. HDLの多様性

HDLはapoA-Iというタンパクがコレステロールやリン脂質、中性脂肪を徐々に受け取り変化するため、HDLといっても脂質の含有量の異なる様々なHDLが存在する。つまり、すべてのHDLが1粒子に○分子といった一定量のコレステロールを含むというわけではなく、1粒子に含まれるコレステロール含有量の異なるいくつものHDLが存在する。したがって、日ごろ検査されているHDL-Cの値が、HDL粒子の数を必ずしも反映していないということは、上記のHDLの代謝から考えると明白である。

タンパクの観点においてもHDLは多様性に富んでいることがわかる。前述のようにHDLは他のリポタンパクや組織から様々なタンパクを受け取る。Vaisarらは、超遠心によって分離したHDL分画中のタンパクをShotgun proteomicsにより分析し、HDL分画には48種類のタンパクが存在することを示している¹⁴⁾。HDLの分子量は、小さいもので75,000、大きいもので350,000程度であり、当然ながら1つのHDL粒子にこれらの48種類のタンパクを含んでいるわけではない。これはHDLという比重で定義された粒子群（ $d = 1.063 \sim 1.210$ ）の中に、異なるタンパクを含んでいるいくつもの粒子が存在することを意味する。繰り返しになるが、HDL-Cの測定というものは、コレステロールの含有量の異なるHDL、種類の異なるタンパクを含んでいるHDLをひとくくりにして表現したものである。つまり、ヒトによって同じHDL-C濃度を有していても、それらのHDLの粒子が抱えるタンパクの種類や量も異なっている（機能の高低が異なる）。

6. HDLの機能

前述のように、HDLは含有する様々なタンパクの作用によって抗粥状動脈硬化能のみならず多彩な機能を生体内で発揮している。その代表的な役割を下記に紹介する。

1) 血管内皮細胞における一酸化窒素（NO）の産生や損傷の修復

血管内皮は単に血管内腔と血管壁を隔てるだけでなく、血管の拡張や収縮に関わる分子を分泌し、血液循環の恒常性を保っている。血管内皮細胞の障害はこの拡張・収縮調整の破綻や炎症促進、さらには動脈硬化の進展に深く関わっている。血管拡張作用因子として重要な分子の一つが血管内皮細胞で産生されるNOである。狭心症の胸痛時に服薬する薬剤としてニトログリセリンがよく知られているが、これは体内で加水分解されて生じる硝酸がさらに還元された際にNOが産生され血管を拡張するためである。生体内では、血管内皮細胞に局在する内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）がNO産生に寄与している。HDLに含まれるapoMは、スフィンゴシン1-リン酸（S1P）という生理活性リン脂質のキャリアータンパクであり¹⁵⁾、HDLに含まれるS1Pが血管内皮のS1P受容体3（S1P3）を介してeNOSを活性化させ、NO産生を促進し血管拡張に働くことが報告されている¹⁶⁾。また、HDLはSR-BIを介しても同様にNO合成を刺激する^{17,18)}。さらに、HDLは

NO 依存的に血管内皮細胞の遊走を促進し、損傷した血管内皮の修復に役立っている^{19,20)}。また、S1P を含む apoM だけでなく、apoA-I も血管内皮の修復に関与する。apoA-I は血管内皮細胞前駆細胞の増殖を促進し、血管形成に貢献したり²¹⁾、アンジオポエチン Angiopoietin-like protein 4 の発現を促進し、血管新生を促したりすることが報告されている²²⁾。

2) 単球遊走の抑制

粥状動脈硬化病変の形成の初期段階として、血管内皮細胞の活性化に伴って分泌される monocyte chemotactic protein 1 などにより単球の遊走が促進、血管内皮細胞への接着が引き起こされる。この単球由来のマクロファージがやがて LDL を貪食、泡沫細胞化し粥状動脈硬化形成に寄与する。HDL にはこの単球の遊走を抑制する作用があり、LDL によって刺激した単球に HDL を添加すると単球遊走が阻害される²³⁾。Murphy らは、ヒトから単離した単球の CD11b の活性化を HDL が抑制すること示している²⁴⁾。また同研究者ら研究において、抗 ABCA1 抗体を用いて ABCA1 を阻害すると、単球抑制効果が減弱した。したがって、ABCA1 のリガンドである apoA-I が HDL の単球遊走抑制能を担っていると示唆している。

3) 抗酸化能

粥状動脈硬化形成には LDL の酸化が深く関わっている。なぜなら、LDL が酸化され酸化 LDL となると、血管内皮下に存在するマクロファージがスカベンジャー受容体を介して貪食し、コレステロールに富んだ泡沫細胞となり、この泡沫細胞の蓄積がプラーク形成の元となるからである。LDL が酸化を受けると 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (15-HPETE) や 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid (13-HPODE) といった過酸化脂質が生じるが、apoA-I はこれらの過酸化脂質を取り除き、LDL 中の 15-HPETE、13-HPODE などの増加を防ぐ効果がある²⁵⁾。また、HDL に含まれるパラオキシナーゼ 1 (paraoxonase 1; PON1) は、HDL に引き込んだ過酸化脂質を加水分解することで抗酸化に働くことが知られている^{26,27)}。

4) コレステロール引き抜き能

HDL は平均粒子径 7~10 nm と非常に小さな粒子であり、血管内から血管内皮を擦り抜けて血管内皮下にある動脈硬化巣に容易に到達することができる。そこで、HDL が粥腫 (プラーク) の元となる泡沫細胞 (細胞内にコレステロールを豊富に含む細胞)

に接すると主に細胞表面に発現するコレステロールトランスポーターを介してコレステロールを引き抜く。この能力を HDL のコレステロール引き抜き能といい、プラーク形成の予防に役立っている。また上記のトランスポーターは複数知られており、apoA-I や pre- β HDL のような小さな HDL は ABCA1 を介して²⁸⁾、より大きな HDL は ABCG1 や scavenger receptor class B type I (SR-B I) を介してコレステロールを引き抜くことが知られている²⁹⁾。

5) その他の機能

紙面の都合上、詳細は割愛するが、HDL は上記以外にも各種疾患に予防的な効果が認められている：糖尿病 (ラ島 β 細胞の生存維持、アポトーシス阻害、酸化からの保護やインスリン抵抗性の改善)、炎症性疾患、腎疾患、腫瘍 (腫瘍抑制、癌の予後の改善)、感染症など³⁰⁾。ただし、一部の疾患では、HDL は関連がないという報告もあり、さらなる研究が必要である。

7. HDL の機能不全

筆者らは、生体内で引き起こされる HDL の修飾とそれが与える HDL 機能への影響について調べてきた。本項では、その一部を紹介したい。

1) PON1 の転送

超遠心で分離した HDL を、LDL および硫酸銅で酸化して作製した酸化の程度の異なる酸化 LDL と接触させた後、再び超遠心で分離した LDL および酸化 LDL 中の PON1 の酵素活性を測定すると、酸化の程度依存的に酸化 LDL 中に高い PON1 活性が検出されることをわれわれは見出した³¹⁾。また、これらの HDL と LDL および酸化 LDL の混合液をゲルろ過クロマトグラフィーによって粒子サイズごとに分画し、各分画中の PON1 活性を測定すると、同様に酸化 LDL の分画中に高い PON1 活性が得られることを確認した。さらに、ウェスタンブロットによっても酸化 LDL 中には高濃度の PON1 タンパクが検出された。つまり、HDL の抗酸化能に重要な PON1 が酸化 LDL によって HDL から奪われることを意味している。Gugliucci らは、血清を 37°C でインキュベーションした後に各リポタンパク分画の PON1 の酵素活性を調べると、small dense LDL に PON1 活性の増加がみられることを報告している³²⁾。酸化 LDL によって HDL の抗酸化能を担う PON1 が乖離することは HDL の機能の低下につながると思われるが、逆に PON1 が酸化 LDL に転送される

ことで、LDL酸化の抑止に作用しているとも考えられる。実際に、酸化LDLをPON1で前処理したoxLDL-PON1をマクロファージに貪食させると、未処理のoxLDLを貪食させた場合より、その後のコレステロール引き抜きによる泡沫細胞からのコレステロールの除去が促進されるという報告もある³³⁾。

2) 炎症下におけるHDLの変化

炎症が引き起こされると肝臓から血清アミロイドA (serum amyloid A; SAA) が分泌され、その血中濃度は非炎症時の1,000倍にもなる。このSAAのほとんどがHDL粒子に結合することが知られている。われわれは、SAAをHDLに添加すると、SAAがHDLに結合するとともにapoA-Iが離脱されSAA含有HDLとなるが、予想とは異なり、このSAA含有HDLは通常のHDLより高い抗酸化能を有することを見出した³⁴⁾。この現象を裏付けるために、SAAタンパクとapoA-Iタンパクの抗酸化能を比較すると、SAAタンパクの方が抗酸化能が高かった。またCRP値にて炎症の程度の異なる患者血清を分類し、各患者血清中のSAA濃度の測定およびHDLの抗酸化能を比較すると、CRP高値群ではSAAがより高く、この患者の高SAA含有HDLは低SAA含有HDLよりも抗酸化能が高いことを示した³⁴⁾。これらの実験は、炎症の程度の異なる別の患者の血清中のHDLを比較したものであるため、同一患者の炎症・非炎症を比較すべく、次に、形成外科的手術の前後の血清中のHDLを比較した。結果、手術3日後に血清SAA濃度はピークに到達し、その血清から分離したHDLには高濃度のSAAが検出された³⁵⁾。これらのHDLをNative-PAGEで解析すると、SAAの濃度依存的に小粒子のHDLが消失していることを報告した。これらのSAAの濃度の異なる同一患者からの血清でもHDL機能の変化を調べる必要があり、今後解析する予定である。

3) プラーク中に存在する酵素による修飾

マクロファージから放出されるミエロペルオキシダーゼ (MPO) によってapoA-IとapoA-IIのヘテロダイマーが形成される³⁶⁾。前述のように、HDLは単球遊走抑制能を有しているが、上記のMPOによって修飾されたHDLは単球遊走抑制能が減弱していることを明らかにした³⁶⁾。この単球遊走抑制能はHDLの評価法として用いられており、他の研究者らの研究により、冠動脈疾患患者のHDLではこの機能が減弱していることが示されている³⁷⁾。さらに、wound-healing assayにて、物理的に損傷させ

た血管内皮細胞にHDLを添加すると血管内皮細胞は修復するが、MPOで処理をしたHDLでは、この血管内皮細胞修復能が弱まっていることを明らかにした³⁸⁾。また、以前当研究室では、ELISA法による上記のapoA-I/apoA-IIヘテロダイマーの定量法を開発している。サンプル数は少ないが、急性心筋梗塞患者の血漿中のapoA-I/apoA-IIヘテロダイマー濃度を測定すると、健常者と比較して高値を示すことを示した³⁹⁾。

プラーク中には活性化した肥満細胞も存在する。この活性化肥満細胞から産生されるキマーゼは中性のセリンプロテアーゼであり、アンジオテンシンIからアンジオテンシンIIへ変換することがよく知られているが、他のタンパクも切断することが知られている。当研究室では、キマーゼがapoA-Iを断片化すること、この断片化apoA-Iに特異的に反応する抗体を用いて健常者血清中にも断片化apoA-Iが存在することを示している⁴⁰⁾。このキマーゼによるapoA-Iの断片化は、超遠心で分離したHDLにキマーゼを直接処理した場合ではほとんど起こらない。ところが、上記のMPOによって修飾を受けたHDLにキマーゼを作用すると、精製apoA-Iに対するキマーゼ処理とは異なる断片化apoA-Iが生じ、さらにその断片化apoA-IはC末端側のTyr100で切断されていることを報告した⁴¹⁾。この断片化apoA-Iは、MPOやキマーゼが多く存在するプラークを有する冠動脈疾患患者で増加している可能性があり、新たなバイオマーカーの可能性を示唆している。

8. 各種HDLサブクラスにおける性質や機能の違い

1) HDL₂, HDL₃

成熟した大型のHDL₂ (d = 1.063 ~ 1.125) は小型のHDL₃ (d = 1.125 ~ 1.210) と比較して、脂質の含有量が高く、タンパクの含有量は低い。この二つのHDLサブクラスの性質や機能を比較する研究が古くから行われてきた。両者の機能の違いをまとめた総説を紹介する (Table 1)⁴²⁾。HDL機能の項で述べ、また表にもあるように、小型のHDLと大型のHDLとでは細胞からのコレステロール引き抜きを経由するトランスポーターに違いがある (ABCA1, ABCG1/SR-B I)。この総説では、抗酸化能や抗炎症能はHDL₃がより強く、血管拡張作用はHDL₂がより強いと報告されている。臨床試験において、冠動脈疾患患者の血清中の両者を比較した調査では、HDL₃ではなくHDL₂のコレステロール引き抜き能が減少していることが示されている⁴³⁾。また、1,799名の患者を比較した研究では、HDL₂-C,

Table 1 HDLサブクラスごとの特徴や構成成分

Biological activity	Subpopulation	Feature	Role of HDL components
Cholesterol efflux	Small, dense HDL	Potent efflux from lipid-loaded macrophages Potent efflux via ABCA1 Potent LCAT activation	Distinct apoA-I conformation, reduced content of PL and other lipids
	Large, light HDL	Potent efflux via ABCG1 and SR-BI	Elevated content of PL
Antioxidative activity	Small, dense HDL	Potent protection of LDL from oxidative damage Potent inactivation of LOOH and other oxidised PL	Depletion in SM, enrichment in apoA-I and hydrolytic enzymes
Anti-inflammatory activity	Small, dense HDL	Inhibition of endothelial cells adhesion molecules expression	Distinct apoA-I conformation and composition of PL
		Immunomodulatory capacities towards neutrophils	Factor H-related proteins
Cytoprotective activity	Small, dense HDL	Potent protection of endothelial cells from oxidised LDL-induced apoptosis	Enrichment in apoA-1 and S1P
Vasodilatory activity	Large, light HDL	Attenuated production of thromboxane A ₂	
Anti-thrombotic activity	Large, light HDL	Inhibition of platelet aggregation	Enrichment in apoE
	Small, dense HDL	Potent anticoagulant activity	Enrichment in TFPI and S1P
Anti-infectious activity	Dense HDL	Trypanosome lytic factor	Complex of apoL-1, Hrp and apoA-II
	Small, dense HDL	Potent integrin-mediated cell adhesion of neutrophils in response to LPS mediated by CD14	Factor H-related proteins, apoA-I, LBP

HDL: high-density lipoprotein; ABCA1: ATP binding cassette A1; LCAT: lecithin: cholesterol transferase; ABCG1: ATP binding cassette G1; SR-BI: scavenger receptor class B type I; apo: apolipoprotein; PL: phospholipids; LDL: low-density lipoproteins; LOOH: lipid hydroperoxides; SM: sphingomyelin; S1P: sphingosine-1-phosphate; TFPI: tissue factor pathway inhibitor; LPS: lipopolysaccharide; Hrp: haptoglobin-related protein (Hrp); LBP: lipopolysaccharide binding protein. (引用文献42より抜粋)

HDL₃-Cの両者共に急性心筋梗塞のイベント発症リスクと逆相関していたが、HDL₂-Cの方がHDL₃-Cよりも強い関連性があると報告している⁴⁴⁾。これ以外に、インスリン抵抗性にはHDL₂が^{45,46)}、動脈ステイフネスの予知因子⁴⁷⁾や急性心筋梗塞後の二次予防の評価⁴⁸⁾にはHDL₃が有用という報告もある。一方、虚血性心疾患患者1,169名のリスクを評価した研究では、従来のリスクファクターで調整すると両者に差は認められなかったという報告もなされている⁴⁹⁾。1点注意しなければいけないのは、この両者の機能を何の基準をもって比較するかである。例えば、HDL₃のタンパク含有量はHDL₂のそれと比較して高く、コレステロール含有量は逆にHDL₂より低い。したがって、HDLタンパクあたりで両者の機能を比較するとHDL₂が高く、コレステロールあたりで比較するとHDL₃が高く見積られる。これらのHDL₂やHDL₃のサブクラス解析は、wholeのHDL-Cよりはより疾患あるいは病態特異的な評価が可能かもしれないが、多様なHDLが二つのグループで分けられるとも考え難く、さらなる細分化も必要かもしれない。

2) その他のHDLサブクラス (pre β-HDL, apoE-HDL, apoC-III-HDL)

さらに細分化されたHDLとして、小型のPre β-HDLは細胞から早期にコレステロールを引き抜く重要なHDLとして知られ⁵⁰⁾、最近のオミックス解

析では、Pre β-HDLは、他のHDLと比較してLCATやCETP、リン脂質トランスファータンパクなどのコレステロール逆輸送に関与するタンパクとより強く関係していると報告されている⁵¹⁾。

また、apoEを多く含むHDLであるapoE含有HDLの解析も古くからおこなわれており、約30年前の研究では、apoE含有HDLは強い血小板抑制作用があることが既に報告されている⁵²⁾。最近の研究では、さらにapoEをアイソフォーム別に分けてapoE含有HDLを比較した場合、apoE₂含有HDLが他のapoE含有HDLよりもLCATの活性が高いという報告もある⁵³⁾。臨床試験では、心筋梗塞患者においてHDL中のapoE濃度やapoE/apoA-I比が低下しており⁵⁴⁾、また冠動脈疾患との関連が複数報告されている。われわれの研究では、apoE含有HDLが通常のHDLとは異なり、ABCA1依存的なコレステロール引き抜きを行うことを示している⁵⁵⁾。

apoC-IIIは中性脂肪を加水分解するリポタンパクリパーゼの抑制因子であり、血清apoC-III濃度が高いと高中性脂肪血症になるなど中性脂肪代謝のキーファクターとして知られている。中性脂肪を運搬するVLDL上のapoC-IIIが研究のターゲットとなることが多いが、apoC-III含有HDLと疾患との関連を調査した報告もある。MESA studyやDCH studyの結果を用いたメタ解析では、apoC-III含有HDLが冠動脈疾患患者のハイリスク群に多かったことが明らかになっている⁵⁶⁾。他の研究では、冠動脈疾患

患者では、apoC-III含有HDLが多く、さらにapoC-III含有HDL量がコレステロール引き抜き能と逆相関するという報告もある⁵⁷⁾。またapoC-III含有HDLが冠動脈の石灰化、頸動脈プラークスコア、頸動脈の内膜中膜複合体厚などと正の関係を示すこと⁵⁸⁾、さらに、apoE含有HDLと組み合わせて評価した研究では、300名の冠動脈疾患患者をまず初めにapoE含有HDL-C濃度で2群に分けると、低apoE含有HDL-C群においてプラークの体積が有意に大きいとその差はわずかで(1.1倍、 $p = 0.001$)、さらにその中で高apoC-III含有HDL-Cで比較すると、高apoC-III含有HDL-C群では線維性、脂質性、壊死性プラークの体積がそれぞれ約3倍も大きいことが示されるなど、apoC-III含有HDL-C評価の有用性を示している⁵⁹⁾。一方、反対にapoC-IIIがHDLに多く存在するとき、apoC-IIIのVLDLへの過剰な蓄積を防ぐことになり、結果として中性脂肪濃度の増加を防ぐ効果になっているというapoC-III含有HDLの機能面における良い評価の主張もある⁶⁰⁾。われわれはapoC-IIIがVLDLから大型HDLへ優先的に移動することを示しており⁶¹⁾、中性脂肪代謝にVLDL中のapoC-IIIだけでなくHDLも関与していると推察している。apoC-III含有HDLはapoE含有HDLと比較して、研究成果の報告が少ないため、今後の解析が期待される。

3) HDLサブクラスの分別定量

HDLを詳細に解析するには、数日かけて超遠心で分離したHDLをさらに超遠心によりHDL₂、HDL₃に分離、あるいはアフィニティーカラムなどを用いて、特定のタンパクを含有するHDLを分離しなければならず、日常検査に応用することが難しい。

より詳細な検査の実現に向けて、伊藤らは、HDL₃-CおよびHDL₂-C(総HDLからHDL₃-Cを差し引いて求められる)⁶²⁾、高橋らはapoE含有HDL-C⁶³⁾の直接測定法を開発し、自動分析装置での測定を実現している。われわれはこれらの試薬(デンカ株式会社との共同研究)を用いて測定したHDL₂-CやapoE含有HDL-Cが、冠動脈疾患患者の病態を反映することを示唆する結果を得ている(未発表)。

広渡らは、陰イオン交換HPLC法によって、リポ蛋白の表面に有する電荷の違いによってHDL、LDL、IDL、VLDL、CMの順に分離し、それぞれのコレステロール濃度を定量する方法を開発した。この方法は既に保険収載されており、東ソー株式会

社より、リポ蛋白分析計HLC-729LP IIとして販売されている⁶⁴⁾。現在、さらに改良され、HDLサブクラスに関して、HDL-P1、HDL-P2、HDL-P3の3つのサブクラスのコレステロールを定量することができる⁶⁵⁾。

岡崎らによって開発されたりポタンパク質・脂質プロファイル解析法は、微量の血清および血漿サンプルなどから高感度ゲルろ過HPLC法(GP-HPLC)によりリポタンパク質の詳細プロファイルデータを解析する手法であり⁶⁶⁾、HDLを粒子サイズ別に7分画に分け、それぞれのコレステロール濃度に加えて、さらに中性脂肪濃度、粒子数を短時間で同時に測定することを可能としている。またこの方法はHDLのみならず、CM、VLDL、LDLと合わせてリポタンパクサブクラスの網羅的かつ詳細な分析が可能である^{67,68)}。これを技術基盤とするリポタンパク質詳細分析サービス「LipoSEARCH[®]」は、株式会社免疫生物研究所にて受託分析が可能である。

9. HDLの機能検査

HDLサブクラスの定量に加えて、単球遊走抑制能、抗酸化能などHDLの様々な機能そのものを評価する試みが行われている。その中で現在、世界で盛んに評価されているHDL機能検査がコレステロール引き抜き能である。本項では、当研究室でも開発を手掛けているコレステロール引き抜き能について簡単に紹介させていただきたい。

1) コレステロール引き抜き能

コレステロール引き抜き能とは、プラークの原因となるコレステロールを貪食した泡沫細胞から、HDLがコレステロールを引き抜く能力である。新たな評価法として期待され、2011年にKheraらは、793名(冠動脈疾患患者442名、コントロール351名)の被検者のコレステロール引き抜き能を測定し、コレステロール引き抜き能が高いと冠動脈疾患の発症リスクが低い(調整オッズ比0.70)ことを示した⁶⁹⁾。さらに、RohatgiらはDallas Heart Studyにて、2,924名の患者を対象としてコレステロール引き抜き能の評価を行い、コレステロール引き抜き能高値群がコレステロール引き抜き能低値群よりもCVDのリスクが67%減少しており、さらにHDL-Cとは独立したリスクファクターになり得ることを報告した⁷⁰⁾。その後、EPIC-Norfolk Study⁷¹⁾やJUPITER Trial⁷²⁾など大規模な臨床試験において、心血管疾患のイベント発症リスク予測としてコレステロール引き抜き能を評価することの有用性が次々と示された。

このように、HDL機能検査（コレステロール引き抜き能の評価）は、HDL-Cでは予知できなかった心血管イベントを予測可能にする可能性があり、臨床現場での普及が期待されている。その一方、上記の臨床試験で用いられた方法でコレステロール引き抜き能を病院の検査室で測定することは難しい。なぜなら、コレステロール引き抜き能の測定法は、次の3つのステップで測定するからである：① マクロファージを放射標識あるいは蛍光標識コレステロール含んだ脂質で泡沫細胞化させる。② 泡沫細胞にHDLやアポリポタンパクBを含有するリポタンパクを沈殿させた上清（apolipoprotein B-100 depleted serum：BDS）をコレステロールアクセプターとして混和する。③ インキュベーション後、上清中のHDLによって引き抜かれたコレステロールを放射活性あるいは蛍光強度として測定する。このように従来のコレステロール引き抜き能評価法は、測定に細胞や放射性物質を用いることから操作が非常に煩雑であり、また病院で放射性物質を用いた検査は困難である。また自動分析装置に搭載することができないことから、多数の検体を精度よく測定することができない。

これらの課題を克服するための新たなコレステロール引き抜き能評価法の開発について、わが国は世界に先んじていくつかの方法を報告している。

清水らは、放射性標識コレステロールの代わりに安定同位体である[d7]-コレステロールを用い、HDLによって引き抜かれたコレステロール量を質量分析法で定量する方法を開発した⁷³⁾。この方法は、細胞培養が必要であるが、トレーサーである放射性標識コレステロールを安定同位体に変更したのみであり、これまでに実証されてきた方法と最も互換性のある方法と言える。

原田らは、コレステロール引き抜き能に類似したコレステロール取り込み能を開発した⁷⁴⁾。この方法は、蛍光標識コレステロールを血清とインキュベーションし、apoA-Iに対する抗体を用いてHDL粒子を補足した後、HDLに取り込まれたコレステロールを蛍光強度で評価する。細胞を用いないが、この方法は従来の細胞を用いた方法と良好な相関性を示しており、現在ではさらに方法が改良され自動分析装置への実装を実現している。本測定法はシスメックス株式会社のHDL機能受託測定サービスで分析が可能である。

われわれは、細胞も抗体も用いないコレステロール引き抜き能評価法を開発している⁷⁵⁾。この方法は、細胞に標識コレステロールを貪食させる代わりにゲ

ルビーズに蛍光標識コレステロールを含有するリポソームを固相化させた固相化リポソーム結合ゲルビーズ（immobilized liposome-bound gel beads: ILG）を作製、このILGにBDSをコレステロールアクセプターとして混和し、HDLがリポソームから引き抜いたコレステロールを蛍光強度として定量する。この方法（ILG法）は細胞を用いた従来法と良好な相関性を示し、また試料として用いるBDSがHDLのコレステロール引き抜き能をよく反映すること⁷⁶⁾、HDLサブクラスのコレステロール引き抜き能を細胞法と同様に測り分け、さらに本法の精度が細胞法（CV 10%以上）よりもはるかに優れている（本法、CV 3%以下）こと⁷⁷⁾、その他の性能も有用であることを報告している⁷⁸⁾。蛍光標識コレステロールであるBODIPY-コレステロールは血清中のビリルビンによって正の干渉を受けることが明らかになったが、われわれはこのビリルビンの影響の回避にも成功している⁷⁹⁾。現在、さらに磁気ビーズを用いたコレステロール引き抜き能測定法へと改良し（ILM法⁸⁰⁾、”新規のコレステロール引き抜き能測定法”として特許出願している（特願2021-94456（国内特許）、PCT/JP2022/022081（国際特許））。また臨床試験においても、このILM法で測定したコレステロール引き抜き能は冠動脈疾患患者の病態を反映する結果も得られており（未発表）、本法の実用化に向けて研究を続けている。

10. 最後に

HDLの多様性、性質や機能の違いを述べてきた。現在の臨床検査では、これらをひとくくりにしたHDL-Cの検査のみが行われているが、さらなる残余リスクを予見するマーカーが必要であり、HDLサブクラス分別定量やHDL機能検査など新たなHDL関連臨床検査項目の導入が期待される。

11. 謝辞

本稿に記載された当分野の研究成果の多くは、東京医科歯科大学 名誉教授 戸塚 実 先生のご指導の下に進められてきた研究である。また、同大学病院検査部 部長 東田 修二 先生、臨床検査技師長 市村直也 先生、技師 渡部 芽以 先生、保険医療管理学教授 藍 真澄 先生、名誉教授 岡崎 三代 先生、循環制御内科学 教授 笹野 哲郎 先生、准教授 米津 太志 先生、助教 荒木 誠 先生、オープンイノベーションセンター 教授 藤田 浩二 先生、機器分析センター 元准教授 笠間 健嗣 先生、信州大学 副臨床検査技師長 宇佐美 陽子 先生、帝京大学 講師 亀田 貴寛

先生, 順天堂大学 助教 堀内 優奈 先生, 台北医学大学 教授 Jun-Jen Liu 先生, Baker Heart and Diabetes Institute 教授 Dmitri Sviridov 先生, NIH Senior Investigator Alan T. Remaley 先生ら, 多くの先生方との共同研究および当分野 助教 吉本 明先生, 大学院生ら(修了生も含む)による研究成果である。また, 本研究の一部は, デンカ株式会社, 栄研化学株式会社, 旭化成ファーマ株式会社, 株式会社免疫生物研究所, 大塚電子株式会社との共同研究であり, また日本学術振興会 若手研究 (B) (15K19174, 17K15771(大川)), 基盤研究(C)(26460642, 17K08975 (戸塚), 19K07932, 22K07466 (大川)), 国際共同研究加速基金(国際共同研究強化) (16KK0198 (大川)), 武田科学振興財団「2016年度医学系研究奨励」(大川), ホクト生物科学振興財団 2016年度医学系研究奨励(大川), 臨床検査医学研究振興基金 平成28年度「研究奨励金」(大川), 2019年度近藤記念医学財団 学術奨励賞(医学研究助成)(大川), 循環器病研究振興財団 第4回山内進循環器病研究助成(大川), 日立財団 第54回倉田奨励金(大川)からの研究助成により遂行された。この場を借りて厚く御礼申し上げたい。

本論文の発表に関連して, 開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977;62(5):707-714.
- 2) Castelli WP, Doyle JT, Gordon T, et al. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Circulation* 1977;55(5):767-772.
- 3) Okamura T, Hayakawa T, Kadowaki T, et al. The inverse relationship between serum high-density lipoprotein cholesterol level and all-cause mortality in a 9.6-year follow-up study in the Japanese general population. *Atherosclerosis* 2006;184(1):143-150.
- 4) Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med* 2011;365(24):2255-2267.
- 5) Landray MJ, Haynes R, Hopewell JC, et al. Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. *N Engl J Med* 2014;371(3):203-212.
- 6) Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* 2007;357(21):2109-2122.
- 7) Cannon CP, Shah S, Dansky HM, et al. Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N Engl J Med* 2010;363(25):2406-2415.
- 8) Nicholls SJ, Brewer HB, Kastelein JJ, et al. Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: a randomized controlled trial. *Jama* 2011;306(19):2099-2109.
- 9) Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2012;367(22):2089-2099.
- 10) Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *Eur Heart J* 2017;38(32):2478-2486.
- 11) Hirata A, Sugiyama D, Watanabe M, et al. Association of extremely high levels of high-density lipoprotein cholesterol with cardiovascular mortality in a pooled analysis of 9 cohort studies including 43,407 individuals: The EPOCH-JAPAN study. *J Clin Lipidol* 2018;12(3):674-684 e675.
- 12) Lai SJ, Ohkawa R, Horiuchi Y, et al. Red blood cells participate in reverse cholesterol transport by mediating cholesterol efflux of high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I from THP-1 macrophages. *Biol Chem* 2019;400(12):1593-1602.
- 13) Ohkawa R, Low H, Mukhamedova N, et al. Cholesterol transport between red blood cells and lipoproteins contributes to cholesterol metabolism in blood. *J Lipid Res* 2020;61(12):1577-1588.

- 14) Vaisar T, Pennathur S, Green PS, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest* 2007;117(3):746-756.
- 15) Kurano M, Yatomi Y. Sphingosine 1-Phosphate and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2018;25(1):16-26.
- 16) Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 2004;113(4):569-581.
- 17) Zhang QH, Zu XY, Cao RX, et al. An involvement of SR-B1 mediated PI3K-Akt-eNOS signaling in HDL-induced cyclooxygenase 2 expression and prostacyclin production in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;420(1):17-23.
- 18) Gong M, Wilson M, Kelly T, et al. HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-B1-dependent manner. *J Clin Invest* 2003;111(10):1579-1587.
- 19) Mineo C, Shaul PW. Role of high-density lipoprotein and scavenger receptor B type I in the promotion of endothelial repair. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17(5):156-161.
- 20) Seetharam D, Mineo C, Gormley AK, et al. High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res* 2006;98(1):63-72.
- 21) Gonzalez-Pecchi V, Valdes S, Pons V, et al. Apolipoprotein A-I enhances proliferation of human endothelial progenitor cells and promotes angiogenesis through the cell surface ATP synthase. *Microvasc Res* 2015;98:9-15.
- 22) Theofilatos D, Fotakis P, Valanti E, et al. HDL-apoA-I induces the expression of angiopoietin like 4 (ANGPTL4) in endothelial cells via a PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathway. *Metabolism* 2018;87:36-47.
- 23) Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96(6):2758-2767.
- 24) Murphy AJ, Woollard KJ, Hoang A, et al. High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(11):2071-2077.
- 25) Navab M, Ananthramiah GM, Reddy ST, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004;45(6):993-1007.
- 26) Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, et al. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26(7-8):892-904.
- 27) Soran H, Schofield JD, Liu Y, et al. How HDL protects LDL against atherogenic modification: paraoxonase 1 and other dramatis personae. *Curr Opin Lipidol* 2015;26(4):247-256.
- 28) Wang S, Gulshan K, Brubaker G, et al. ABCA1 mediates unfolding of apolipoprotein AI N terminus on the cell surface before lipidation and release of nascent high-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(6):1197-1205.
- 29) Rosenson RS, Brewer HB, Jr., Davidson WS, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation* 2012;125(15):1905-1919.
- 30) Rohatgi A, Westertep M, von Eckardstein A, et al. HDL in the 21st Century: A Multifunctional Roadmap for Future HDL Research. *Circulation* 2021;143(23):2293-2309.
- 31) Yoshimoto A, Ohkawa R, Yano K, et al. Paraoxonase 1 associated with high-density lipoprotein transfers to oxidized low-density lipoprotein depending on the degree of oxidation. 2016;4(4):99-109.
- 32) Gugliucci A. Activation of paraoxonase 1 is associated with HDL remodeling ex vivo. *Clin Chim Acta* 2014;429:38-45.
- 33) Ikhlef S, Berrougui H, Kamtchueng Simo O, et al. Paraoxonase 1-treated oxLDL promotes cholesterol efflux from macrophages by stimulating the PPARgamma-LXRalpha-ABCA1 pathway. *FEBS Lett* 2016;590(11):1614-1629.

- 34) Sato M, Ohkawa R, Yoshimoto A, et al. Effects of serum amyloid A on the structure and antioxidant ability of high-density lipoprotein. *Biosci Rep* 2016:36(4).
- 35) Shimano S, Ohkawa R, Nambu M, et al. Marked Changes in Serum Amyloid A Distribution and High-Density Lipoprotein Structure during Acute Inflammation. *Biomed Res Int* 2021:2021:9241259.
- 36) Kameda T, Ohkawa R, Yano K, et al. Effects of Myeloperoxidase-Induced Oxidation on Antiatherogenic Functions of High-Density Lipoprotein. *J Lipids* 2015:2015:592594.
- 37) Ansell BJ, Navab M, Hama S, et al. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 2003:108(22):2751-2756.
- 38) Kameda T, Horiuchi Y, Shimano S, et al. Effect of myeloperoxidase oxidation and N-homocysteinylation of high-density lipoprotein on endothelial repair function. *Biol Chem* 2022:403(3):265-277.
- 39) Kameda T, Usami Y, Shimada S, et al. Determination of myeloperoxidase-induced apoAI-apoAII heterodimers in high-density lipoprotein. *Ann Clin Lab Sci* 2012:42(4):384-391.
- 40) Usami Y, Matsuda K, Sugano M, et al. Detection of chymase-digested C-terminally truncated apolipoprotein A-I in normal human serum. *J Immunol Methods* 2011:369(1-2):51-58.
- 41) Lai SJ, Kameda T, Morita M, et al. Characterization of novel truncated apolipoprotein A-I in human high-density lipoprotein generated by sequential treatment with myeloperoxidase and chymase. *Biochimie* 2023:218:34-45.
- 42) Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med* 2011:17(10):594-603.
- 43) Paavola T, Kuusisto S, Jauhiainen M, et al. Impaired HDL2-mediated cholesterol efflux is associated with metabolic syndrome in families with early onset coronary heart disease and low HDL-cholesterol level. *PLoS One* 2017:12(2):e0171993.
- 44) Salonen JT, Salonen R, Seppanen K, et al. HDL, HDL2, and HDL3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction. A prospective population study in eastern Finnish men. *Circulation* 1991:84(1):129-139.
- 45) Maeda S, Nakanishi S, Yoneda M, et al. Associations between small dense LDL, HDL subfractions (HDL2, HDL3) and risk of atherosclerosis in Japanese-Americans. *J Atheroscler Thromb* 2012:19(5):444-452.
- 46) Tabara Y, Arai H, Hirao Y, et al. Different inverse association of large high-density lipoprotein subclasses with exacerbation of insulin resistance and incidence of type 2 diabetes: The Nagahama study. *Diabetes Res Clin Pract* 2017:127:123-131.
- 47) Wang F, Wang X, Ye P, et al. High-density lipoprotein 3 cholesterol is a predictive factor for arterial stiffness: a community-based 4.8-year prospective study. *Lipids Health Dis* 2018:17(1):5.
- 48) Martin SS, Khokhar AA, May HT, et al. HDL cholesterol subclasses, myocardial infarction, and mortality in secondary prevention: the Lipoprotein Investigators Collaborative. *Eur Heart J* 2015:36(1):22-30.
- 49) Lamarche B, Moorjani S, Cantin B, et al. Associations of HDL2 and HDL3 subfractions with ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997:17(6):1098-1105.
- 50) Kawano M, Miida T, Fielding CJ, et al. Quantitation of pre beta-HDL-dependent and nonspecific components of the total efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *Biochemistry* 1993:32(19):5025-5028.
- 51) Guillas I, Lhomme M, Pionneau C, et al. Identification of the specific molecular and functional signatures of pre-beta-HDL: relevance to cardiovascular disease. *Basic Res Cardiol* 2023:118(1):33.
- 52) Desai K, Bruckdorfer KR, Hutton RA, et al.

- Binding of apoE-rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation. *J Lipid Res* 1989;30(6):831-840.
- 53) Vitali C, Pavanello C, Turri M, et al. Apolipoprotein E isoforms differentially affect LCAT-dependent cholesterol esterification. *Atherosclerosis* 2023;382:117266.
- 54) Bittolo Bon G, Cazzolato G, Saccardi M, et al. Total plasma apo E and high density lipoprotein apo E in survivors of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1984;53(1):69-75.
- 55) Horiuchi Y, Ohkawa R, Lai SJ, et al. Characterization of the cholesterol efflux of apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein in THP-1 cells. *Biol Chem* 2019;400(2):209-218.
- 56) Jensen MK, Aroner SA, Mukamal KJ, et al. High-Density Lipoprotein Subspecies Defined by Presence of Apolipoprotein C-III and Incident Coronary Heart Disease in Four Cohorts. *Circulation* 2018;137(13):1364-1373.
- 57) Luo M, Liu A, Wang S, et al. ApoCIII enrichment in HDL impairs HDL-mediated cholesterol efflux capacity. *Sci Rep* 2017;7(1):2312.
- 58) Aroner SA, Koch M, Mukamal KJ, et al. High-Density Lipoprotein Subspecies Defined by Apolipoprotein C-III and Subclinical Atherosclerosis Measures: MESA (The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Heart Assoc* 2018;7(6).
- 59) Sorokin AV, Patel N, Abdelrahman KM, et al. Complex association of apolipoprotein E-containing HDL with coronary artery disease burden in cardiovascular disease. *JCI Insight* 2022;7(10).
- 60) Kypreos KE. ABCA1 promotes the de novo biogenesis of apolipoprotein CIII-containing HDL particles in vivo and modulates the severity of apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia. *Biochemistry* 2008;47(39):10491-10502.
- 61) Yamazaki A, Ohkawa R, Yamagata Y, et al. Apolipoprotein C-II and C-III preferably transfer to both high-density lipoprotein (HDL)₂ and the larger HDL₃ from very low-density lipoprotein (VLDL). *Biol Chem* 2021;402(4):439-449.
- 62) Ito Y, Satoh N, Ishii T, et al. Development of a homogeneous assay for measurement of high-density lipoprotein-subclass cholesterol. *Clin Chim Acta* 2014;427:86-93.
- 63) Takahashi Y, Ito Y, Wada N, et al. Development of homogeneous assay for simultaneous measurement of apoE-deficient, apoE-containing, and total HDL-cholesterol. *Clin Chim Acta* 2016;454:135-142.
- 64) Hirowatari Y, Yoshida H, Kurosawa H, et al. Measurement of cholesterol of major serum lipoprotein classes by anion-exchange HPLC with perchlorate ion-containing eluent. *J Lipid Res* 2003;44(7):1404-1412.
- 65) Ito R, Manita D, Yanai H, et al. Measurement of cholesterol levels of lipoprotein subclasses in human serum using anion-exchange high-performance liquid chromatography with a linear concentration gradient of sodium perchlorate. *Ann Clin Biochem* 2023;60(6):374-385.
- 66) Okazaki M, Yamashita S. Recent Advances in Analytical Methods on Lipoprotein Subclasses: Calculation of Particle Numbers from Lipid Levels by Gel Permeation HPLC Using "Spherical Particle Model". *J Oleo Sci* 2016;65(4):265-282.
- 67) Toshima G, Iwama Y, Kimura F, et al. LipoSEARCH[®]; Analytical GP-HPLC method for lipoprotein profiling and its applications. *J Biol Macromol* 2013;13(2):21-32.
- 68) Ogino M, Kameda T, Mutsuda Y, et al. Development of internal standard for lipoprotein subclass analysis using dual detection gel-permeation high-performance liquid chromatography system. *Biosci Rep* 2022;42(6).
- 69) Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011;364(2):127-135.
- 70) Rohatgi A, Khera A, Berry JD, et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med* 2014;371(25):2383-2393.

- 71) Saleheen D, Scott R, Javad S, et al. Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3(7):507-513.
- 72) Khera AV, Demler OV, Adelman SJ, et al. Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Particle Number, and Incident Cardiovascular Events: An Analysis From the JUPITER Trial (Justification for the Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin). *Circulation* 2017;135(25):2494-2504.
- 73) Shimizu T, Miyazaki O, Iwamoto T, et al. A new method for measuring cholesterol efflux capacity uses stable isotope-labeled, not radioactive-labeled, cholesterol. *J Lipid Res* 2019;60(11):1959-1967.
- 74) Harada A, Toh R, Murakami K, et al. Cholesterol Uptake Capacity: A New Measure of HDL Functionality for Coronary Risk Assessment. *J Appl Lab Med* 2017;2(2):186-200.
- 75) Horiuchi Y, Lai SJ, Yamazaki A, et al. Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells. *Biosci Rep* 2018;38(2).
- 76) Horiuchi Y, Ohkawa R, Lai SJ, et al. Usefulness of apolipoprotein B-depleted serum in cholesterol efflux capacity assays using immobilized liposome-bound gel beads. *Biosci Rep* 2019;39(4).
- 77) Horiuchi Y, Lai SJ, Kameda T, et al. Comparison of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposome-bound gel beads with the conventional method. *Biosci Rep* 2020;40(8).
- 78) Horiuchi Y, Lai SJ, Kameda T, et al. Novel cholesterol efflux assay using immobilized liposome-bound gel beads: Confirmation and improvement for application in clinical laboratory. *Ann Clin Biochem* 2022;59(2):134-143.
- 79) Miyakoshi T, Mutsuda Y, Horiuchi Y, et al. Improvement in bilirubin influence on cholesterol efflux capacity evaluation using the immobilized liposome-bound gel beads method. *Biosci Rep* 2023;43(6).
- 80) Mutsuda Y, Miyakoshi T, Horiuchi Y, et al. Development and validation of novel automatable assay for cholesterol efflux capacity. *Biosci Rep* 2023;43(2).

凝固検査における Turnaround time についての進歩と課題

Progress and challenges of turnaround time in coagulation testing.

及川真依¹⁾, 近藤 崇¹⁾, 盛合亮介¹⁾, 鳴海菜月¹⁾²⁾, 遠藤明美¹⁾, 高橋 聡¹⁾²⁾

要旨 凝固検査は迅速な結果報告が求められており、測定過程を担う凝固検査装置は進歩を続けてきた。近年では、測定テーブルを複数に分けることで多項目・多検体測定時における検体処理能力を向上し、Turnaround time (TAT) 短縮に大きく寄与している。凝固検査のTAT短縮は、患者さんに利益をもたらすのみならず、検査室や病院全体の業務効率を上げるため、各施設で適切にモニタリングし、改善していくことが望まれる。

Key words coagulation testing, Turnaround time, STACIA CN10, CS-5100, S400CF

1. はじめに

凝固検査は、手術前スクリーニングや出血性および血栓性疾患の診断・治療評価に用いられ、迅速な検査結果報告が求められている。そのため、プロトロンビン時間 (prothrombin time: PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time: APTT)、フィブリノゲン (fibrinogen: Fbg) やDダイマーなどの一部の凝固検査項目は診療前検査や緊急検査への導入が進んでいる。他の検査と同様に凝固検査でも検査依頼から結果報告までの時間、すなわち Turnaround time (TAT) の短縮は重要な課題である (Fig. 1)。特にTATの大部分を占める「測定」の時間を短縮するために、凝固検査装置は進歩を続けてきた。

近年は、従来1つのみだった測定テーブルを原理ごとに複数に分け、多項目・多検体測定時の検体処理能力低下を抑制した凝固検査装置が発売されてい

る。実際に、測定テーブルを複数に分けた全自動臨床検査システムSTACIA CN10を用いた検体処理能力に関する検討事例¹⁾を次に提示する。

2. STACIA CN10を用いた場合の Turnaround time

1) 対象および方法

全自動臨床検査システムSTACIA CN10 (PHC株式会社) と全自動血液凝固測定装置CS-5100 (シスメックス株式会社) を用い、ランダムに50検体の凝固検査オーダーを作成し、同一検体を両機器で測定した。検査項目はPT, APTT, Fbg, アンチトロンビン (antithrombin: AT), フィブリン・フィブリノゲン分解産物 (fibrin/fibrinogen degradation products: FDP), Dダイマーの6項目、計163テストとした。両機器の測定部の仕様を Fig. 2 に示す。凝固検査は、検体と第1試薬を加温・反応後、第2試薬を加えて測光するのが一般的だが、この反応過

Mai OIKAWA¹⁾, Takashi KONDO¹⁾, Ryosuke MORIAI¹⁾, Natsuki NARUMI¹⁾²⁾, Akemi ENDOH¹⁾, Satoshi TAKAHASHI¹⁾²⁾

¹⁾ 札幌医科大学附属病院 検査部

Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital.

²⁾ 札幌医科大学医学部 感染制御・臨床検査医学講座
Department of Infection Control and Laboratory Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine.

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

Corresponding Author : 及川真依

TEL : 011-611-2111 (内線36430)

FAX : 011-622-8502

E-mail : moikawa@sapmed.ac.jp

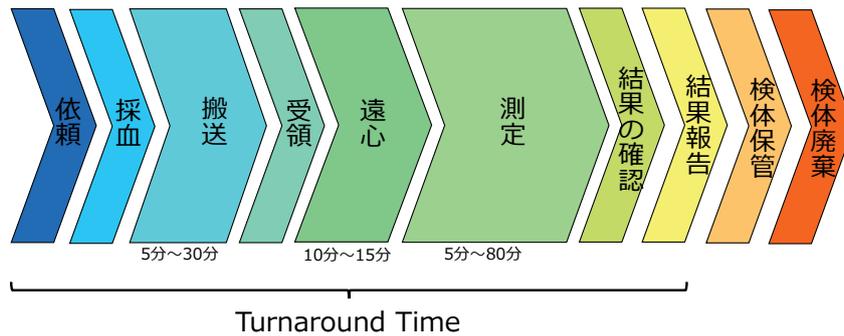


Fig. 1 凝固検査の検査過程

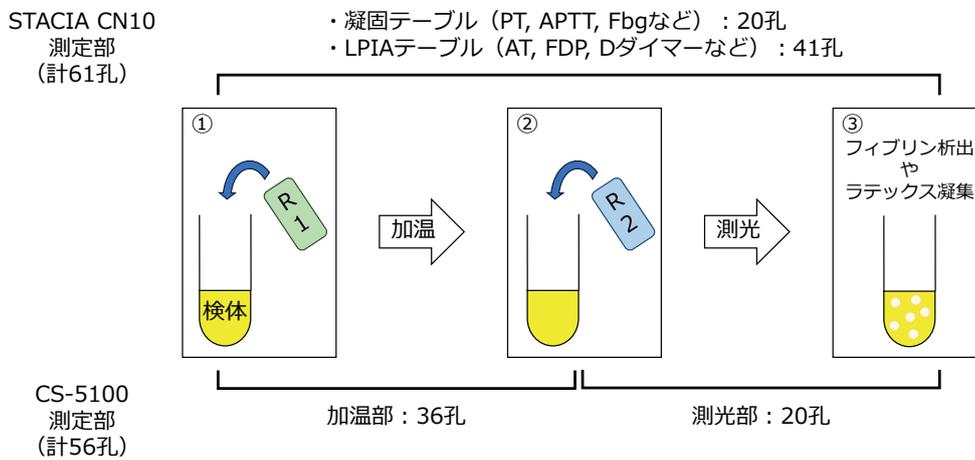


Fig. 2 STACIA CN10 および CS-5100 の測定部の仕様

程を実施する測定部の仕様が両者で大きく異なっている。そのため、単純には比較できないが、測定部数はSTACIA CN10の方が5孔多い仕様となっている。

2) 結果

全50検体の測定に要した時間はSTACIA CN10で62分58秒、CS-5100で82分59秒であり、STACIA CN10の方が約20分短い結果であった。各検体のサンプリング開始から結果算出までの1検体当たりの測定時間については、STACIA CN10で平均9分46秒、CS-5100で平均6分24秒と、STACIA CN10の方が約3分長い結果であった。しかし、STACIA CN10はPTおよびAPTTでは凝固点を検出した時点で測光を終了する機能があり、検体によって測定時間が異なる。本検討ではPTおよびAPTTが正常付近の検体を用いたため、PTまたはAPTTの単独ないし、PTとAPTTの2項目測定の場合については、

STACIA CN10での測定時間は5分を切り、CS-5100よりも短かった。また、検体をサンプリングしてから次の検体をサンプリングするまでのサンプリング間隔は、STACIA CN10で平均60秒、CS-5100で平均91秒と、STACIA CN10で短く、50件連続測定時の短縮につながったと考えられた。このように、STACIA CN10は効率的なサンプリングを行うことで、機器を大型化することなく検体処理能力を維持している。

3. 測定テーブルを複数に分けた他の凝固検査装置

検体処理能力の向上を図った凝固検査装置は、STACIA CN10のほかに2021年に発売された血液凝固自動分析装置S400CF（積水メディカル株式会社）がある。当院で検討したS400CFでの50検体測定時の所要時間は、CS-5100の約半分であった（Table 1 検討2）。本検討は前述したSTACIA

Table 1 50検体連続測定時の所要時間と機器仕様の比較

		S400CF	STACIA CN10	CS-5100
50 検体 連続測定 所要時間	検討 1 ¹⁾	/	62 分 58 秒	82 分 59 秒
	検討 2	35 分 15 秒	/	76 分 02 秒
機器サイズ		幅 : 940 mm 奥行 : 1,150 mm 高さ : 1,290 mm	幅 : 964 mm 奥行 : 768 mm 高さ : 1,200 mm	幅 : 1,030 mm 奥行 : 1,150 mm 高さ : 1,280 mm
測定部数		凝固反応テーブル : 41 孔 比色反応テーブル : 85 孔	凝固テーブル : 20 孔 LPIA テーブル : 41 孔	加温部 : 36 孔 測光部 : 20 孔

CN10の検討 (Table 1 検討1)¹⁾とは異なる検査オーダーの50検体であるため、単純には比較できないが、S400CFの測定部数が計126孔と多いことを考慮すると、S400CFはSTACIA CN10やCS-5100よりも多項目・多検体時の処理能力が高いと推察される。

4. 最後に

近年の検査装置の性能向上は、凝固検査のTAT短縮に大きく寄与すると考えられた。遠心条件については、検査結果に大きく影響することから「凝固検査検体取り扱いに関するコンセンサス」²⁾が発表され、10分または15分と規定されたため、短縮することは困難である。今後さらなるTAT改善には、検査前プロセスの時間短縮が必要である。アンケート調査によると³⁾、外来採血の検体搬送に10分~30分以上要している施設が25%に認められており、各施設の運用を改善する余地はあると考える。凝固検査のTATの短縮は、患者さんに利益をもたらすのみならず、検査室や病院全体の業務効率を上げるた

め、各施設で適切にモニタリングし、改善していくことが望まれる。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) 及川真依, 近藤崇, 中振大貴ほか. 全自動血液凝固検査システムSTACIA CN10の検体処理能力の評価. 医学検査 2022;71:288-293.
- 2) 日本検査血液学会標準化委員会凝固検査標準化ワーキンググループ. 凝固検査検体取り扱いに関するコンセンサス. 日本検査血液学会雑誌 2016;17:149-168.
- 3) 榎谷亮太, 松田将門, 小宮山豊ほか. 関西圏を中心とした施設における凝固検査検体取り扱いの現状. 日本検査血液学会雑誌 2023;24:253-261.

凝固波形を活用した血栓止血分野の新展開

New development in the field of thrombosis
and hemostasis using clot waveform

徳永尚樹

要旨 近年血栓止血分野では、PTやAPTTの測定時に得られるフィブリン形成過程の吸光度や透過度変化を示す凝固反応波形を用いて、包括的な凝固能を評価する凝固波形解析（CWA）による病態評価が注目されている。

CWAには大きく二つの活用法があり、一つは、得られた凝固反応波形を数学的に微分して得た速度変化や加速度変化情報を基に凝固能を解析する方法で、フィブリン形成における最大速度値や最大加速度値などの情報が得られる。もう一つは凝固反応波形の波形パターンや吸光度などの変化量を指標として解析する方法で、フィブリノゲン量や凝固異常の原因などを推測することができる。

さらに、ここ数年において、凝固線溶波形解析など新たなCWAが考案された他、パターン認識やAI（artificial intelligence）を用いたCWAの研究が進みつつあり、CWAの分野は飛躍的に進歩している。今後広くCWAが臨床現場で活用されるためには、パラメータや評価方法の標準化やハーモナイゼーションが必要である。

Key words APTT, CWA, 凝固反応波形, 微分波形, modified CWA

1. はじめに

血液凝固反応は複雑かつダイナミックな生理機能である。古くから出血傾向の検査として用いられているプロトロンビン時間（PT）や活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）は、外因系、内因系凝固因子の活性化からフィブリン形成までの時間を測ることで出血傾向の有無を判定するが、これは最終的な凝固時間のみを評価しているに過ぎない。近年、血栓止血分野では、PTやAPTTなどの凝固時間検査の測定時に得られるフィブリン形成過程の吸光度や透過度変化を示す凝固反応波形を用いて、包括的な凝固能を評価できる凝固波形解析（CWA）による病態評価法が注目されている¹⁾。CWAは以

前より様々な血栓止血分野の研究において用いられてきたが、ルーチン検査として一般的に利用される凝固時間検査の測定時に実施できるその利便性から臨床検査にも応用されつつある。本項ではPT、APTTによる様々なCWAの活用法と、新たなCWAについて紹介する。

2. 凝固時間検査と凝固波形

一般的に凝固波形とはPTやAPTTなどの凝固時間測定において得られる反応曲線のことを指す。凝固点を光学的に検出する凝固時間検査の測定原理は、血漿検体にPTなら組織トロンボプラスチンを、APTTなら活性化剤とリン脂質を添加し、カルシウムを加えることにより凝固反応を進め、フィブリンの形成過程を血漿の濁度変化として吸光度あるいは透過光、散乱光により捉える。現在一般的に使用可能なほとんどの血液凝固自動分析装置では、Fig. 1に示す①のようなS字状あるいは逆S字状の凝固反応波形が得られるが、自動分析装置によってはさらにFig. 1に示す②や③の一次微分波形や二次微分波形が得られる機種もあり、これら①～③の3つの

Naoki Tokunaga
川島病院 検査室
Department of Laboratory, Kawashima Hospital
〒770-8548 徳島県徳島市北佐古一番町6-1
6-1, Kitasakoichiban-cho, Tokushima city, Tokushima
770-8548, Japan
Tel : 088-677-7781 (直通)
E-mail : n.tokunaga@khg.or.jp

波形を総称して凝固波形という²⁾。血液凝固自動分析装置における凝固波形は、凝固点を示す凝固時間のみならず、さまざまな情報を持っている。これらの凝固波形から、視覚的な波形パターンの形状や吸光度や透過光などの変化量、また、フィブリンクロットが形成される速度・加速度情報などを得ることが出来る。

3. 凝固波形解析

凝固時間測定により得られた凝固波形情報を分析して病態を評価することをCWAといい、現在、最も簡便な包括的凝固機能測定法として注目されている。現在本邦で使用可能なCWA機能を搭載した自動分析装置2種について紹介する。Fig. 1のA, Bに示す凝固波形は、IL社のACL-TOPシリーズで得られる凝固波形である。横軸が時間で縦軸が吸光度を示しており、矢印はそれぞれPTまたはAPTTの凝固点を示す。また、Fig. 1のCに示す凝固波形はSysmex社のCN/CSシリーズで得られる凝固波形である。それぞれ、①で示す凝固反応波形はフィブリン形成過程における吸光度あるいは透過光変化を示し、この波形を数学的に微分したものが②の一次微分波形であり、フィブリン形成の速度変化を表す。さらに一次微分波形を微分すると、加速度変化を表

す③の二次微分波形が得られる。

一般的に凝固反応波形はフィブリノゲン量やフィブリン形成量を反映すると考えられ、一次微分波形である速度変化および、二次微分波形である加速度変化はそれぞれ、トロンビン活性、プロトロンビナーゼ活性に相当すると考えられている。機種により若干名称は異なるが、波形解析パラメータとしてFig. 1のaで示す最大速度値やb, cで示す最大加速度値、最大減速度値が算出される。主に最大速度値や最大加速度値のパラメータが出血リスクや凝固能の評価に活用されている。さらにSysmex社の機種においては、凝固反応波形の透過光変化量であるdHというパラメータと、50%凝固点における傾きを示すSlope値が算出される。この2つのパラメータについては凝固波形解析機能が搭載されていない機種においても利用可能であり、これらのパラメータを活用することで凝固波形解析を実施することができる²⁾。

4. 凝固波形の活用法

1) 微分波形の活用法

微分波形によるCWAは、主に血友病の凝固因子活性の評価に活用されてきたが、出血リスクや血栓傾向を評価できる事からDICの評価や、CWAによ

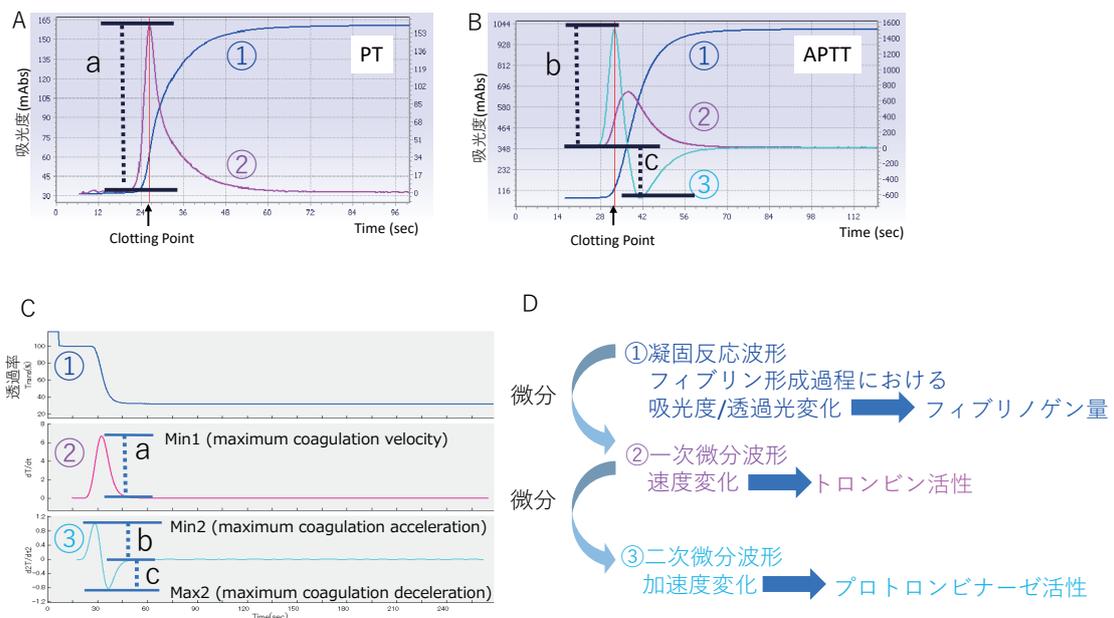


Fig. 1 凝固波形解析機能を搭載した血液凝固自動分析装置における凝固波形とパラメータ (文献2より転載)
 A: ACL-TOPにおけるPT測定時の凝固波形, B: ACL-TOPにおけるAPTT測定時の凝固波形, C: CN/CSシリーズにおける凝固波形解析画面, D: 各凝固波形の意義
 a: 最大速度値, b: 最大加速度値, c: 最大減速度値

るパラメータの違いから、血友病や抗リン脂質抗体症候群などの血液凝固異常症の鑑別や投与されている抗凝固薬の鑑別など凝固時間を延長させる病態の鑑別法としても活用されている (Table 1)。さらに近年ではCOVID-19における血栓リスクの評価にも活用されている⁸⁾⁻⁹⁾。微分波形により得られるCWAパラメータの活用例をFig. 2に示す。健常人

と抗凝固薬投与群、および妊娠周産期や癌、敗血症などの過凝固状態である病態において、単純にAPTTでは差が見られないが同じAPTT測定から得られた最大加速度値のCWAパラメータに差がみられることからCWAを活用した病態の評価に有用である¹⁰⁾。

Table 1 近年における微分波形を活用した研究例

活用目的	活用パラメータ	文献
DICの評価	最大速度値、最大加速度値	Suzuki K et al ³⁾
病態鑑別	一次微分波形のパラメータ	Shimomura D et al ⁴⁾
	二次微分波形のパラメータ	Kanouchi K et al ⁵⁾
血栓傾向の評価	最大速度値、最大加速度値、 最大減速度値	Tan CW et al ⁶⁾
		Tan CW et al ⁷⁾

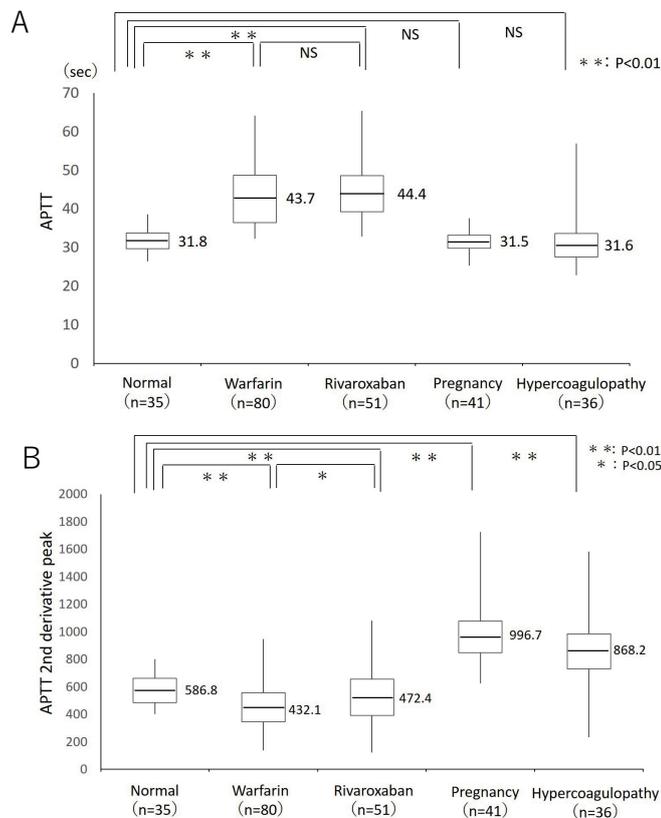


Fig. 2 各種病態におけるAPTTおよびAPTT最大加速度値の比較 (文献10より転載)
 A: 健常人と妊娠周産期および過凝固症例においてAPTTに有意差は認めない
 B: 抗凝固薬投与群では最大速度値は低下し、妊娠周産期および過凝固症例においては健常人よりも有意に高値であった

2) 凝固反応波形の活用法

凝固反応波形の変化量はフィブリン形成過程の吸光度や透過光などの変化量であることから、この変化量はすなわちフィブリノゲン量を反映する。そのため凝固時間が同じ検体であっても変化量の違いでフィブリノゲン量を推測することが可能である。当院で使用している機器におけるCWAパラメータの活用例を以下に紹介する¹⁾。

CSシリーズの凝固反応波形ではCWAパラメータとして前述した透過光変化量であるdHと、50%の凝固点における傾き、すなわちその時点の凝固速度を示すSlope値が得られる (Fig. 3A)。dHはフィブリノゲン量に比例して高くなることから、PTやAPTT測定においてもフィブリノゲン量をある程度推測することができる。また、Slope値は、凝固速度、すなわちトロンビン活性を反映していると考えられ、凝固能の評価に活用できる。ワルファリン投与群と非投与群においてPT測定から得られたSlope値を比較したところ、dHつまりフィブリノゲン量に関わらず、ワルファリン投与群では非投与群に比べて有意に低下しており、Slope値を用いて凝固能を評価できる可能性が示唆された (Fig. 3B-D)。さらにSlope値において敗血症患者と非敗血症

患者において、血液培養陽性例と陰性例で比較すると血液培養陽性患者においてはPTおよびAPTTのSlope値が共に血液培養陰性患者のSlope値より有意に高値であり、敗血症の鑑別に有用であると示唆された (Fig. 4A, B)。また、血液培養陽性患者において抗菌薬投与前後のSlope値を比較したところ、投与後には病態の緩和と並行してSlope値の低下がみられ、治療効果判定としての評価にも有用であると考えられた (Fig. 4C)。

5. 進化する凝固波形解析

従来のCWAではPTやAPTTなどの凝固時間検査の測定に付随して得られる情報を基に病態評価を行っていたが、近年では凝固時間検査の添加試薬を工夫することで新たな病態評価法としてのCWA (modified CWA) が考案されている。各modified CWAの種類と評価できる病態について Table 2にまとめた。これらは現状研究レベルの報告であり、実用化にはさらなるエビデンスの蓄積が必要である。

さらに凝固波形を画像認識としてパターン化し、パラメータ化することで病態を鑑別するパターン認識によるCWA¹⁶⁾や、CWAにより得られたパラメータまたは凝固波形情報をもとにAI技術によりそ

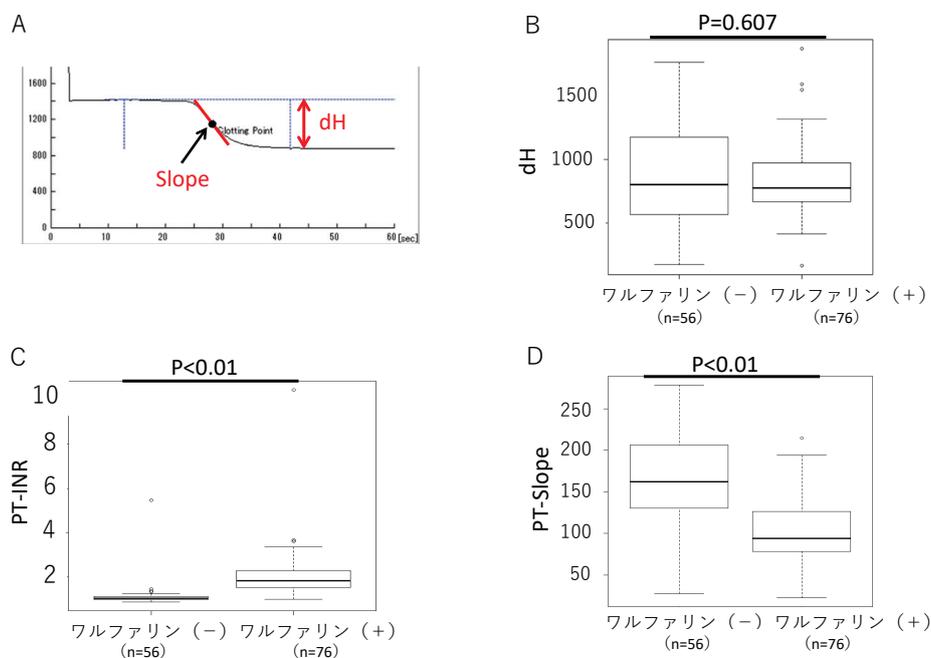


Fig. 3 PT-CWAを用いたワルファリン投与時の凝固能評価 (文献2より転載)

A: CSシリーズにおける凝固反応波形

dH: 透過光変化の反応強度, Slope: 50%凝固点における傾き

ワルファリン投与群と非投与群におけるB: dH, C: PT-INR, D: PT-Slopeを比較した

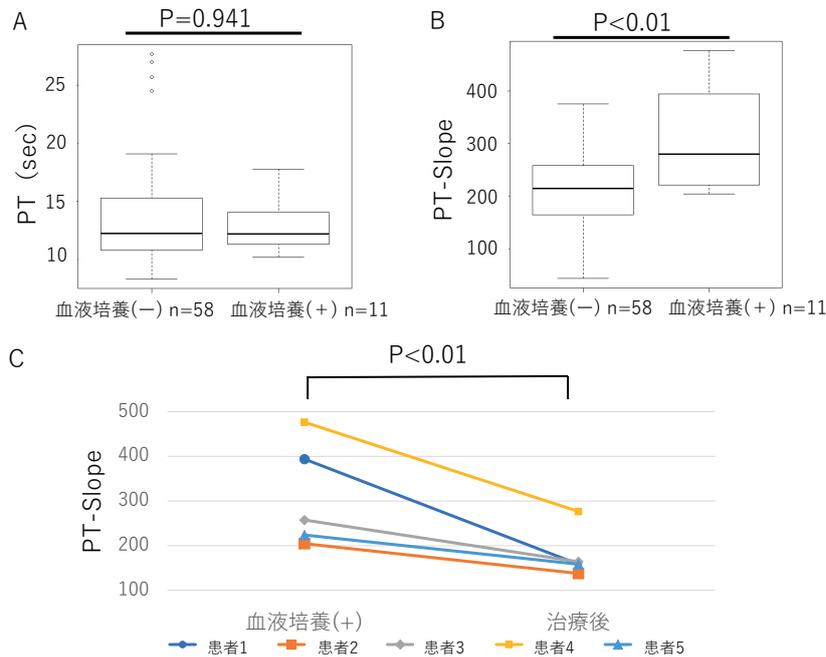


Fig. 4 敗血症患者におけるSlope値の評価（文献2より引用改変）
 敗血症患者において血液培養陽性群と陰性群におけるA：PT（秒），B：PT-Slope値
 C：敗血症治療前後におけるPT-Slope値の変化

Table 2 凝固波形解析を応用したmodified CWA

modified CWA	略称	特徴	用途	文献
凝固線溶波形解析	CFWA	t-PAを試薬として添加	線溶能・出血傾向の評価	Nogami K et al ¹¹⁾
微量TFによる凝固波形解析	CWA-sTF/FIX	希釈PTの原理を応用	止血異常・凝固能の評価	Wada H et al ¹²⁾
トロンビン時間法による凝固波形解析	CWA-TT	フィブリノゲン測定を応用	出血傾向の評価、 異常フィブリノゲンの検出	Wada H et al ¹³⁾ 、 Suzuki A et al ¹⁴⁾ 、 Arai S et al ¹⁵⁾

の凝固時間延長要因を鑑別した研究報告が始め、CWAの分野の中でも革新的な進化がみられる。

6. おわりに

従来のPT, APTT検査ではその凝固時間の結果から、出血傾向を評価する他、抗凝固薬のモニタリングや効果判定に使用されていたが、これらの測定時に得られるCWA情報を基に解析することで従来からの病態評価に加え、凝固能評価・病態鑑別・血中濃度評価・凝固異常症検出など様々な視点からの病態評価が可能となり、その臨床的意義は有用であることは言うまでもない。ここ数年間においてCWAを活用した報告は増加しており、各社新たな

自動分析装置への機能搭載も進みつつある。現在では微分波形を用いたCWAが実施できる分析装置は限られているが、今後機能が搭載された分析装置が普及することでCWAの臨床的な活用機会は飛躍的に増加する。今後広くCWAが臨床現場で活用されるためには更なるエビデンスの蓄積に加え、各種CWAのパラメータや評価方法などの標準化やハーモナイゼーションが必要であり、今後の課題である。さらには様々なmodified-CWAを用いる解析の進化により、より正確に生体内の凝固反応を評価できる可能性がある。直近ではAI技術を用いた報告例もあり、さらなる凝固波形解析の進化に期待したい。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) Song J, Advances in laboratory assessment of thrombosis and hemostasis. *Blood Res* 2022;57 (Suppl 1):93-100.
- 2) 徳永尚樹, 凝固波形解析の進歩. *血栓止血誌* 2023; 34(1):p4-11.
- 3) Suzuki K, Wada H, Matsumoto T et al, Usefulness of the APTT waveform for the diagnosis of DIC and prediction of the outcome or bleeding risk. *Thromb J* 2019;17:12.
- 4) Shimomura D, Matsumoto T, Sugimoto K et al, The First-Derivative Curve of the Coagulation Waveform Reveals the Cause of aPTT Prolongation. *Clin Appl Thromb Hemost* 2020;26:1-8.
- 5) Kanouchi K, Narimatsu H, Shirata T et al, Diagnostic analysis of lupus anticoagulant using clot waveform analysis in activated partial thromboplastin time prolonged cases: A retrospective analysis. *Health Sci Rep* 2021;4 (2):e258.
- 6) Tan CW, Heng C MH, Wong WH et al, Elevated activated partial thromboplastin time-based clot waveform analysis markers have strong positive association with acute venous thromboembolism. *Biochem Med (Zagreb)* 2019;29(2):020710.
- 7) Tan CW, Wong WH, Heng C MV et al, Assessment of aPTT-based clot waveform analysis for the detection of haemostatic changes in different types of infections. *Sci Rep* 2020;10(1):14186.
- 8) Tan CW, Hong L JG, Wong WH et al, Critically ill COVID-19 infected patients exhibit increased clot waveform analysis parameters consistent with hypercoagulability. *Am J Hematol* 2020;95 (7):E156-E158.
- 9) Ichikawa J, Okazaki R, Fukuda T et al, Evaluation of coagulation status using clot waveform analysis in general ward patients with COVID-19. *J Thromb Thrombolysis* 2022;53(1):118-122.
- 10) 徳永尚樹, 血栓止血検査室における凝固波形の臨床的活用法臨床病理. 2019;67(10), 1035-1045.
- 11) Nogami K, Matsumoto T, Sasai K et al, A novel simultaneous clot-fibrinolysis waveform analysis for assessing fibrin formation and clot lysis in haemorrhagic disorders. *Br J Haematol* 2019;187(4):518-529.
- 12) Wada H, Ichikawa Y, Ezaki M et al, Clot Waveform Analysis Demonstrates Low Blood Coagulation Ability in Patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *J Clin Med* 2021;10(24):5987.
- 13) Wada H, Ichikawa Y, Ezaki M et al, The Reevaluation of Thrombin Time Using a Clot Waveform Analysis. *J Clin Med.* 2021;10 (21):4840.
- 14) Suzuki A, Suzuki N, Kanematsu T et al, Development and validation of a novel qualitative test for plasma fibrinogen utilizing clot waveform analysis. *Sci Rep* 2022;12 (1):434.
- 15) Arai S, Kamijo T, Hayashi F et al, Screening method for congenital dysfibrinogenemia using clot waveform analysis with the Clauss method. *Int J Lab Hematol* 2021;43(2):281-289.
- 16) Shimonishi N et al, *Thromb Haemost.* 121 (2):164-173, 2021.

抗リン脂質抗体関連検査

Laboratory testing for antiphospholipid antibodies

山崎 哲

要旨 抗リン脂質抗体 (aPL) は、凝固時間法によるループスアンチコアグラント (LA) と免疫学的な測定による抗カルジオリピン抗体 (aCL) や $\beta 2$ グリコプロテイン I 依存性抗カルジオリピン抗体 (aCL/ $\beta 2$ GPI) および、aCL IgG, IgM と a $\beta 2$ GPI IgG, IgM の4種を同時測定する抗リン脂質抗体パネル検査が保険診療において測定可能である。海外の標準化の進展とともに国内においても測定標準化に向けた検討が進められている。aPLの検出は、ISTH/SSCの推奨法によりLAが陽性であること、aCL/ $\beta 2$ GPIまたはa $\beta 2$ GPIのIgGまたはIgM抗体が陽性（健常者の99%タイル値より高値）であること、また、これら3種のaPLが同時に陽性の場合、血栓症などの発症リスクが高いことから、確実にaPLを検出するためにも全ての測定を実施することが重要である。

Key words 抗リン脂質抗体症候群, 抗リン脂質抗体, ループスアンチコアグラント

1. はじめに

抗リン脂質抗体 (aPL) は、抗リン脂質抗体症候群 (APS) などと認められる動脈血栓症および妊娠合併症と関連する自己抗体である。特に、動脈硬化病変の非存在下や若年者での血栓症および再発性血栓症では積極的にaPLの存在を疑う必要がある。検査項目として、凝固時間法に基づくループスアンチコアグラント (LA) と免疫学的方法に基づく固相抗原測定 (SPA) 法による抗カルジオリピン抗体 (aCL) や $\beta 2$ グリコプロテイン I 依存性抗カルジオリピン抗体 (aCL/ $\beta 2$ GPI) および、aCL IgG, IgM と a $\beta 2$ GPI IgG, IgM の4種を同時測定する抗リン脂質抗体パネル検査などが保険診療において測定可能である。

国際血栓止血学会/学術標準化委員会 (ISTH/SSC) から検査基準が示されており、ISTH/SSC

の推奨法によりLAが陽性であること、aCL/ $\beta 2$ GPIまたはa $\beta 2$ GPIのIgGまたはIgM抗体が健常人の99%タイル値より高値であること、また、12週以上の間隔で2回以上陽性となった場合にAPSと分類される。これら3種のaPLが同時に陽性となった場合、血栓症などの発症リスクが高いことが報告されており、これら全てを測定して評価することが求められる¹⁾。

本項では、LA検査を中心に測定の現状や標準化に向けた動向などについて紹介する。

2. aPL関連検査の標準化の動向

1) 海外の状況

1999年にISTHからAPSの分類基準（札幌基準）が示されて以降、APSの分類基準ならびにaPLの検査基準が改訂を重ねながら進展してきた。2018年にISTHから示された検査基準²⁾では、ISTH/SSCの推奨法によって検出されたLAが確認され、IgGまたはIgM型の $\beta 2$ GPI依存性抗カルジオリピン抗体 (aCL) かつ/またIgGまたはIgM型の抗 $\beta 2$ GPI抗体 (a $\beta 2$ GPI) が健常人の99パーセントタイル値より高いこと。これらのaPLが12週以上の間隔で2回以上陽性であることなどが示されている。また、ISTHの他に英国血液学会や臨床・検査標準

Satoshi YAMAZAKI
聖マリアンナ医科大学病院 臨床検査技術部
Department of Clinical Laboratory St. Marianna
University Hospital
〒216-8511 川崎市宮前区菅生2-16-1
TEL: 044-977-8111 FAX: 044-977-8952
E-mail: syamazak@marianna-u.ac.jp

協会 (CLSI) のガイドラインが示されており、類似している点も多く認められるが異なる点も存在している。

2) 国内の状況

日本血栓止血学会の学術標準化委員会／抗リン脂質部会や日本検査血液学会の標準化委員会／血栓止血検査標準化小委員会でテーマとしてあげられており、また、日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップ (APS-WS ; <https://aps-ws.com>) では、①抗リン脂質抗体の測定に関する標準化、②抗リン脂質抗体症候群の診断および治療の標準化、を目的に様々な検討が進められている。以下、これまでの検討内容などを含めて紹介する。

3. ループスアンチコアグラント (LA)

LAは、①リン脂質依存性凝固検査 (活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT), 希釈ラッセル蛇毒時間 (dRVVT), カオリン凝固時間など) の延長を認めること、②正常血漿との混合試験で延長した凝固時間が補正されないこと、③過剰のリン脂質の添加により延長した凝固時間が補正または短縮すること、④他の凝固異常 (凝固因子欠乏, 凝固因子インヒビターなど) が除外できること、の4つの条件を全て満たした場合に陽性と判定される。

ISTHのガイドラインでは、スクリーニングの第1選択がdRVVT、第2選択がAPTTとされており、2法共に実施することが求められている。保険適用となっている各種LA検査キットをTable 1に示す。APTTについては、LAに高感受性の試薬をスクリーニングに用いる必要があるが、LA感受性は試薬毎に大きく異なるため注意が必要である (Fig. 1)。dRVVT系、APTT系共にLA確認検査キットが市販されている。手順は、第1に低リン脂質濃度のス

クリーニング試薬で延長を確認する。第2にミキシング試験で正常血漿の添加により補正されないことを確認した上で、第3に高リン脂質濃度の確認試薬でリン脂質依存性に補正されることを確認する。これら3つのステップを実施する必要がある。

これまでにAPS-WSで行った検討を基にしたLA検査の標準化推奨 (案)⁴⁾をTable 2に示した。以下に、検討の一部を示す。

1) 遠心条件

LA検査は凝固時間法に基づくため、検体の取扱い、即ち検体の質が重要となることは言うまでもない。そこで、5mLと2mLの3.2%クエン酸ナトリウム加採血管を用い、1,500~2,000g, 25℃, 15分1回または2回遠心を実施して残存血小板数, dRVVT, シリカ凝固時間 (SCT) を測定した。残存血小板数は5mLの1回遠心では検討した49検体中15検体 (30.6%) で10,000/μL以上となり遠心が不十分である結果となった。5mLの2回遠心および2mLの1回遠心では何れも条件を満たす結果となり、2mLでより低値となった。また、5mLの1回遠心と2回遠心により得られた血漿のdRVVTおよびSCTのNormalized Screen/Confirm ratioは2回遠心の血漿で有意に高値傾向となり、残存血小板由来のリン脂質による測定への干渉を認めた。2mL採血管では1,500g, 室温, 15分の1回遠心で充分である結果となったが、5mL採血管では2回遠心が必須であると考えられた。したがって、可能な限り2mL採血管を使用した方が日常的な利便性は高いと思われる。但し、内径の異なる採血管も存在するため、その使用時には別途検討が必要である。

2) 健常人カットオフ値

APS-WSにおいて、健常人を対象にdRVVTの4キットとSCTの1キットについて健常人カットオフ

Table 1 LA検査キット一覧

dRVVT系LA検査キット	
キット名称	メーカー
LAテスト「グラディポア」	医学生物学研究所
ヒーモスアイエル dRVVT	アイ・エル・ジャパン
コアグピア LA	積水メディカル
LA試薬 DRVVT	シスメックス
APTT系LA検査キット	
キット名称	メーカー
スタクロット LA	富士レビオ
ヒーモスアイエル SCT	アイ・エル・ジャパン

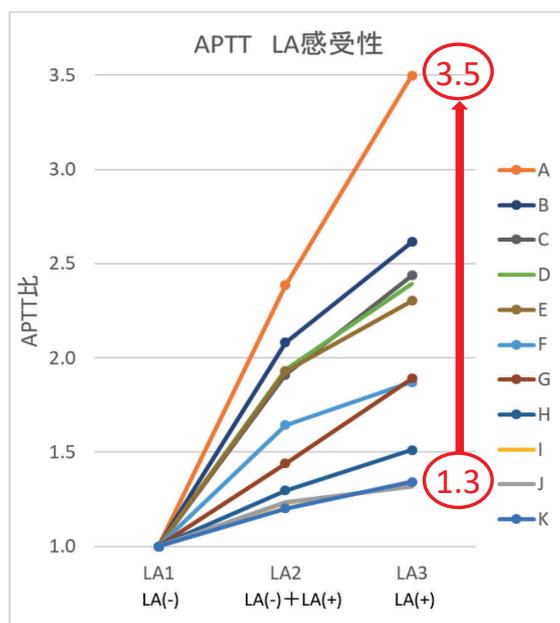


Fig. 1 APTT 試薬のLA 感受性

A～Kの11種類のAPTT 試薬を対象にLA 感受性を比較した。
 LA1：陰性コントロール，LA2：陰性と陽性コントロールを1：1に混和，LA3：陽性コントロール。
 LA3のAPTT比で1.3～3.5と大きな差を認めた。

Table 2 LA 検査の標準化推奨案（文献4引用改変）

- 1) 検体の取扱い
 凝固検査検体取扱いに関するコンセンサスに従う
 室温、1,500g、15分以上（2,000g、10分以上）
 残存血小板数 10,000/μL未満
- 2) 試薬の選択
 - ① dRVVT (4種の確認検査キットのscreen試薬)
 - ② APTT (LA高感受性) (2種の確認検査キットのscreen試薬など)
- 3) ミキシング試験
 市販または自家調整の適切な正常血漿を使用
 患者血漿：正常血漿 = 1：1
- 4) 確認試験
 各確認検査キットの確認（Confirm）試薬
- 5) 結果の表現
 正常血漿に対する比で表現（Normalized ratio）
 ハーモナイゼーションも考慮（モノクローナル抗体などによる）
- 6) カットオフ値 → 健常人の99パーセンタイル値を上限
 スクリーニングテスト（Normalized screen ratio） (>1.2)
 ミキシング試験（秒数またはICAなどで評価）
 特化したカットオフ値の設定 (ICA=[(mix - normal)/patient]×100)
 確認試験（Normalized screen/confirm ratio） (>1.2)
- 7) 正常血漿
 健常成人20名（男女比1：1）以上、適切な市販正常血漿など
 プール血漿としてnormalizeにも使用可能

値の設定について検討を実施した³⁾⁴⁾ (Table 3)。その結果、スクリーン試薬による秒数やスクリーン/コンファーム比では若干のバラつきを認めたものの、何れも normalized ratioを用いることで、共通して1.2を上限値として設定できる可能性を示唆する結果が得られている。また、normalizeによる効果として、試薬ロット間差や試薬間差の軽減にも有効な結果が得られており、結果の表現方法として normalizeすることを推奨したい。

3) LAの測定フロー

LAの測定フローを Fig. 2に示した⁴⁾。スクリーニング、ミキシング試験、確認試験の3つのステップを確実に実施し、かつ2法を必ず実施することが重要である。

4) 抗凝固療法に伴うLA検査

2020年にISTHより抗凝固療法中の患者におけるLA検査についてガイダンスが示された⁵⁾。抗凝固薬がLA検査に影響することを十分に認識する必要があり、誤った解釈に繋がらないよう検査室としても注意する必要がある。また、近年広く使用される直接作用型経口抗凝固薬 (DOAC) については、投与中はLA検査の実施を推奨しないと明確に示され

ている。さらに、試薬キットの特性により違いがある可能性が考えられるため、今後の検討課題である。

4. 固相化抗原測定 (SPA) 法による抗体検査

SPA法による抗体検査について保険適応となっているキットを Table 4に示した。各社キットでは、キャリアプレートや単位が統一されておらず、添付文書に記載されているカットオフ値 (参考値) も異なっており、各測定における測定値の比較評価が困難な状況となっている。APS-WSにおいて、健常人を対象とした基準値の設定ならびに各キット間の判定一致率などについて検討が実施された。その結果、試薬添付文書に記載されている参考値と大きく異なるキットが存在することや健常人基準値に基づいて判定した場合に判定一致率の向上が期待されることが報告されている⁶⁾⁷⁾⁸⁾。但し、抗体自体の多様性や測定キットにより検出される抗体も多様であることなど必ずしも一致しない場合も存在する。

SPA法による抗体検査は、適切なカットオフ値を設定することが重要であり、LAと異なり抗凝固療法中でも測定が可能であるためaPLの検出において利便性が高い。特に、近年APSパネル検査と

Table 3 健常人カットオフ値

dRVVTスクリーニング			
試薬	装置	スクリーン試薬	
		凝固時間 (sec)	Normalized ratio
LAテスト「グラディボア」	STA-compact	44.0	1.23
ヒーモスIL dRVVT	ACL-TOP 500CTS	36.7	1.22
コアグピア LA	コアプレスタ2000	34.7	1.16
LA試薬 DRVVT	CS-5100	39.9	1.20

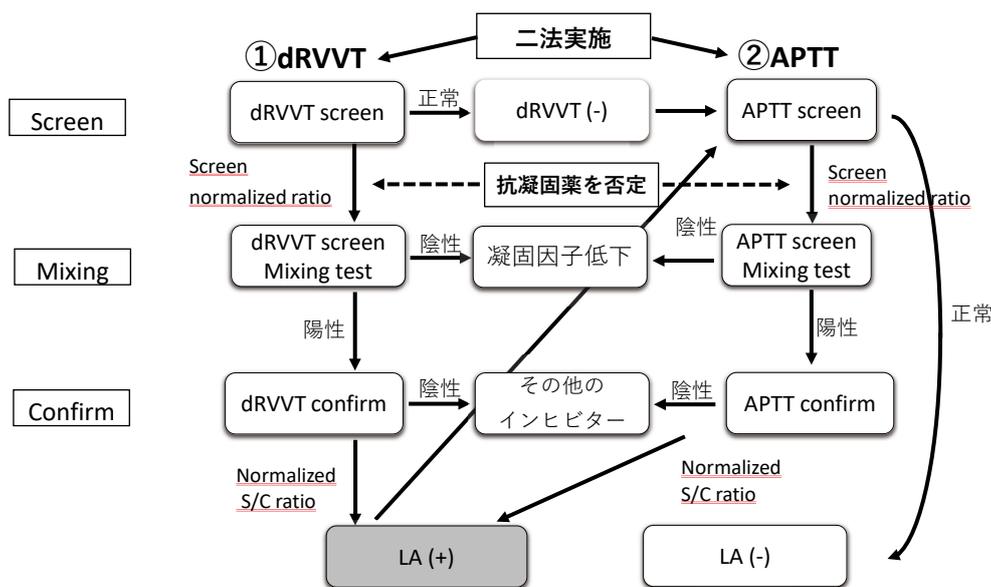
} >1.2

dRVVTコンファーム			
試薬	装置	スクリーン/コンファーム比	
		S/C ratio	Normalized S/C ratio
LAテスト「グラディボア」	STA-compact	1.21	1.16
ヒーモスIL dRVVT	ACL-TOP 500CTS	1.29	1.19
コアグピア LA	コアプレスタ2000	1.25	1.14
LA試薬 DRVVT	CS-5100	1.24	1.17

※健常人の99パーセンタイル値 (n=129) 文献3引用改変

シリカ凝固時間 (SCT)			
測定施設	SCTスクリーン		SCT-TR
	凝固時間 (sec)	Normalized ratio	Normalized ratio
徳島大学病院	49.9	1.23	1.22
聖マリアンナ医科大学病院	48.1	1.23	1.16

※健常人の99パーセンタイル値 (n=120) 文献4引用改変



文献4引用改変

Fig. 2 LA測定フロー

Table 4 SPA法による抗体検査

キット名称	添付文書陽性判定	メーカー	
MESACUP™-2テスト カルジオリビンIgG	> 12.3 U/mL	医学生物学研究所	
MESACUP™-2テスト カルジオリビンIgM	> 20.8 U/mL		
ステイシアMEBLux™テスト β2GPI IgG	≧ 0.7 U/mL		
ステイシアMEBLux™テスト β2GPI IgM	> 17.8 U/mL		
クアンタフラッシュ APS	aCL IgG	> 20 U/mL	アイ・エル・ジャパン
	aCL IgM	> 20 U/mL	
	β2GPI IgG	> 20 U/mL	
	β2GPI IgM	> 20 U/mL	
抗CL・β2GPIキット「ヤマサ」EIA	≧ 3.5 unit/mL	ヤマサ醤油	
エリア カルジオリビンIgG	≧ 10 GPL-U/mL	サーモフィッシャーダイアグノスティックス	

してISTH/SSCが推奨する検査基準に合致する抗体測定が同時に行えるようになり有用性が高いと考えられる。

その他、現在は研究用試薬となっているが、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) や抗β2GPIドメインI抗体など血栓症との関連を含めて今後の展開が期待される。

5. おわりに

抗リン脂質関連検査は、LAおよび各種抗体検査共に未だ標準化へ向かう過程にある。加えて、APS患者血中に存在するaPLは多様であり、その検出と

解釈は検査室にとってストレスフルな検査である。現状としては、可能な限り確実にaPLを検出するために、LA検査における検体の質の担保や検査のタイミングおよび測定されるべき検査項目、即ちLA、aCL、aβ2GPIの3種を包括的に測定することなど、確実なステップで検査を実施することが重要であると考えられる。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B et al.: Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost* 2020;18:2828-2839.
- 2) Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V et al.: Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018;16:809-813.
- 3) 山崎 哲, 内藤澄悦, 静 怜子, 他: APTT検査およびループスアンチコアグラント検査の標準化。血栓止血誌 2016;27:636-643.
- 4) 山崎 哲, 内藤 澄悦, 家子 正裕: 抗リン脂質抗体症候群の診断と病態解析 ループスアンチコアグラント検査の標準化。日本検査血液学会雑誌 2020;21:391-396.
- 5) Tripodi A, Cohen H, Devreese KMJ: Lupus anticoagulant detection in anticoagulated patients. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2020;18:1569-1575.
- 6) 本木由香里, 野島順三, 吉田美香, 他: ELISAによる抗リン脂質抗体測定 of 標準化に向けて。日本血栓止血学会誌 2016;27:644-652.
- 7) 野島順三, 本木由香里, 金重里沙, 他: 抗リン脂質抗体症候群の診断と病態解析 抗リン脂質抗体検査の標準化。日本検査血液学会雑誌 2020;21:382-390.
- 8) Kaneshige R, Motoki Y, Yoshida M et al.: Determination of diagnostic threshold in harmonization and comparison of clinical utility for five major antiphospholipid antibody assays used in Japan. *J Clin Lab Anal* 2022;36:e24340.

LC-MS/MSの臨床検査応用における自動化への取り組みと 欧州の最新動向

Automated LC-MS/MS for Clinical Laboratories and Recent Trends in Europe

川上大輔

Abstract A well-known example of the clinical application of mass spectrometry is the identification of microbial using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). This technique has been used for about 15 years since it first appeared in the field of clinical microbiology. Electrospray ionization (ESI) is known as a different ionization technique. An instrument that uses ESI technology is the high-performance liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS/MS). In Japan, immunoassay technique is mainly used to measure drug, steroid hormone, or Vitamin D metabolites concentrations in blood, but in European hospitals and private laboratories, LC-MS/MS is often used to measure blood concentrations due to avoid cross-reactivity with metabolites and the high selectivity.

On the other hand, LC-MS/MS requires more complicated operation than immunoassay, so automation is strongly required. Our LC-MS/MS with a fully automated pretreatment device has been widely used to measure blood concentrations of immunosuppressive drugs, antiepileptic drugs, antibiotics, steroids, 25 hydroxyvitamin D and other compounds. In this symposium, I would like to introduce the current status and future prospects of automation of LC-MS/MS for blood concentration measurement and the recent trends in Europe.

1. 質量分析技術の臨床検査応用の現状

身近な質量分析技術を用いた臨床検査応用例として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) を用いた細菌同定が挙げられる。本質量分析法には、2002年にノーベル化学賞を受賞した技術 (当社 (株式会社 島津製作所) エグゼクティブ・リサーチ フェローの田中耕一が考案) が用いられており、検査法として臨床微生物学分野に登場してから15年以上経過している。本検査法は従来の検査法と比較して、結果報告までの時間が1日以上短縮できることから、抗菌薬の適正使用による入院期間の短縮や死亡率の低

下に貢献すると言われており多くの施設で導入されている¹⁾。田中耕一と共に同年にノーベル化学賞を受賞したジョン・フェン博士により考案された質量分析技術が、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) であり、本イオン化法を用いた質量分析機器の代表例が高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) である。LC-MS/MSは、細菌同定で用いられているMALDI-TOF MSとは用途が異なり、血液中の免疫抑制薬、抗てんかん薬、抗菌薬、ステロイドホルモン類またはビタミンD代謝物など分子量が比較的小さな化合物の定量分析を得意とする²⁾。LC-MS/MSは、混合物を空間的に分離する高速液体クロマトグラフ (HPLC) と対象化合物の選択的な検出が可能な質量分析計 (MS/MS) を連結したハイブリッド型分析装置である。血液や尿サンプルの除タンパク前処理を行った後、HPLC部に通すと、試料内の各成分が移動相とカラム内の固定相に対する親和性の差により空間的に分離される。HPLC部で分離された測定対象化合物分子にMS部でESIに

Daisuke Kawakami, Ph.D.
Marketing Europe | Analytical Business Unit
Shimadzu Europa GmbH
Albert-Hahn-Straße 6-10, D-47269 Duisburg
+49(0)203/7687-434 | +49(0)174/3128843
E-mail : kawakami@shimadzu.eu

より電荷を付与してイオン化した後、電場を用いて各成分に由来するイオンを質量によって識別して検出する。さらに、アルゴンガスなど不活性ガスを衝突させることにより質量で識別したイオンを化学結合の弱い部位でフラグメント化し、分子内の部分構造に由来する質量によって再識別することができる³⁾。また、LC-MS/MSは免疫測定法と異なり抗体が不要である点や、また1回の分析で複数成分の定量を同時に行うことができる点が大きな特徴である。例えば、免疫抑制薬の場合、タクロリムスとエベロリムスを併用することがあるが、免疫測定法を用いて血中濃度測定を行う場合、それぞれの専用検査試薬を用いて2回測定する必要がある。一方で、LC-MS/MSを用いた場合、1回の分析（約2分）で両成分の血中濃度の測定を行うことができる。また、原理上、代謝物との交差反応もない⁴⁾。このようにLC-MS/MSは、代謝物との交差反応性のない、高選択的かつ高感度な同時検出を可能とすることから、ゴールドスタンダード法とされている（Table 1）。Seegerらによる免疫抑制薬の血中濃度分析（シクロスポリン、タクロリムス、エベロリムスおよびシロリムス）の外部精度管理に関する報告では、LC-MS/MSを使用して参加した施設（施設数 130～180）の結果は、いずれの施設の結果も設定濃度からのずれが±10%以内に収まっていた。一方で、免疫測定法を用いて参加した施設の結果は、タクロリムス、シロリムスおよびエベロリムスにおいて、LC-MS/MSの結果より10%以上高値を示す機器があり、加えて施設間差も大きいことを示している⁵⁾。なお、免疫抑制薬の血中濃度測定における免疫測定法の測定法間差については、TDM品質管理機構主催の免疫抑制薬TDMコントロールサーベイにおい

ても同様の報告がなされている。このような背景から、欧州の拠点病院や検査ラボの多くは、免疫測定法に加えて、多くの薬剤やステロイド類およびビタミンD代謝物の血中濃度測定にLC-MS/MSを使用している。

2. 欧州におけるLC-MS/MSを用いた臨床検査について

欧州ではドイツやフランスの拠点病院や検査ラボを中心にTherapeutic drug monitoring (TDM)等の血中濃度測定を目的としてLC-MS/MSが導入されてから20年以上が経過している。この間にLC-MS/MSを検査に用いるための環境づくりも行われてきた。

まず、LC-MS/MS用の試薬キット（キャリブレーション、精度管理（QC）試料、カラム、移動相、測定条件（分析メソッド））である。Table 1に示すように欧州では、クロムシステムズ社（Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Germany）やレシピ社（RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, Germany）といった大手試薬キットメーカーがLC-MS/MS用の試薬キットの開発および販売を行っている。TDM（免疫抑制薬、抗てんかん薬、抗菌薬、抗真菌薬他）や25-ヒドロキシビタミンDなど、20種類以上のLC-MS/MS用のキットを購入し、検査の現場で利用することができる。一方、日本ではこれらキットを輸入できるものの、欧州に比べると高価であり、かつ取り扱い品目が限定されている。免疫抑制薬やミコフェノール酸については、アルザシム社（ALSACHIM, France）のLC-MS/MS用キット（研究用途）が国内でも入手可能である。アルザシム社の免疫抑制薬用のキットについて、既に複数

Table 1 臨床検査応用における免疫測定法とLC-MS/MS法の違い

	免疫測定法	質量分析法（LC-MS/MS法）
特異性	時に困難 (交差反応の影響)	優れている
施設間差	大きい	小さい
検量線	曲線、狭い	直線、広い
標準物質	測定キットに依存	(日本では)測定キットが流通していない。 安定同位体試薬の準備が必要。 *補足：欧州では測定キットが入手可
前処理	直接測定	抽出や誘導体化が必要
自動化	全自動	ほとんど手作業
操作性	簡便	煩雑
多項目同時測定	1測定1項目（抗体必要）	1測定多項目（抗体不要）

(参考文献：千葉医学 90：79～83, 2014)

の大学病院から性能評価結果が報告されている⁶⁻⁸⁾。このように日本ではReady-to-useなLC-MS/MS用試薬キットの入手が困難であることから、LC-MS/MSを用いた血中濃度測定の際には自施設でキャリブレーション、QC試料や移動相等の調整とその管理、分析メソッドの開発が必要となり、LC-MS/MSの普及の障害の一員となっていると思われる。今後、当社を含め質量分析機器メーカーがLC-MS/MS用の測定試薬キットの開発や取り扱いについて検討していかなければならない。

一般に質量分析機器（例 LC-MS/MS）は高額である。この点も日本において、検査現場へLC-MS/MSを導入する際の障害となっているケースを見かける。前述の試薬キットの普及とも関連するが、欧州ではこの点を質量分析機器メーカーと試薬キットメーカーが協力し、項目ごとの単価契約（機器を購入するのではなく、1テスト当たりの費用で契約する）を締結するケースや、LC-MS/MSの稼働率を最大化しランニングコストを低減するために周辺の病院からサンプルを集約して対応していることが多い。

個々の施設の技術水準や検査精度を評価するために、外部精度管理はとても重要である。TDMに関して、日本では一般社団法人 TDM 品質管理機構が年に一度、免疫抑制薬、抗てんかん薬、慢性疾患薬、抗がん薬、感染症薬について外部精度管理を実施している。欧州では、国により実施状況は異なるものの、頻度は日本に比べて高いようである。例えばドイツのゲッティンゲン大学病院では外部精度管理としてリングサーベイを実施し少なくとも半年に1回、病院間でサンプルやQC試料を送り、LC-MS/MSを

用いた同一試料の測定による検査精度の評価を行っている。ゲッティンゲン大学病院によると、質量分析を用いた免疫抑制薬のルーチン分析が開始された2000年当時、最初のリングサーベイは5施設から始まった。現在はドイツ国内で100施設以上がリングサーベイを頻繁に行っているようである。フランスのある病院では、3か月毎にLC-MS/MSを用いた検査法の外部精度管理を行っている。その結果が設定した許容範囲を超えると検査を中止し、原因を追突する運用を行っている。

3. LC-MS/MSを用いた全自動分析への取り組み

LC-MS/MSを用いて分析を行う場合、事前に血液や尿中のタンパク質を除去する除タンパク前処理が必要である。これら前処理は煩雑であり、LC-MS/MSの臨床検査応用の課題の一つである。LC-MS/MSが臨床現場に普及している欧州でも近年、人材不足や人件費高騰から前処理の自動化について強い要望が上がっている。前処理の課題を解決すべく、前処理の自動化に向けた取り組みが始まっている。免疫抑制薬や25-ヒドロキシビタミンDなど検体数の多い分析を行っている欧州の病院ではFig. 1に示すような前処理のみ自動で行う機器（リキッドハンドラ前処理機）が導入されている。

この前処理装置は、一度にまとめて検体の前処理（バッチ処理）を行うことにはなるが、シンプルな除タンパク前処理に加え、除タンパク前処理では取り除くことができない成分（リン脂質など）の除去を可能とする固相抽出法や液-液抽出法など様々な前処理法にも対応が可能である。ある北欧の病院で

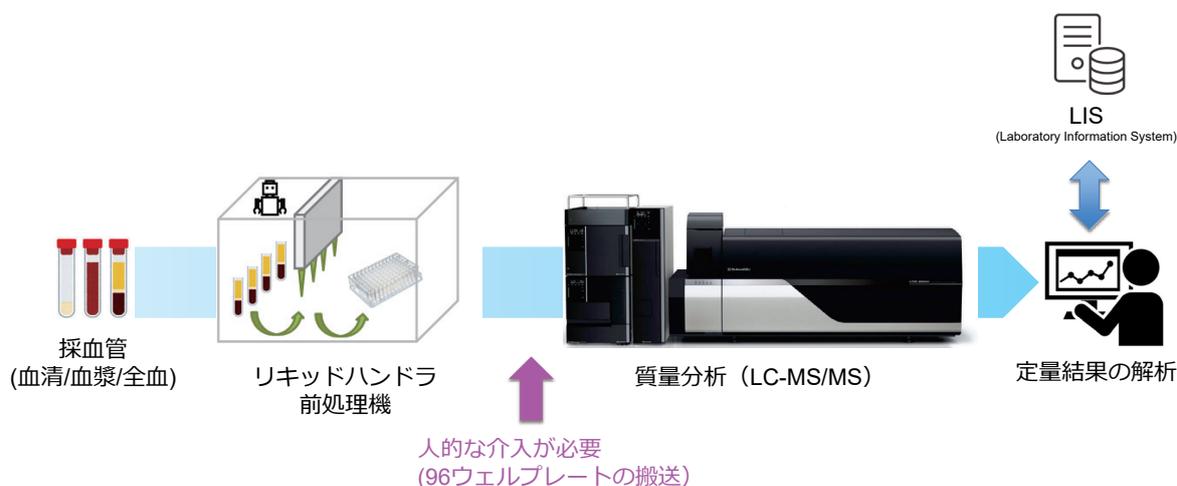


Fig. 1 リキッドハンドラ前処理機を用いたワークフロー

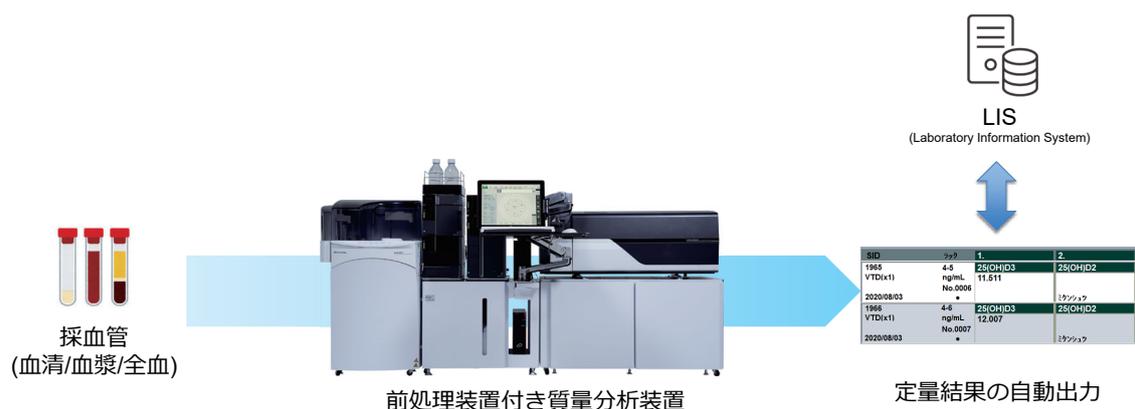


Fig. 2 全自動前処理装置付きLC-MS/MSを用いたワークフロー

は年間約35,000検体（100～130検体/日）の免疫抑制薬の血中濃度測定に1台のリキッドハンドラ前処理機と2台のLC-MS/MS、そしてLC-MS/MS用の免疫抑制薬分析キットを用いて日々の検査を行っている。なお、内1台のLC-MS/MSは主にバックアップを目的として設置されている。

リキッドハンドラ前処理装置は、生化学自動分析装置や免疫測定装置のような臨床検査装置と異なり、ランダムアクセスによる検体投入や緊急検体対応に不向きである。また、前処理後に96ウェルプレートの搬送といった操作者の介入が必要である。院内では、他の検査への対応や医師からの問い合わせ対応など突発的な業務の発生が想定されることから、ランダムアクセス対応や操作者の介入の低減が望まれている。そこで近年、採血管をセットするだけでLC-MS/MS分析まで全自動かつ簡便に行うことのできる全自動前処理装置付きのLC-MS/MSが開発（Fig. 2）され、欧州を中心に導入が進んでいる。

ドイツのゲッティンゲン大学病院は、全自動前処理装置付きLC-MS/MSを用いて抗菌薬、抗てんかん薬、経口抗凝固薬（DOACs）、25-ヒドロキシビタミンD他のルーチン分析を行っている。彼らは採血管を全自動前処理装置内にセットしてから約6分で結果をLISへ自動出力されるワークフローを構築し、その系の安定性について、βラクタム系抗菌薬を例に報告している⁹⁾。

また、同病院の検査室ではLC-MS/MSの専門家は1名のみだが、全自動化により約30人の検査技師が、いつでも全自動前処理装置付きのLC-MS/MSを用いた血中濃度測定を実施できる体制となっている。当社の全自動前処理装置付きLC-MS/MSは、免疫抑制薬⁶⁻⁸⁾、抗菌薬⁹⁻¹⁰⁾、ステロイド類¹¹⁾、25-

ヒドロキシビタミンD¹²⁾、抗がん剤（5-FU）のフェノタイプング¹³⁾、有機酸¹⁴⁾を含め、幅広く血中濃度測定に用いられており、2024年1月現在11報以上の査読付き学术论文が出版されている。

5. まとめ

欧州の拠点病院や検査ラボでは血中薬物濃度、ステロイド類、ビタミンD代謝物、新生児マスキリーニング、中毒分析など臨床検査にLC-MS/MSが用いられている。その背景として、LC-MS/MSが代謝物との交差反応性がなく、高選択的かつ高感度に血中濃度測定を実現できる点だけでなく、試薬キットが入手できる環境であることや外部精度管理により検査精度を評価できるシステムが構築されている点も大きい。近年、全自動前処理装置付きLC-MS/MSが発売され、従来の免疫測定装置と同様の操作感覚でLC-MS/MS分析が行えるようになった。今後、全自動前処理装置付きLC-MS/MSは院内のホストシステム（LIS）や搬送システム（LAS）とも接続する。そして、従来の免疫測定法を補完する役割として臨床検査室で活躍する時代は近い。

私はShimadzu Europa GmbHの社員であり、本発表に関わる費用等は所属企業の経費等で支払われています。

文献

- 1) 小松 方. MALDI-TOF MS を用いた臨床微生物学的検査の新しい潮流原理から応用まで. 日本臨床微生物学雑誌, 26(2):79-89, 2016.
- 2) Maekawa M, Mano N. Cutting-edge LC-MS/MS

- applications in clinical mass spectrometry: Focusing on analysis of drugs and metabolites. *Biomed Chromatogr.*, 36(5):e5347, 2022.
- 3) 島津製作所. LC-MS の基礎ガイド, 2019. (オンライン), 入手先https://www.an.shimadzu.co.jp/lcms/support/lib/foundation_guide.htm
 - 4) 川上大輔: 全自動前処理装置付きLC-MS/MSシステムを用いた免疫抑制薬および代謝物の血中濃度測定法および測定キット, *臨床化学*, 50(4):373-379, 2021.
 - 5) Christophe S., et al.: Assuring the Proper Analytical Performance of Measurement Procedures for Immunosuppressive Drug Concentrations in Clinical Practice: Recommendations of the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Immunosuppressive Drug Scientific Committee. *Ther Drug Monit.*, 38(2):170-89, 2016.
 - 6) Shimada T, Kawakami D, Sai Y, et al.: Validation of an automated sample preparation module directly connected to LC-MS/MS (CLAM-LC-MS/MS system) and comparison with conventional immunoassays for quantitation of tacrolimus and cyclosporin A in a clinical setting. *J Pharm Health Care Sci.*, 10(1):5, 2024.
 - 7) 高根真希, 田藤晶深, 金子結, 木村茂樹, 前田育宏, 日高洋: 全自動LCMS前処理装置CLAMを用いた質量分析法による免疫抑制薬の血中濃度測定に関する評価, *移植*, 56(1), 2021.
 - 8) 鈴木瑛真, 村井良精, 小林亮, 田中真輝人, 近藤崇, 浅沼康一, 高橋聡: 全自動LCMS前処理装置CLAMTM-2030を用いた液体クロマトグラフィー質量分析用免疫抑制剤分析キット「DOSIMMUNETM」の性能評価, *医療検査と自動化* 48(1), 2023
 - 9) Khromov T, et al.: 24/7 Therapeutic Drug Monitoring of Beta-Lactam Antibiotics with CLAM-2000. *Antibiotics (Basel)*, 12(10):1526, 2023.
 - 10) Magréault S et al.: Automated HPLC-MS/MS assay for the simultaneous determination of ten plasma antibiotic concentrations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 1211:123496, 2022.
 - 11) Fraissinet F et al. A novel fully-automated method to measure steroids in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab.*, 15:27:24-32, 2022.
 - 12) Miyamoto H, Kawakami D et al.: Determination of a Serum 25-Hydroxyvitamin D Reference Ranges in Japanese Adults Using Fully Automated Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Nutr.*, 153(4):1253-1264, 2023.
 - 13) Robin T, Saint-Marcoux F, Toinon D, Tafzi N, Marquet P, El Balkhi S.: Automatic quantification of uracil and dihydrouracil in plasma. *J Chromatogr B*:1142, 2020.
 - 14) Ueyanagi Y., Setoyama D., Kawakami D., Mushimoto Y., Matsumoto S., Hotta T., Kang D.: Fully Automated Quantitative Measurement of Serum Organic Acids via LC-MS/MS for the Diagnosis of Organic Acidemias: Establishment of an Automation System and a Proof-of-Concept Validation. *Diagnostics*, 25;11(12):2195, 2021.

第55回大会シンポジウム講演要旨/LC-MS/MS（質量分析装置）による臨床検査としての薬物濃度測定

LC-MS/MS法による血中免疫抑制剤濃度の測定と 検査部での運用の実際

Analysis of immunosuppressant drug in blood by LC-MS/MS method
and practical application in laboratory.

鈴木瑛真^{1,2)}, 小林 亮¹⁾, 近藤 崇¹⁾, 遠藤明美¹⁾, 高橋 聡^{1,2)}

要旨 免疫抑制剤の血中濃度測定について、近年、質量分析法による検査の自動化を目的として、検体前処理装置CLAM-2030TMおよびLC-MS/MS用免疫抑制剤分析キットDOSIMMUNETMが開発された。これらの機器および試薬の性能評価を行った結果は良好で、シクロスポリンおよびタクロリムスは日常検査で本キットを用いた運用を開始している。加えて当院では、液体窒素を用いることで溶血処理時間を従来の15分から15秒に短縮した。本キットを用いた免疫抑制剤の血中濃度測定は、特異性が高く、操作も簡便であるため、LC-MS/MS法の臨床検査分野への普及に寄与できるものであると考える。

Key words LC-MS/MS, 血中濃度モニタリング, 検体前処理装置

1. はじめに

シクロスポリン (Cyclosporine: CSA), タクロリムス (tacrolimus: TAC), エベロリムス (Everolimus: EVL)は免疫抑制剤として臓器移植後の拒絶反応の抑制に用いられている薬剤である。これらの免疫抑制剤は微量で強力な薬理効果を有する反面、有効濃度域が狭く、加えて薬物代謝能は肝機能および腎機能の影響を受けるため、体内動態の個人差が大きいことから、血中濃度のモニタリングが必要となる^{1,2)}。従来、これらの血中濃度測定には様々な免疫学的測定法が用いられてきたが、測定原理の違いで測定値が異なることや、同一試薬であっても試薬ロット間差が大きいなどの問題点が指摘されていた³⁻⁶⁾。液体クロマトグラフィー質量分析法 (Liquid chromatography tandem mass spectrometry: LC-MS/MS法) は、免疫反応特有の非特異的反応がなく、高い特異性を有することから、あらゆる測定法のgold standardとして用いられてきた。しかし、LC-

MS/MS法の臨床検査への普及は未だ不十分である。今回、その背景と普及への課題、運用の実際と工夫について紹介する。

2. LC-MS/MS法を用いた血中薬物濃度測定の実状

LC-MS/MS法は、免疫学的測定法の上位標準物質の値付けに使用されている、非常に特異性の高い分析方法として位置付けられているにもかかわらず、検査室へはあまり普及していない。一般社団法人TDM管理機構が実施した2023年TDMコントロールサーベイにおける検査法の集計結果によると、CSAおよびTACは72件中2件(3%)、EVLは30件中2件(7%)とLC-MS/MS法により測定を行っている施設は少ないことがわかる⁷⁾。その理由として、LC-MS/MS法は除蛋白等の前処理が必要であり、その操作が煩雑であることに加え、移動相などの試薬や、検量線の作成に用いる標準物質は自施設で調整する必要があることが挙げられる。この問題を解

Ema SUZUKI^{1,2)}, Ryo KOBAYASHI¹⁾, Takashi KONDO¹⁾, Akemi ENDO¹⁾, Satoshi TAKAHASHI^{1,2)}

¹⁾札幌医科大学附属病院 検査部

Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital.

²⁾札幌医科大学医学部 感染制御・臨床検査医学講座

Department of Infection Control and Laboratory

Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine.

〒060-8543 北海道札幌市中央区南1条西16丁目

Corresponding Author: 鈴木瑛真

TEL: 011-211-6111 (内線36460)

FAX: 011-622-8502

E-mail: maema@sapmed.ac.jp

決するために、株式会社島津製作所より検体前処理装置CLAM-2030™および、免疫抑制剤分析キットDOSIMMUNE™が発売された。検体前処理装置CLAM-2030™を用いることで、従来手法で約15分を要していた前処理操作が、約3分で実施可能となった。また、技術者間差がなく、前処理後の試料は自動で高速液体クロマトグラフィー部に導入され、質量分析まで行われる。すなわち、検体を搭載後、前処理から結果報告までの全自動化が可能となる。免疫抑制剤分析キットDOSIMMUNE™は、移動相、キャリブレーター、コントロール、カラム、内部標準液、前処理専用容器などがキット化された製品であり、CSA、TAC、EVL、シロリムスの4剤同時検出が可能であるため、自施設での試薬調整が不要となる。これらを用いることで従来のLC-MS/MS法の問題点を克服し、臨床検査へ実用できる可能性がある。そこで、本キットを用いた免疫抑制剤の血中薬物濃度測定を日常検査に導入すべく、基本性能の検討を行った。

3. 免疫抑制剤分析キットDOSIMMUNE™の性能評価

今回、院内検査として実施しているCSAおよびTAC、外部委託検査として実施しているEVLの3剤について検討を行った。

はじめに、3濃度のプール試料を用いて併行精度および室内再現精度を調べた。米国FDAより2018年に発行されたBioanalytical Method Validation⁸⁾では、LC-MS/MS法のばらつきは15%以下であることが推奨されており、いずれの薬剤についてもこの基準を満たしていた。したがって、LC-MS/MSによるこれら薬剤の測定は、日常検査に適用可能な精度を有していると考えられた。次に、定量限界(CV 15%値)および希釈直線性を調べた。定量限界から希釈直線性の上限までを測定範囲とした場合、いずれの薬剤においても対照法である免疫学的測定法と比較して測定範囲が拡大した。また、免疫学的測定法との相関性について解析したところ、いずれの薬剤においても相関係数は良好であったが、CSAおよびTACで2~3割程度、EVLで4割程度LC-MS/MS法で低値であった。

4. 当院における運用の実際

1) 運用に至るまで

性能評価の結果を受け、院内測定していたCSAとTACについてLC-MS/MS法を用いた運用を開始することとした。しかし、従来法であるAffinity

chrome mediated immunoassay (ACMIA法)とLC-MS/MS法とで測定値に差があることから、ACMIA法の値も併記してほしいとの要望があり、LC-MS/MS法の測定値と、そこから前述の相関性の回帰式を用いて算出したACMIA法への換算値の同時報告をすることとした。この回帰式について、作成に用いた群と異なる検体を用いて相関性を検討したところ、いずれの薬剤についても良好な相関性を示したため、今回回帰式はLC-MS/MS法からACMIA法への値の推定に有用であると判断し、運用を開始した。

2) 測定の流れと課題

LC-MS/MS法で検査を行うにあたり、従来の分析装置同様に始業前の装置の立ち上げと精度管理が必要となる。この一連の作業に約40分を要する(Fig. 1)。精度管理試料の測定値が管理範囲内であれば、患者検体の測定を行う。実際の検体測定において、ACMIA法は除蛋白や溶血等の前処理は装置内で行われるため、混和した検体を専用カップに分注し、機器に架設する操作のみで、前処理を含め約20分で結果報告が可能である。一方、LC-MS/MS法は測定前に試料を-80℃で15分間凍結(以下、従来法)して溶血させ、その後流水融解するため、測定までの時間がその分長くなってしまい、単独測定の場合でも検体受付から測定終了まで約30分を要する(Fig. 2)。また、LC-MS/MS法は分析に使用できる流路が1つしかないため、架設する検体数が多い場合、検体受付から結果報告までの時間(Turn around time; TAT)が延長してしまうという点が課題であった。この課題を解決するため、溶血処理に要する時間に着目し、液体窒素を用いることで溶血処理時間を短縮可能か否かについて検討した。

まず最適な凍結時間を決定するため、液体窒素への浸漬時間を5秒、15秒、30秒、1分および5分の条件で試料を凍結させ、従来法(-80℃で15分凍結)の測定値と比較した。その結果、5秒の浸漬時間では溶血が不十分となり、従来法で処理した測定値と比較して明らかな測定値の乖離が認められた。また、液体窒素への浸漬はピンセットで検体を把持して行うため、凍結時間が1分以上になると把持時間が長く、検査者の負担が生じた。従って、凍結時間は15秒あるいは30秒が妥当と考え、両条件にて試料を10重測定し、測定値のばらつきを比較したところ、両者に大きな差は認められなかったため、凍結時間は15秒が妥当と考えられた。そこで、液体窒素に15秒浸漬させる凍結条件にて、CSA 30件、TAC 50件について従来法との相関性を調べたところ、

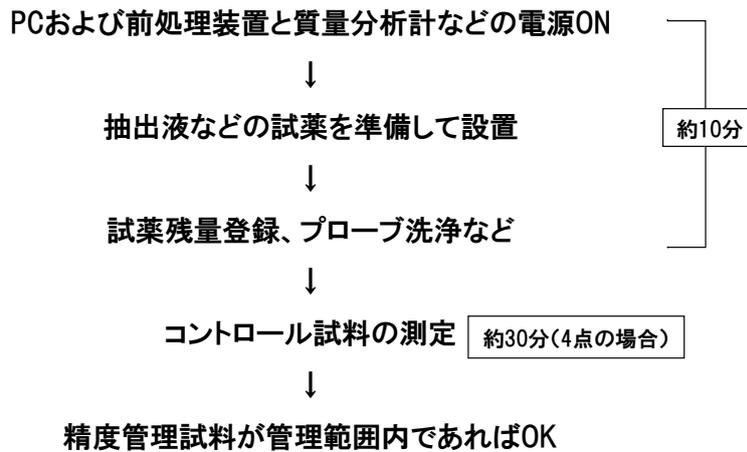


Fig. 1 LC-MS/MS法の測定前準備

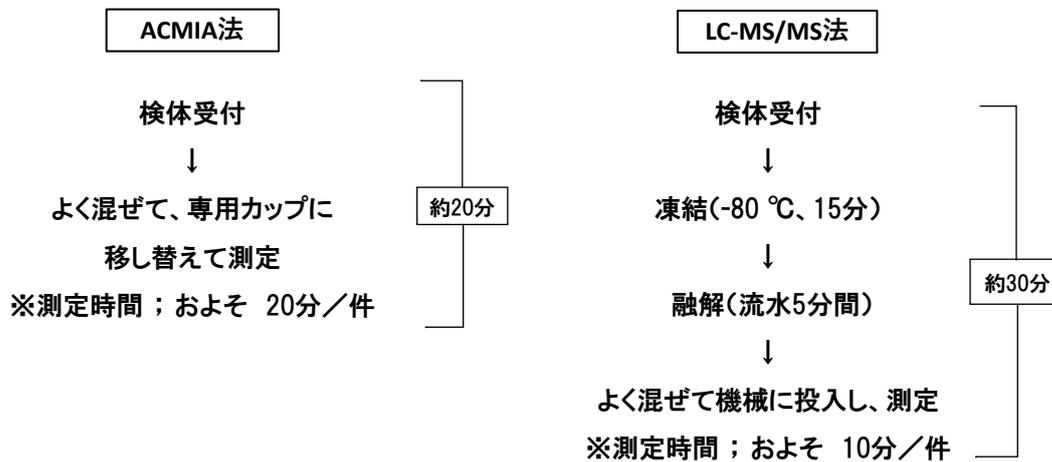


Fig. 2 LC-MS/MS法とACMIA法の測定手順の比較

どちらも良好な相関性が確認された。以上より、液体窒素を用いた凍結方法を日常検査で実施したところ、検体受付から結果報告までが約15分となりTATの大幅な短縮が可能となった。

5. まとめ

CLAM-2030™およびDOSIMMUNE™を用いたLC-MS/MS法による血中濃度測定は、良好な性能を有し、LC-MS/MS法の臨床検査への導入が容易となった。LC-MS/MS法は複数検体の測定には時間を要するという課題が残る一方で、一度の分析で複数の項目を分析でき、非常に高い特異性を有することから、今後より多くの検査項目への適用が期待される。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) 日本 TDM 学会, 日本移植学会編. 免疫抑制薬 TDM 標準化ガイドライン 2018 [臓器移植編]. 東京: 金原出版, 2018.
- 2) Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. Clin Pharmacokinet 2004;43:83-95.
- 3) 打田和治. 2011年シクロスポリン血中濃度測定精度管理結果報告 (ASI Ltd. & CCPF Joint Program) International quality control survey 結果より. 今日の移植 2011;24:568-572.

- 4) 端幸代, 増田智先, 山本崇ほか. Tacrolimus血中濃度測定法の差異に関する臨床的評価: MEIA, CLIA, ACMIA, EMIT間の比較検討. 移植 2012;47:75-81.
- 5) Shipkova M, Vogeser M, Ramos PA, et al. Multi-center analytical evaluation of a novel automated tacrolimus immunoassay. Clin Biochem 2014;47:1069-1077.
- 6) Vogeser M, Shipkova M, Rigo-Bonnin R, et al. Multicenter analytical evaluation of automated electrochemiluminescence immunoassay for cyclosporine. Ther Drug Monit 2014;36:640-650.
- 7) 一般社団法人 TDM管理機構 (qctdm.jp) 2023年度TDMコントロールサーベイ結果
- 8) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, Biopharmaceutics; U.S., 2018.

造血幹細胞移植における免疫抑制剤の 薬物血中濃度測定の意義

Significance of therapeutic drug monitoring of immunosuppressive agents
for hematopoietic stem cell transplantation.

井山 諭^{1,2)}, 遠藤明美²⁾, 高橋 聡^{2,3)}

要旨 同種造血幹細胞移植における、免疫抑制剤の使用法とその薬物血中濃度測定の重要性について報告した。現在、施設間で血中濃度測定方法が統一されていないことと、また測定システムの違いにより測定値に差が生じることによって、患者に健康被害が生じる可能性があることが問題視されている。測定に代謝産物の影響を受けず特異性に優れ、さらに多項目を同時に測定することが可能な液体クロマトグラフィー質量分析法（Liquid chromatography tandem mass spectrometry: LC-MS/MS）が臨床検査分野において注目されており、今後免疫抑制剤のモニタリングにおいても中心を担う可能性が予想される。

Key words 液体クロマトグラフィー質量分析法, 同種造血幹細胞移植, 免疫抑制剤

1. はじめに

他者の免疫細胞を治療目的で用いる同種造血幹細胞移植においては、強力な免疫力をいかに適正にコントロールするかが最重要課題であり、その成否が治療成績を左右すると言っても過言ではない。用いられる免疫抑制剤としては、タクロリムスやシクロスポリンといったカルシニューリン阻害薬（CNI）がその中心になるが、血中濃度を詳細にモニタリングしながら投与量を適切に調節する必要がある。これらの薬剤は、効果発現および副作用の観点から適正な血中濃度の範囲が定められているものの、実際に目標とする値は、疾患の種類や病勢（寛解もしくは非寛解）、移植後の時期、前処置の種類、ドナーソースの違い等によって異なっている。また適正治療濃度域が狭い薬剤もあるため、血中濃度の調整には非常にデリケートな操作が要求される。一方で薬物血中濃度を測定することの重要性にも関わらず、

本邦においては免疫抑制剤の血中濃度は統一された方法を用いて測定されておらず、日本造血・免疫細胞療法学会のガイドラインにおいても測定システムの違いによる測定値の差に関して注意喚起がなされている。

近年では、測定に代謝産物の影響を受けず特異性に優れ、さらに多項目を同時に測定することが可能な液体クロマトグラフィー質量分析法（Liquid chromatography tandem mass spectrometry: LC-MS/MS）の臨床検査分野における期待が高まっており、今後日常臨床検査においても中心を担う可能性が予想される。本法のメリットは、1) 代謝産物の影響を排し、患者個人差をなくした薬物血中濃度を測定することにより、どの患者においても目的とする免疫抑制効果や、副作用のモニタリングが可能になる。2) 施設間差を無くし、検査の標準化を図ることができる、といったことが考えられる。2023

Satoshi IYAMA^{1,2)}, Akemi ENDOH²⁾, Satoshi TAKAHASHI^{2,3)}

¹⁾ 札幌医科大学医学部 血液内科学
Department of Hematology, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan

²⁾ 札幌医科大学附属病院 検査部
Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital, Sapporo, Japan

³⁾ 札幌医科大学医学部 感染制御・臨床検査医学講座
Department of Infection Control and Laboratory Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan

年10月6日～8日に行われた日本医療検査科学会第55回大会シンポジウム3において、「LC-MS/MS（質量分析装置）による臨床検査としての薬物濃度測定」というテーマで、LC-MS/MSの臨床応用に関する議論が行われた。著者はこれまでに血液悪性疾患に対する造血幹細胞移植に従事してきた立場から、本治療における免疫抑制剤の血中濃度測定に関しての発表をしたが、本稿で概要に関して記したい。

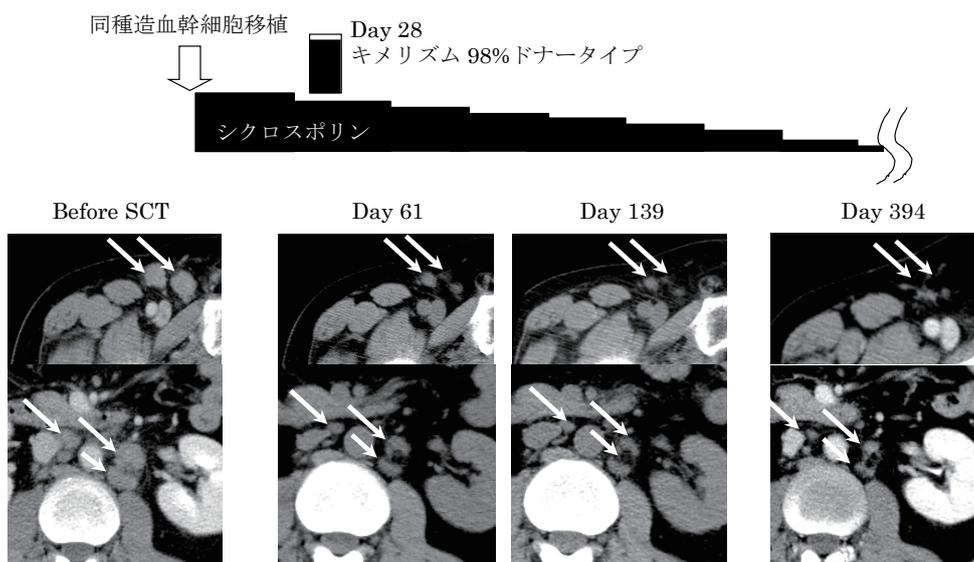
2. 造血幹細胞移植の概要

急性白血病を代表とする造血器悪性腫瘍に対する治療は、殺細胞性の抗悪性腫瘍剤を用いる化学療法が中心であるが、一度は寛解が得られても時間をおいて再発したり、初回化学療法に治療抵抗を有する場合もある。こういった再発・難治性の造血器悪性腫瘍に関しては、抗悪性腫瘍剤のみでは根治に導くことは多くの場合で困難であり、唯一の根治性を有する治療が同種造血幹細胞移植である。その優位性は1) 造血幹細胞を「バックアップ」として担保することで、骨髄へのダメージを考慮する必要のない「大量化学療法」が可能になる、2) 他者の細胞（特にリンパ球）による抗腫瘍効果を利用した「免疫細胞療法」が可能になる、この2点にある。この大量化学療法と免疫細胞療法という強力な抗腫瘍効果を有する治療により難治性疾患をも根治させることが可能となるのだが、他方で重大な副作用も頻度が高くなるのは想像に難くないであろう。大量化学療法の副作用としては、顕著な（レジメンによっては回復不可能な）骨髄抑制とそれに伴う感染症（白血球減少）、心不全（赤血球減少）、腫瘍臓器への出血（血小板減少）や、消化管粘膜障害による、口内炎・胃腸炎・バクテリアルトランスロケーションによる敗血症が頻度が高い。高用量の薬剤投与に伴う、肝機能、腎機能障害や心機能低下も問題になる。一方免疫細胞療法では、移植時に混入するドナー由来のTリンパ球によって惹起される急性移植片対宿主病（acute graft-versus-host disease; aGVHD）が、移植後比較的早期にみられる主な合併症である。移植後のaGVHD発症率は、ドナーソースや移植前処置によって発症率や重症度が異なるが、一般的に血縁者ドナーでは非血縁ドナーに比較して、発症率は低く重症度も軽度である傾向がある。非血縁ドナーでも臍帯血を用いた場合は、GVHDは発症率も低く、軽症にとどまることが多い。基本的にaGVHDは、皮膚・肝臓・腸管に発症する。教科書的にはいずれも皮膚病変を伴うとされているが、より重症化しやすいのは肝臓、腸管病変を伴うものである。他者の

リンパ球による抗腫瘍効果とaGVHDは原理的には同じ同種免疫を見ているため、強い免疫を期待して「治療効果」をとるべきか、「安全性」を担保するために免疫抑制を強くするかは長年議論のあるところではあるが、コントロール不能なGVHDは命に関わる合併症になるため、移植直後は強力に免疫抑制をかけつつ、徐々に免疫抑制剤を漸減しながら抗腫瘍効果を効かせるというのが、現時点での基本的な考え方となっている。

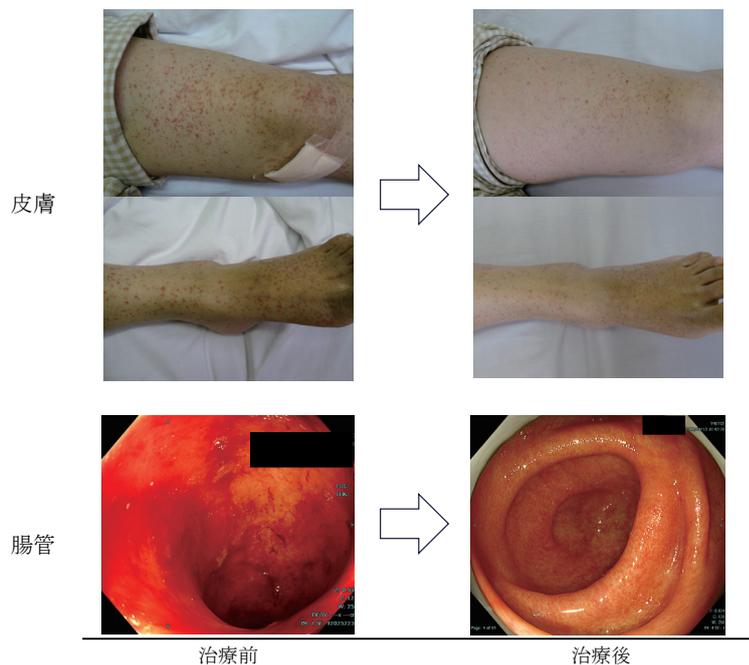
3. 造血幹細胞移植における免疫抑制剤の重要性

上記のように造血幹細胞移植においては、免疫抑制剤の調整の成否が移植を成功させる鍵を握っていると言っても過言ではない。造血幹細胞移植における免疫抑制剤の主力はCNIであり、シクロスポリンやタクロリムスがそれに該当する。免疫抑制剤は悪性度の強い（初回寛解導入不応例、早期再発例など）悪性腫瘍においては、aGVHDの発症をある程度は許容しつつも抗腫瘍効果を期待して可及的速やかな免疫抑制剤の減量を図ることを試み、一方、疾患コントロールは良好にできていて地固め療法的な移植をするような場合には、より安全性を重視してaGVHDを起こさないように免疫抑制剤の血中濃度を高めにつつ、比較的緩やかに漸減を計画するといった微調整をする。さらに病勢のみならず、ドナーは血縁か非血縁か臍帯血なのか、採取方法は骨髄採取なのか末梢血幹細胞採取なのか、様々な要素を総合的に考慮して免疫抑制剤の調整をする必要がある。一例として濾胞性リンパ腫に対する同種造血幹細胞移植後の経過を提示する（Fig. 1）。症例は化学療法抵抗性となったリンパ腫で、下段左のCTでは左鼠径部や大動脈周囲のリンパ腫病変が確認できる。移植前処置で用いられた化学療法の効果で病変の縮小をみとめるものの移植後2ヶ月の時点ではまた残存病変が確認できる（Day 61）。Day 28で骨髄細胞のドナータイプへの入れ替わりを確認した後に、抗腫瘍効果を増強させる目的で免疫抑制剤（シクロスポリン）の漸減を試みた。すると病変はさらなる縮小を認め、腫瘍免疫のみで病変は完全に瘢痕化まで至った（Day 394）。ここで重要なことは、免疫抑制剤の血中濃度をモニタリングしながら、重症のaGVHDを起こすことなく、かつ抗腫瘍効果を得るために可能な限りの速さで免疫抑制剤を減量することであり、血中濃度測定の重要性が理解できると思う。移植後は抗悪性腫瘍薬を用いることなく、ドナー由来の免疫細胞による抗腫瘍効果のみで化学療法抵抗性の悪性リンパ腫を治癒に導くことが可能であ



筆者提供

Fig. 1



筆者提供

Fig. 2

った。一方で、実際にaGVHDを発症した症例を提示する (Fig. 2)。図の左側が発症時で、上段は皮膚に局限した症例、下段は腸管にも病変を認めた症例である。いずれも免疫抑制療法の強化 (CNI+ステロイド) にて治療効果が得られているが、ここで

もCNIに関しては薬物血中濃度を適正に保つことが大変重要なポイントになる。また、免疫抑制剤は併用薬の影響を受けることがあり注意が必要となる。CNIのタクロリムスはCYP3A4とCYP3A5、シクロスポリンは主にCYP3A4で主に代謝されるため、

併用薬剤との相互作用には注意が必要である。移植後には真菌感染予防薬としてアゾール系抗真菌薬を用いるが、これらは強力なCYP3A4阻害作用を有する薬剤でありCNIの血中濃度を押し上げることになるので、ここでも免疫抑制剤の血中濃度の注意深いモニタリングが必須となる。Fig. 3にアゾール系抗真菌薬であるポリコナゾール使用後にタクロリムス血中濃度が急上昇した症例の経過を提示する。軽微な血中濃度のモニタリングをして薬剤の投与量を調整した症例である。

4. 液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) に対する期待

緒言にも記載したが、同種造血幹細胞移植における免疫抑制剤の使用には薬物血中濃度を厳格に測定することが不可欠であるにも関わらず、施設間での測定方法が統一されていないという問題がある。血中濃度測定方法についての議論も進んでおらず、例えば日本造血・免疫細胞療学会のガイドライン (GVHD 第5版) ではシクロスポリンの血中濃度測定に関してはFluorescent polarization immunoassay (FPIA) 法を用いた測定に言及があるが、実際には本システムはすでに販売中止となっている。現在の免疫抑制剤血中濃度の測定法は免疫学的測定法が主流であり、Chemiluminescent enzyme immunoassay (CLIA) 法, Affinity column mediated immunoassay

(ACMIA) 法, Enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) 法などが用いられているが、施設によって採用は異なっている (Fig. 4)。免疫学的測定法は前処理が不要で簡便に測定が可能であるが、代謝物との交差反応性があるため偽陽性・偽陰性反応があることに注意が必要である。さらに、選択する測定法の違いにより薬物血中濃度の結果が異なることは国内外からも報告があり、例えばタクロリムスにおいては、低濃度域ではELISA法やCLIA法に対してACMIA法やEMIT法は高値を示し、中～高濃度域ではELISA法, CLIA法, EMIT法に対してACMIA法が10～20%低くなることが報告されている²⁾。この点では、分離分析法は抗原抗体反応を利用していないため特異性が高く、代謝物等の構造的に類似する物質の測定も同時に可能である。LC-MS/MS法は代謝物との交差反応性はみられず、安定した測定結果が得られるメリットがある。高価な機器が必要となることが欠点ではあるが、原理的に施設間 (測定方法間) での測定結果の差が出ないことは重要な点の一つであり、今後機器の進歩と価格低下に伴い、多くの施設で導入されることを期待したい。現在当院においては、現在シクロスポリン及びタクロリムスの血中濃度測定はLC-MS/MSを用いた測定をしている。当院検査部での検討では、従来のACMIA法との比較では、LC-MS/MS法においてやや低値を示すことが示された (data not

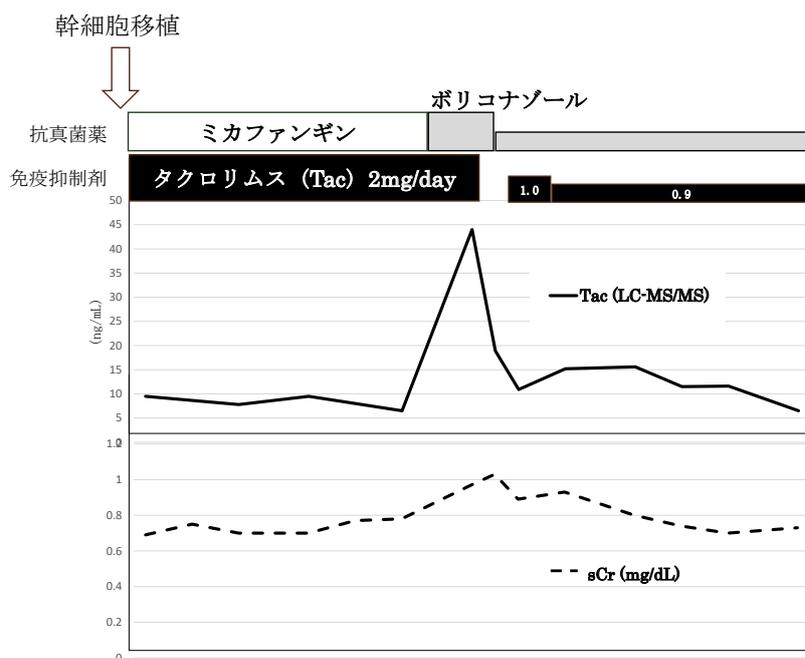
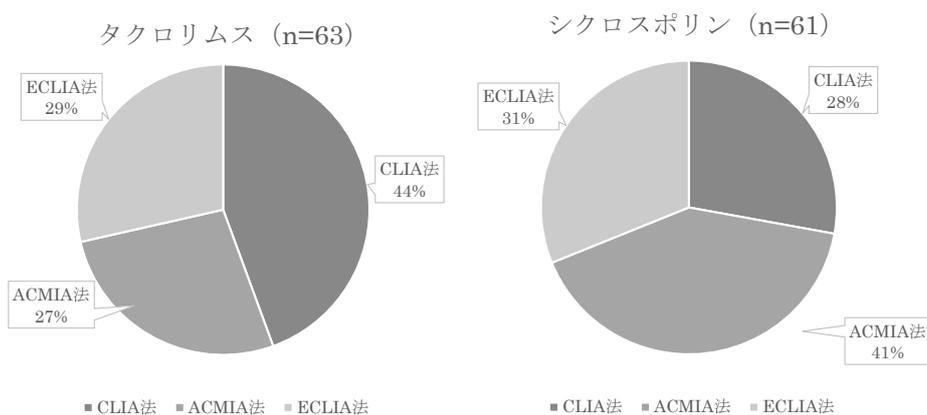


Fig. 3



増田智先 他. 免疫抑制薬TDMコントロールサーベイ報告2016~2021年度. TDM研究会 2022;39(2):133より作成

Fig. 4

shown)。実臨床において血中濃度と薬剤投与量の調整は、従来の免疫学的測定法での結果を基準にしているため、現在は換算式を用いてLC-MS/MS法で得られたデータをACMIA法に換算して対応しているが、将来的にはLC-MS/MS法を用いた測定で血中濃度の目標値を定め、薬剤の投与量調整ができるようになればと考えている。

本論文の要旨は、日本医療検査科学会第55回大会（2023年10月、横浜）で発表した。

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) Kimura M, Yamagishi Y, Kawasumi N, et al. Clinical implication of therapeutic drug monitoring on voriconazole from the aspect of the analysis for CYP2C19 gene. *Jpn J Antibiot.* 2010;63:255-64
- 2) 免疫抑制薬TDM標準化ガイドライン 臓器移植編, 日本TDM学会, 日本移植学会編, 金原出版株式会社; 東京, 2018;77

POCT 機器管理・精度管理が出来ていない状況について

The situation of the lack of POCT instrument management
and accuracy control

津田喜裕

要旨 我々が扱う検査値は汎用機器のみではなくPOC機器の検査値も扱うが、管理外の機器においては、検証等は行われず根拠が得られなくても検査値報告を実施していた。POC機器の値が汎用機と大きく乖離していた事で、処置、診療の遅延をきたし患者への負担が大きくなった。検査値を扱う上で如何なる場合もその値に対しての根拠となる検証は必要不可欠である。また、検査部がPOCTの管理介入することは、大きな効果が予想され有益である事が考えられた。

Key words POCT, ISO15189, 救急初期診療支援

1. はじめに

POCT (Point-of-Testing) の導入にはさまざまな利点がある。POCTは患者の近くで検査を実施し即座に結果が得られるため、診断と治療が速やかに開始され、これにより迅速な医療介入が可能となる。POCTは簡単に使用ができ訓練を受けた医療スタッフが測定することで結果を取得でき、繁忙な救急外来でのリソースの最適利用が可能である。また、災害現場、非医療環境での利用が可能で緊急事態での判断が容易になる。POCTは臨床現場において有益であるが、測定者である医師、看護師の教育が必須であり、機器、試薬のメンテナンスの管理のためには検査室との連携が必要であり、正確性や品質管理に十分な注意を払うことが重要である。ISO15189の改訂に伴いPOCTの管理事項が盛り込まれた。今回、自施設にてPOCT-Cre値と自動分析Cre値で大きな解離を認め診療方針が変わる事例が発生した。

今後の対策を含めて報告する。

2. 当施設における現状

近畿大学病院は929床、36の診療科がある。各診療科で購入、測定している全てのPOCT機器の現状把握が出来ていないのが現状である。中央臨床検査部はISO15189を取得し検査における精度保証に取り組んでいる。手術室、心カテ室、救命病棟、呼吸器病棟の検査機器は管理を実施しており、手術室の検査機器は、輸血部から毎日1名が出向して手術室から出される検査を実施し、機器管理を行っている。それ以外の機器は、中央臨床検査部が機器管理を実施している。

1) 救急初期診療支援

近畿大学病院は、一般外来・入院棟以外に一次救急から3次救急を専門に患者搬送される救急災害棟がある。検査部は救急災害棟内にサテライトラボを設置しており、ラボ内では生化学検査、血算、凝固線溶検査、感染症検査、一般検査、薬物迅速検査をする技師が毎日1名出向して24時間、救急初期診療の支援を行っている。支援内容は、PT-INR (Roche社 CoaguChek®Pro II)、CRE (nova社 スタットセンサー エクスプレス)、SMBG (TERUMO社 メディセーフ フィットスマイル) のPOCT機器を用いて測定、心電図、採血の支援を実施している。

2次救急患者 (脳虚血疾患、循環器疾患) 搬送が決まると、事務からPHSに搬送連絡が入り、患者の搬送前にPOCT、心電図、採血管等の準備をし患者搬送に対応する。患者が搬送されしだい心電図、

Yoshihiro Tsuda
近畿大学病院 中央臨床検査部
Kinki University Hospital Central Laboratory
〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東377-2
Ohno Higashi, Osaka-Sayama City, Osaka Prefecture
377-2
TEL : 072-366-0221
E-meil : yoshihiro-tsuda@med.kindai.ac.jp

採血, PT-INR, CRE, トロップTの測定を実施し, その場で報告を行っている。3次救急患者搬送時は, 日勤帯はPHSに連絡, 館内にオルゴールが流れるシステムになっており救急災害棟に居る全てのスタッフが知るようになっている, ERに搬送される一次救急患者の対応においては, ER担当看護師より連絡が入り, その都度の検査対応となる。

2) POCTの管理について考える事となった事件

3次救急で交通外傷症例の受け入れ要請され搬入となった。救急医より造影CTを直ぐに撮りたいので迅速CRE検査を優先して先に報告して欲しい事を, 患者搬送前のブリーフィングで伝えられた。患者が搬入されると同時に採血がされ, 担当技師は迅速CRE検査を実施した。

迅速CRE値は, 6.1mg/dLと高値であり, 救急医に直ちに報告を行ったところ。造影CT撮影を断念し, 通常CT撮影で対応する事となった。採血された検体を検査室内の生化学分析装置 (Roche社 cobas702) で測定すると, CRE値が0.61mg/dLと大きな解離を認め, 担当者は直ぐに検査値が異なることを報告した。CT撮影は, 造影CTに再度変更され撮影する運びとなった。

救急医より, 「検査値が逆の値だとアクシデントだよ」「検査技師が報告する値は正しいと思っている」と注意され, 我々が報告する検査値で処置, 治療が大きく左右される事を痛感した事件であった。

3) POCTに関する現状調査

初めに救急災害棟でPOCTを使って報告している担当者 (20名) にPOCTに対する考えのヒアリング調査を実施した。95%の担当者が検査値に不安

を感じている。5%は気にしていないとの回答を得た (Fig. 1)。不安を感じると回答した担当者に不安を感じる理由を調査したところ, 全ての担当者が「検査値の相関・解離の確認がされていないから」との回答を得た。さらに, 相関等の関係性について実施しなかった事について調査したところ, 「中央臨床検査部の管理機器ではない」「マンパワーの問題」との回答が得られた (Fig. 2)。

機器の管理者である, 医局, 看護部に「POCTについて検査室に求めること」についてヒアリングを実施した, 回答は, 「POCTの管理をしてほしい」「指導・教育をして欲しい」「検査技師さんが測定して欲しい」「データを管理して欲しい」との事であった (Fig. 3)。

4) 検査部がPOCTを管理する事のメリット

現在, 看護師・医師が正しく使用しない事から機器が多々修理点検に出ていて, 必要時に測定が出来ない事が多い。検査部が管理することで機器トラブルの未然防止, 安定使用が可能となり, 効率的な消耗品の管理・無駄を防止する事でコストを削減することが可能になると考える¹⁾。

また, 分散したPOC検査装置の集中管理, 精度管理データの一元管理・保存する事は精度の高い検査値の提供ができるものとする²⁾ (Fig. 4)。

5) 今後について

検査値が診療, 処置に大きく関わる救急災害棟に設置しているCRE,PT-INRのPOC機器の大型機器との相関, 同時再現性, 現出限界などについて検証を実施して確認を行い機器の精度を把握することに努める。近畿大学病院は2025年11月に病院移転に

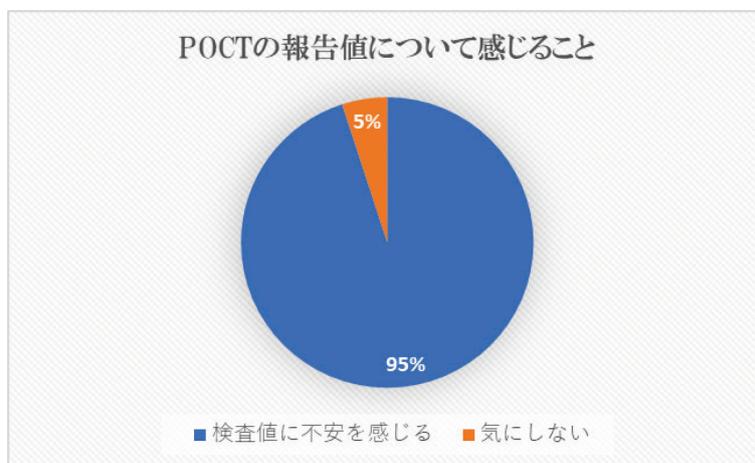


Fig. 1 POCTの報告値について感じる事

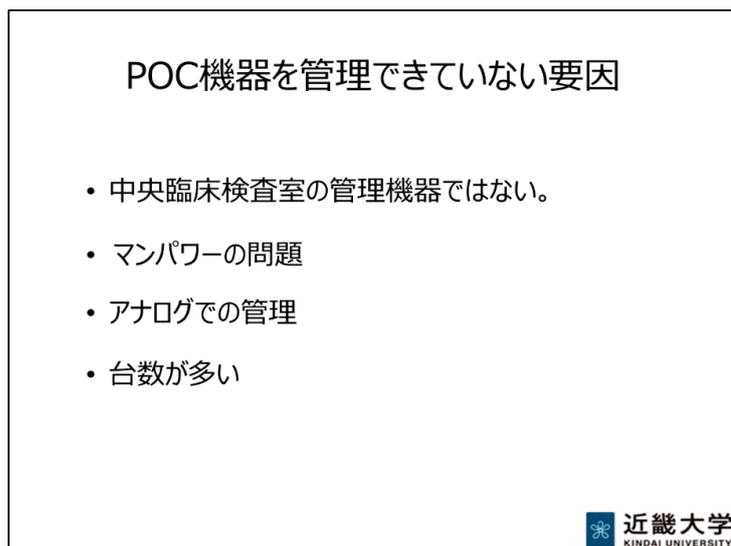


Fig. 2 POC機器を管理できない要因

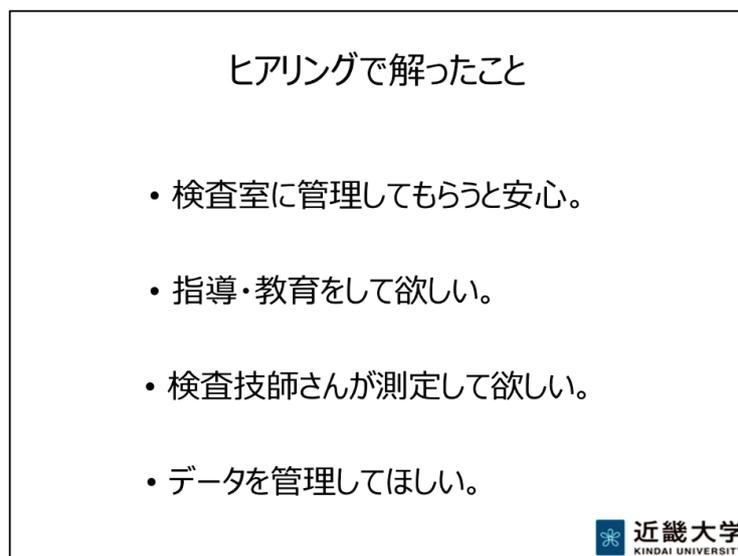


Fig. 3 医局・看護部のヒアリングから

伴い検査機器等の選定を実施している。ISOにPOCTの管理要綱が盛り込まれたことや臨床現場からの要望に応えるためにも、POC機器の一元管理をするうえで大きな問題がある³⁾。データの一元管理が可能となり、効率化を図るため各POC機器を接続できるミドルウェアが、現状1社しかない。製品の向上を含めて今後、各社にはPOC機器を管理するためのシステムが開発されることが望まれる。

3. 結語

今回、我々が報告する検査値が処置、診療に大きく左右する事が事例を通して考えさせられた。「管理機器でないから何もしなくていい」皆が、自分たちの優位の考えを持つのではなく患者を中心とした考えを持ち対応できるシステムの構築が必要である。

管理機器でもないPOC機器扱うのであれば不安を解消するためにも検証を実施すべきである、我々が、精度の高い検査値を報告する事は責務であ

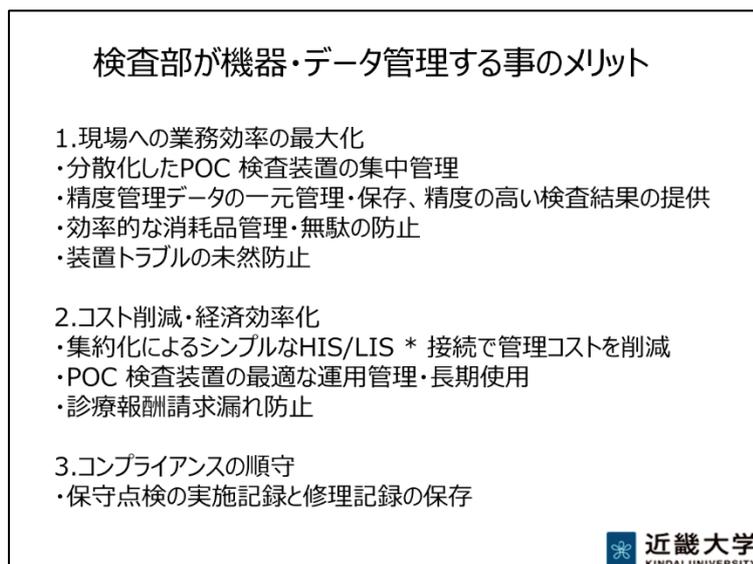


Fig. 4 検査部がPOC機器を管理する有用性

り患者、臨床に対しての信頼関係に応えるうえで重要なことである。今後ISOの認証を維持していく上で、精度管理、機器間差で人や時間をかなり割いている中でPOCTを管理していく事は負担が大きくなる、効率的に管理するためにも企業のみドルウェアの開発が早急に望まれる。

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。

文 献

- 1) 松尾収二 POCT (point of care-testing) の現状と将来 日本内科学会雑誌 2011;100(11):3175
- 2) 山下計太 POCTに対する検査室の責任：質保証 日本臨床検査医学会 2022;8:676-679
- 3) 久野勝男 ISO 15189 改定に伴う臨床検査室の対応とPOCTを含む検査室の責任 日本臨床検査医学会 2022;8:669-675

ISO取得施設のPOCT機器の機器管理・精度保証の実態

Equipment management and accuracy assurance of POCT equipment
in ISO certified facilities

後藤慎一

1. はじめに

2018年12月に施行された医療法等改正¹⁾により、検査室のみならず病院内で使用する検査機器の精度管理と保守点検を含めた総合的な管理が要求された。また国際的な認証機関であるJCIやISO15189（第4版）²⁾においてもPOCT管理体制の要求事項が入り、品質保証の重要性が増している。春日井市民病院は2022年12月にISO15189（第3版）を取得した。第3版では認定範囲にPOCTを含めていないが、第4版の移行へ向けて準備中である。

今回は、POC技術委員会が考えるPOCT機器の管理、春日井市民病院で実施してきたPOCT機器の管理を中心に述べ、ISO15189（第4版）へ移行する時のポイントについて報告する。

2. POCT対応機器・試薬の精度管理状況

日本臨床検査自動化学会POC推進委員会（現在の日本医療検査科学会POC技術委員会）では、2011年に山崎らがPOCセミナー参加者に対して「POCT対応機器・試薬の精度管理状況」をアンケート調査した³⁾Fig. 1。その結果は、検査室以外に設置したPOCT対応機器・試薬の精度管理実施の有無に対しては、53%が実施、32%が実施なし、15%が未回答であった。実施できない理由は、1) 実施する人がいない・理解や協力が得られない、2) 必要性を感じていない、3) 方法が良くわからない、4) 精度管理機能がない装置を使っているなどが挙げられた。このことから、検査室外に設置されたPOCT対応機器・試薬の測定に関わる運用構築

検査室以外に設置した、POC関連機器の精度管理を実施していますか？

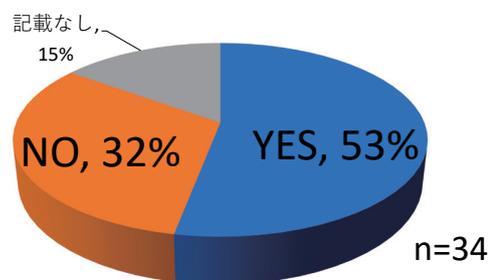


Fig. 1 山崎が行った精度管理状況アンケート結果

ができておらず、臨床医，看護師，検査部門などが協働して運用構築することが課題であると、報告されていた。

3. 当院でのPOCT対応機器・試薬の管理状況

当院では、外来と病棟で使用するPOCT対応血糖分析装置を2011年に、血液ガス分析装置を2012年に、免疫検査装置を2016年に検査システムを介して電子カルテへ接続し、検査実施から報告までの時間短縮と確実に結果（記録）を残す仕組みを手掛けた⁴⁾。現在、血糖装置は45台（病棟34台、外来6台、予備5台）、血液ガス分析装置は4台（救急外来とICUに各1台、検査室2台）、救急外来に設置した免疫装置1台接続している。この免疫装置は、医師や看護師が実施したトロポニンIと血中HCGの検査結果を迅速に電子カルテに記録し、結果参照することができる（Fig. 2）。血糖の接続方式は結果先行型、血液ガス分析装置と免疫装置は依頼先行型で接続している。結果先行型接続とは、測定した検査結果に患者番号を紐づけ、検査依頼を作成し、結果と伴に

Shinichi Goto

春日井市民病院臨床検査技術室/医療情報技術センター
日本医療検査科学会POC技術委員会

TEL: 0568-57-0073 FAX: 0568-81-212

E-mail: kshin@na.rim.or.jp>



Fig. 2 救急外来におけるPOCT対応装置接続事例

Table 1 血糖装置の変遷

	平成9年～ 1997年～	平成19年～ 2007年～	平成23年～ 2011年～	令和5年～ 2023年～
病棟・外来で 使用される 血糖装置	ANTSENSE II 5台 SMBG (グルコ カード) 60台	Caresist	Caresist II	メディセーフ フィットプロ II
装置管理	ともに メーカー営業担当 者	臨床検査技師	臨床検査技師	臨床検査技師
校正と コントロール 測定	アントセンスの 校正：看護師 アントセンスとグル コカードのコン トロール測定：と もに測定なし	看護師	看護師	看護師
精度管理		臨床検査技師が 巡視 (紙運用)	臨床検査技師が ネットワークを利用した 管理と巡視	臨床検査技師が ネットワークを利用した 管理と巡視

電子カルテへ送信する方式である。一方、依頼先行型は日常の検査依頼と同様に医師が依頼した検査依頼からバーコードを発行して検査を実施する方式である⁵⁾。当院の血糖装置の変遷を Table 1 に示す。POCT 対応機器・試薬を導入当時からシステム化したわけではなく、段階的にシステム構築した。1997年、糖尿病教育病棟と透析室の一部でPOCT 対応血糖装置を導入し、その装置の校正は看護師が実施していたが精度管理は実施されていなかった。その後

2007年に臨床検査技師がPOCT 対応血糖装置管理に参画し、全病棟・外来での装置管理と品質管理に関わった。看護師は毎日校正と精度管理を実施し、臨床検査技師は校正と精度管理結果、装置状況を確認の為に、月に1度巡視を行った⁶⁾ (写真1)。2011年には装置をネットワークを介して電子カルテと接続し、装置管理や精度管理を行う体制を構築した。2023年には血糖装置の老朽化に伴い装置の更新を行った。

ケアアシスト チェックシート

6月 病棟 (東・西 7) ケアシストNo. (14)

月	キャリブレーション・コントロール	担当	備考	月	キャリブレーション・コントロール	担当	備考
1	06/01 00:33 141 mg/dL	(赤)		16	06/16 00:54 145 mg/dL	(赤)	
2	06/02 00:34 141 mg/dL	(赤)	(赤)	17	06/17 00:11 148 mg/dL	(赤)	
3	06/03 00:29 144 mg/dL	(赤)		18	06/18 05:03 147 mg/dL	(赤)	
4	06/04 00:32 144 mg/dL	(赤)	(赤)	19	06/19 03:32 146 mg/dL	(赤)	
5	06/05 01:33 142 mg/dL	(赤)		20	06/20 00:00 150 mg/dL	(赤)	
6	06/06 01:33 145 mg/dL	(赤)		21	06/21 03:04 140 mg/dL	(赤)	
7	06/07 01:44 138 mg/dL	(赤)		22	06/22 00:53 146 mg/dL	(赤)	

写真1 オンライン前の精度管理巡視

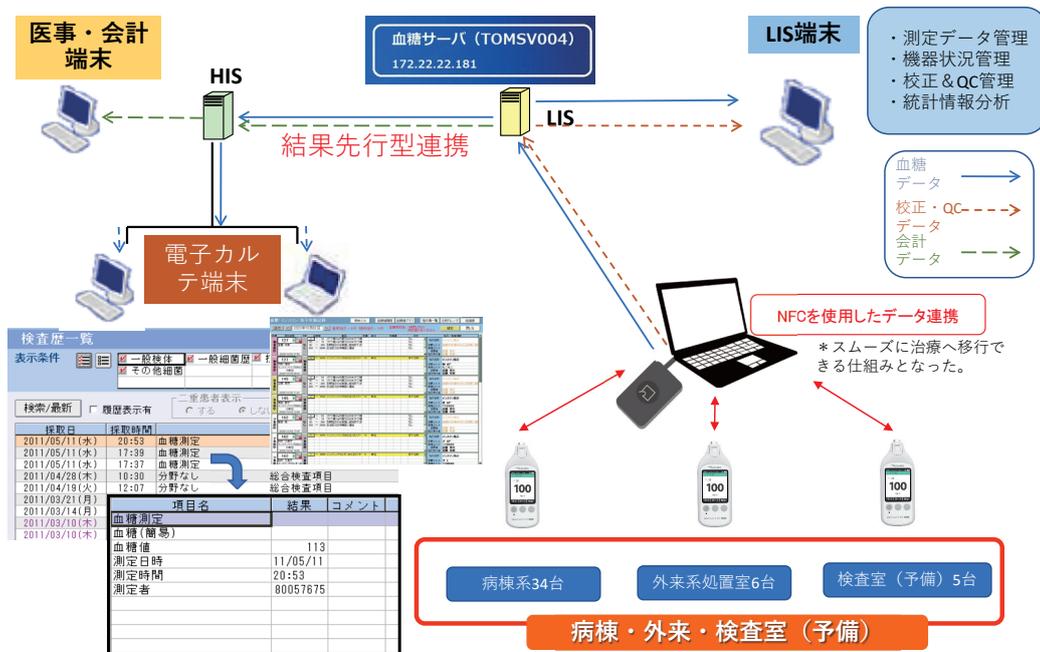
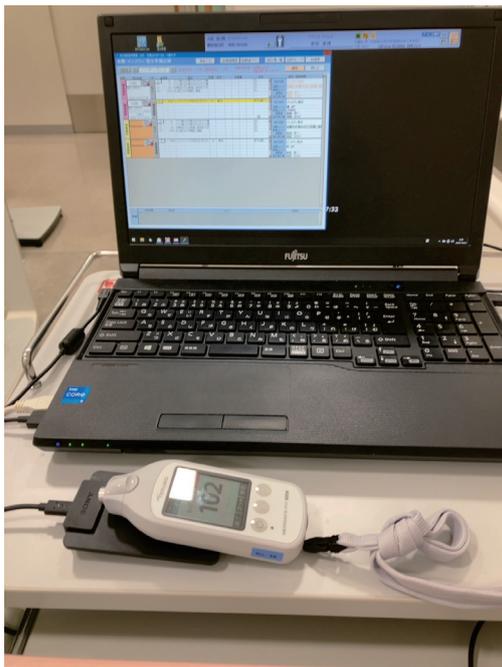


Fig. 3 POC対応血糖測定装置のシステム接続のイメージ

4. 血糖装置及び血液ガス分析装置のシステム接続について

Fig. 3に2023年3月から運用開始した血糖測定装置のシステム接続イメージを示した。現場で測定された血糖値はNFC (Near Field Communication : 近距離無線通信)にかざすことで臨床検査システムから電子カルテへ取り込み、外来で測定された結果は検歴、病棟で測定された結果は経過表と血糖・インスリンシステムで閲覧出来る仕組みとした。精度

管理測定結果も同様にNFC経由で収集され、臨床検査システムにて確認出来る仕組みである。Fig. 4は、測定した血糖値を電子カルテに付属するNFCへかざして血糖・インスリンシステムに取り込みインスリン投与量を決定する画面を示した。装置更新時に看護師からの要望にあった直ぐに血糖結果を取り込むことでインスリン投与がスムーズに実施できるようになった。Fig. 5に臨床検査システムにおける血糖装置管理画面を示した。Fig. 5-1は全測定装



日付	2023年10月02日	過量指示: 0件	随時指示: 0件	血糖測定値: 1時間以上の測定値がありません	確定	閉じる
検査項目	127	50 ~ 99	100 ~ 399	400 ~ 9999	指示名称	インスリン指示
検査結果	なし	なし	なし	なし	血糖値	血糖値
検査時刻	2023/10/02 07:55				医師	医師
検査項目	127	50 ~ 99	100 ~ 399	400 ~ 9999	指示名称	インスリン指示
検査結果	なし	なし	なし	なし	血糖値	血糖値
検査時刻	2023/10/02 08:02				医師	医師
検査項目	145	50 ~ 99	100 ~ 399	400 ~ 9999	指示名称	インスリン指示
検査結果	なし	なし	なし	なし	血糖値	血糖値
検査時刻	2023/10/02 11:41				医師	医師
検査項目	145	50 ~ 99	100 ~ 399	400 ~ 9999	指示名称	インスリン指示
検査結果	なし	なし	なし	なし	血糖値	血糖値
検査時刻	2023/10/02 12:53				医師	医師
検査項目	162	50 ~ 99	100 ~ 399	400 ~ 9999	指示名称	インスリン指示
検査結果	なし	なし	なし	なし	血糖値	血糖値
検査時刻	2023/10/02 17:47				医師	医師
検査項目	162	50 ~ 99	100 ~ 399	400 ~ 9999	指示名称	インスリン指示
検査結果	なし	なし	なし	なし	血糖値	血糖値
検査時刻	2023/10/02 18:30				医師	医師
検査項目	162	50 ~ 99	100 ~ 399	400 ~ 9999	指示名称	インスリン指示
検査結果	なし	なし	なし	なし	血糖値	血糖値
検査時刻	2023/10/02 18:30				医師	医師



Fig. 4 POC対応血糖測定システムの運用フロー

置を管理する画面で、管理幅から精度管理データが外れた時は赤で、患者番号不一致エラーでは青色表示させ、異常を知らせる仕様とした。Fig. 5-2は各装置の精度管理値の詳細や送信時間が表示される。臨床検査技師は日々これらの画面を自席にて遠隔監視し、有事の際は現場へ出向く体制を構築している。血液ガス分析装置も同様にシーメンス社のRapido comシステムを2012年から導入し、集中治療室と救急外来の装置管理と精度管理を遠隔で行っている。

5. ISO15189：2022がPOCTに求める要求事項とPOCコーディネーターについて

ISO18189：2022（第4版）では付属書A ポイント・オブ・ケア検査（POCT）に関する要求事項が規定されている。この要求事項は、検査室で実施される検査だけでなく、患者の傍らで実施されるPOCTにおいても一連のプロセスに対する機器の選定、要員の研修、品質保証及び、マネジメントレビューに関して、組織、部署及び要員に対する検査室の責任について規定されている。また、ガバナンスとしてPOCTを使用する全ての場所との間のサービスの合意事項は、それぞれの責務及び権限が規定されて、組織内に伝達されなければならないとしている。これは責任ある部署が手順書を作成して精度管理の方法や役割について臨床側との合意形成を得

ることである。検査室は、品質保証プログラムとしてPOCT品質に対する責任をもつ適切な研修及び経験を有する者を任命するとし、これを担うのが品質管理者の役割であると考えている。さらに研修プログラムとしてPOCTを遂行する要員の研修及び力量評価を管理するために、適切な研修及び経験を有する者が任命するとし、技術管理者がこの役割を担うと考えている。

写真2は2023年3月に当院POCT対応血糖装置の更新時に行われた教育トレーニングの様子を示した。実機と操作手順書（操作マニュアル）を準備し、臨床検査技師が説明を行った。POC術委員会では、POCTの運用構築と品質保証する仕組みの管理を品質管理者が担い、測定者の教育訓練と力量評価を技術管理者が担うことになるため、品質管理者や技術管理者にはPOCTの運用や管理に精通しているPOCコーディネーターの業務を理解し、運用に携っていただきたいと考える。

6. 要約

ISO認定取得施設でのPOCT対応装置の管理状況を解説した。2016年の医療法改正やISO15189：2022（第4版）発表以降、検査室外の検査管理に注目が集まっている。特にISO15189（第4版）では、POCTの運用から要員研修、品質保証まで細部に渡

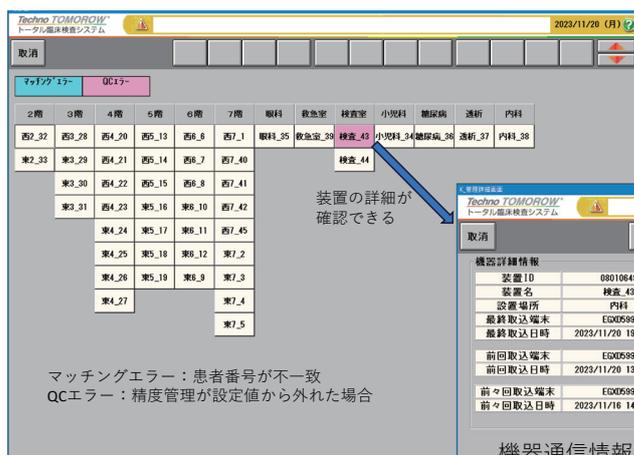


Fig. 5-1 全装置の管理画面



Fig. 5-2 各装置の精度管理詳細画面

Fig. 5 臨床検査システムにおける管理画面



写真2 装置更新時の看護師向け教育トレーニング

り要求されている。この要求を満たすためには日本医療検査学会が育成するPOCコーディネーターの活躍が期待されている。POCコーディネーターの役割については日本医療検査学会が発行しているPOCTガイドライン第5版⁷⁾や認定POCコーディネーターの基礎知識⁸⁾をご活用いただき、自院に合ったPOCTの運用構築にお役立ていただきたい。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) 医療法第15条の2. 平成29年法律第57号 平成29年6月14日公布 平成30年12月1日施行
- 2) ISO 15189: 2022. 臨床検査室-品質と能力に関する要求事項 Medical laboratories-Requirements for quality and competence.
- 3) 山崎家春. 特集特集(1)POCの精度管理を考える. 医療と検査機器・試薬 2011;34(5):601-606
- 4) 後藤慎一. 実践, POCコーディネーター!~血糖測定管理から始め, 遭遇した課題とその展開. 日本臨床検査自動化学会誌 2016;41(2):176-179.
- 5) 一般社団法人保険医療福祉情報システム工業会 医療システム部会検査システム委員会: JAHIS 臨床検査データ交換規約を用いたPOCT実装ガイドVER.1.0a. 2020
- 6) 後藤慎一, 西村祐賀子. POCの精度管理と装置管理-血糖装置管理の事例-. 医療と検査機器・試薬 2011;34(5):607-610
- 7) 日本医療検査学会. POCTガイドライン第5版. 医療検査と自動化. 2023;48 Suppl.2
- 8) 日本医療検査学会. 認定POCコーディネーターの基礎知識. 医療検査と自動化. 2021;46 Suppl.2

脳神経外科領域の髄液細胞検査における多項目自動血球分析装置XN-3000 BFモードの有用性について

Utility of the body cavity fluid mode of automated hematology analyzer XN-3000 in cerebrospinal fluid examination in neurosurgery

深谷 仁, 下仮屋雄二, 坂崎由佳, 森本 誠, 杉本和史, 田辺正樹

要旨 我々は脳神経外科より提出される髄液を対象に、多項目自動血球分析装置 XN-3000（以下、XN-3000）を用いた髄液細胞数算定・分類の有用性についてFuchs-Rosenthal計算盤を使用した目視法と比較検討を行なった。細胞数算定について目視法と比較しXN-3000の方が細胞を多くカウントする傾向を認めた。細胞分類については概ね良好な結果であったが、細胞数が少ない検体や細胞崩壊を認める検体で乖離が生じた。この事から、XN-3000を使用する際は、一部の検体でスキヤットグラムを観察し目視法を組み合わせるなどの対応が必要と考えられた。

Key words XN-3000, cerebrospinal fluid examination, neurosurgery

1. はじめに

髄液細胞検査は標準化が進められており、サムソン染色後の髄液をFuchs-Rosenthal計算盤を用いて顕微鏡で算定を行うことが標準法とされている（目視法）¹⁾。一方で、近年では自動血球分析装置に体液モードが搭載されるようになり髄液細胞検査の自動化も実現している。髄液細胞検査を目視法で行うことは、顕微鏡を操作する技術と細胞の形態的な判別能力が必要となるため、自動血球分析装置の体液モードによる測定を採用する施設が増えつつある。自動血球分析装置による測定は、細胞鑑別の技量に関係なく再現性の高い結果が得られ²⁾³⁾、感染に対するリスクも目視法に比べて低いなどの利点があるが、脳神経外科（脳外科）より提出される髄液では、脳室ドレナージからの採取や手術の影響から細胞変性を認める検体が多く自動血球分析装置による細胞算定・分類に向かない事が報告されている²⁾⁴⁾。そこで、脳外科より提出される髄液細胞検査結果を自

動血球分析装置によって報告する事を目的に今回我々は、当院脳外科より検査部に提出された髄液検体に対して、シスメックス社より販売されている多項目自動血球分析装置 XN-3000（XN-3000）の体液測定モードであるBFモードを使用した髄液細胞検査の有用性について検討したので報告する。

2. 対象および方法

1) 対象

当院脳外科より検査部に提出された腫瘍細胞を認めない髄液52検体を対象とした。

なお、本研究は三重大学医学部附属病院医学系研究倫理審査委員会の承認（No.H2020-176）を得て実施している。

2) 方法

(1) 使用機器および測定原理

XN-3000 BFモードでの測定（機械法）は、半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法を原理とし、細胞にレーザー光を照射して得られた前方

Received Apr. 7, 2023; Accepted Nov. 7, 2023
Hitoshi FUKAYA, Yuji SHIMOKARIYA, Yuka SAKAZAKI, Makoto MORIMOTO, Kazushi SUGIMOTO, Masaki TANABE
三重大学医学部附属病院 検査部
Department of Clinical Laboratory, Mie University Hospital

〒514-8507 三重県津市江戸橋2丁目174
2-174, Edobashi, Tsu-shi, Mie 514-8507, Japan
Corresponding author : Hitoshi FUKAYA
TEL : 059-232-1111 (内 5376)
E-mail : fukaya@clin.medic.mie-u.ac.jp

散乱光 (FSC), 側方散乱光 (SSC), 側方蛍光 (SFL) の信号を用いて, 白血球細胞を単核球 (MN), 多形核球 (PMN) にカウント・分類を行う。また, 白血球領域より蛍光強度の強いHF-BF領域は組織球, 中皮細胞, 腫瘍細胞などが検出される⁴⁾。

(2) 髄液細胞数の比較

機械法の白血球数 (WBC-BF) について, 目視法との相関性を検討した。また, 細胞分類において単球+組織球の割合が増加した検体を脳外科より提出される髄液に特徴的な検体として, 別途比較検討した。今回の検討では, 末梢血液中の白血球目視分類の共用基準範囲を基に, 単球+組織球の割合が10%を超える検体を単球+組織球の割合が増加した検体として定義した。

(3) 髄液細胞分類の比較

機械法のPMN, MNの分類結果を目視法と比較した。また, より詳細な解析を行うため, 提出された全ての髄液検体を対象に, サイトスピンを用いて作製したメイグリュワルド・ギムザ染色標本で分類した結果 (MG法) との相関性も比較した。なお, 穿刺液検体をMG標本上で細胞分類する場合は, 細

胞500カウントが推奨されており⁵⁾, 今回の髄液MG法においては, 細胞分類数が500カウント未満の検体について, 細胞分類の精度が担保できないため解析から除外し, 細胞分類数が500カウント以上であった33検体を本解析の対象とした。

(4) 乖離検体のスキヤッタグラムと細胞形態の比較

機械法の測定結果とMG法の結果に乖離が見られた3症例の原因を検討するため, XN-3000 WDFスキヤッタグラム (WDFスキヤッタ) と細胞形態を詳細に比較した。

3. 結果

1) 髄液細胞数

全検体を対象とした機械法と目視法の白血球数の相関性は $y=1.23x+12.03$ $r=0.999$, 単球+組織球の割合が多い髄液検体での相関性は $y=1.23x+5.50$ $r=0.999$ であった (Fig. 1)。白血球数が1000個/ μ L以下の検体における白血球数の相関は, $y=1.21x+7.12$ $r=0.989$, 単球+組織球の割合が多い髄液検体での相関性は $y=1.18x+8.87$ $r=0.993$ であった (Fig. 2)。

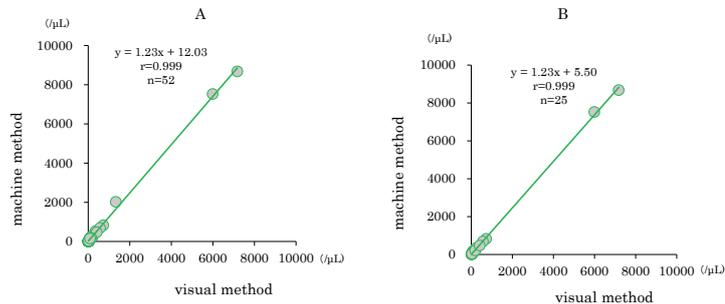


Fig. 1 Correlation of cell counts in cerebrospinal fluid

A : Correlation of cell counts in cerebrospinal fluid measured by machine method and visual method (All samples)

B : Correlation of cell counts in cerebrospinal fluid measured by machine method and visual method (monocyte and histiocyte>10 % samples)

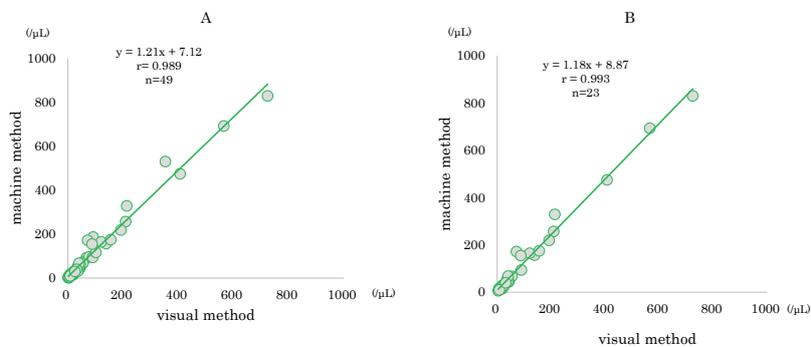


Fig. 2 Correlation of cell counts in cerebrospinal fluid (<1000/ μ L samples)

A : Correlation of cell counts in cerebrospinal fluid measured by machine method and visual method (All samples)

B : Correlation of cell counts in cerebrospinal fluid measured by machine method and visual method (monocyte and histiocyte>10 % samples)

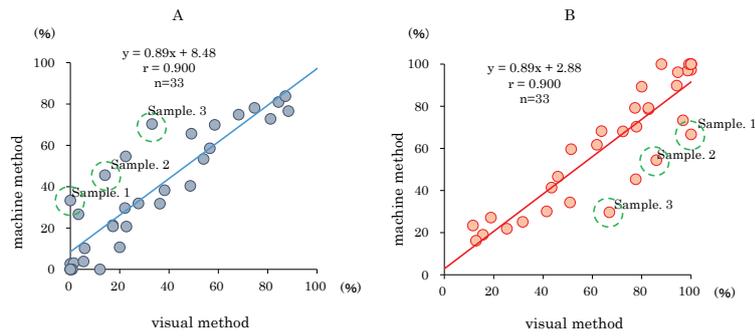


Fig. 3 Correlation of cell classification in cerebrospinal fluid (machine method and visual method)
 A : Correlation of cell classification by machine method and visual method (polymorphonuclear cells, PMN)
 B : Correlation of cell classification by machine method and visual method (mononuclear cells, MN)

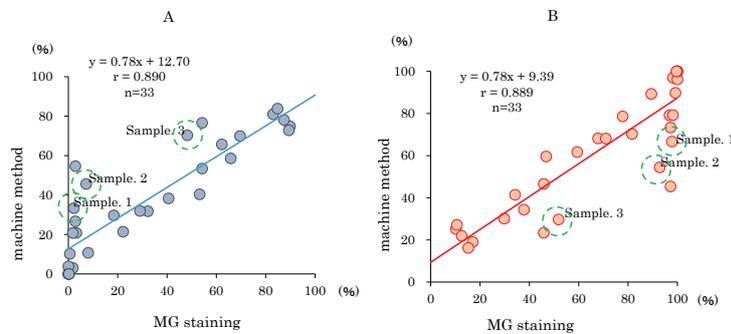


Fig. 4 Correlation of cell classification in cerebrospinal fluid (Correlation of between machine method and MG staining)
 A : Correlation of cell classification by machine method and MG staining (polymorphonuclear cells, PMN)
 B : Correlation of cell classification by machine method and MG staining (mononuclear cells, MN)

機械法と目視法の間には良好な相関が得られたが、機械法では目視法に比べて細胞を多くカウントする傾向が見られた。また、脳外科より提出される髄液に特徴的な単球と組織球の割合が増えた髄液においても良好な相関性を示したが、単球と組織球の割合に関係なく機械法で細胞を多くカウントする結果となった。

2) 髄液細胞分類

機械法と目視法の細胞分類での相関性は、多形核球で $y=0.89x+8.48$ $r=0.900$ 、単核球で $y=0.89x+2.88$ $r=0.900$ であった (Fig. 3)。機械法での細胞分類結果とMG法での細胞分類結果との相関性は多形核球で $y=0.78x+12.70$ $r=0.890$ 、単核球で $y=0.78x+9.39$ $r=0.889$ であった (Fig. 4)。機械法は、目視法およびMG法の両者と概ね良好な相関性を示したが、一部で大きな乖離を認めた。今回の検討では、機械法の結果が回帰式と±20%を超えて乖離した症例を乖離検体と定義した。

3) 乖離検体のスキヤットグラムと細胞形態

乖離を認めた症例のうち3例を選んで機械法のスキヤットグラムと目視法およびMG法の形態所見を比較した (Table 1)。

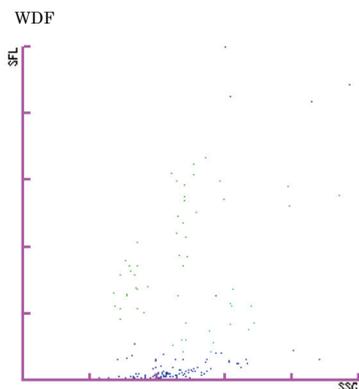
乖離検体1では、WDFスキヤットで殆ど細胞プロットを観察できなかった (Fig. 5A)。また、MG法ではリンパ球、単球、貪食像を伴う組織球が主体であり、赤血球が崩壊した断片が多く観察された (Fig. 5B)。

乖離検体2では、WDFスキヤットで各細胞領域のプロットを確認できたが、好中球プロットでSFLが低い点線で囲った位置のプロットが一部Debrisとなっていた (Fig. 6A)。MG法ではリンパ球や単球が主体でわずかに好酸球や好塩基球を認めた。また、血球とは異なる分類不能の大型の細胞集塊をわずかに認めた (Fig. 6B)。

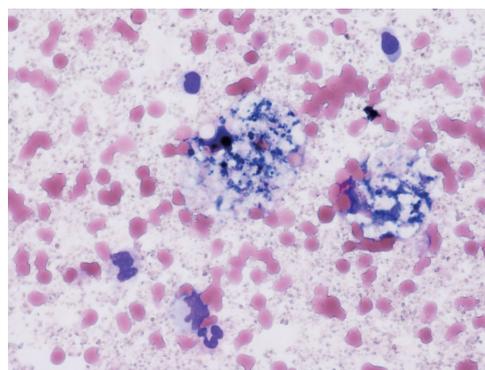
乖離検体3について、WDFスキヤットでは点線で囲った淡い青色でプロットされる好中球領域の下

Table 1 Results of 3 samples with diverged cell classification results

sample	test item	machine method	MG staining	visual method
1	TC-BF(μ L)	6	-	-
	WBC-BF(μ L)	6	-	4
	RBC-BF(μ L)	0.010	-	-
	polymorphonuclear cells (%)	33.4	2.2	0.0
	mononuclear cells (%)	66.6	97.8	100.0
2	TC-BF(μ L)	68	-	-
	WBC-BF(μ L)	68	-	40
	RBC-BF(μ L)	0.007	-	-
	polymorphonuclear cells (%)	45.6	7.2	14.0
	mononuclear cells (%)	54.4	92.8	86.0
3	TC-BF(μ L)	476	-	-
	WBC-BF(μ L)	475	-	407
	RBC-BF(μ L)	0.019	-	-
	polymorphonuclear cells (%)	70.3	48.2	33.1
	mononuclear cells (%)	29.7	51.8	66.9



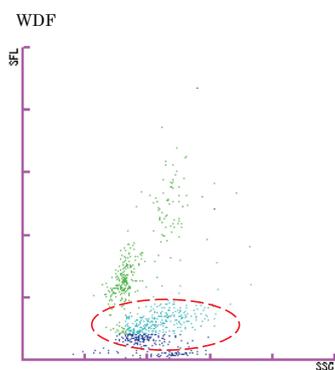
A: WDF scattergram result



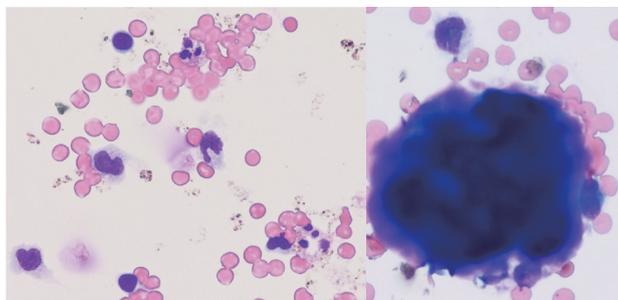
B: MG staining ($\times 400$)

Fig. 5 Divergence sample 1

Only few cell plots were observed in WDF scattergram, however, many collapsed red blood cells were observed in MG staining



A: WDF scattergram result



B: MG staining ($\times 400$)

Fig. 6 Divergence sample 2

A part of neutrophil plots was estimated to be debris in WDF scattergram, and large cell clumps which were not blood cells were observed in MG staining

側が青いDebrisに判別されていた (Fig. 7A)。MG法ではリンパ球、単球および組織球と好中球が同等に存在していたが、背景に細胞崩壊像を多数認めた (Fig. 7B)。

4. 考察

髄液細胞検査は、髄膜炎や脳炎などの診断に必要不可欠であり、迅速な結果が求められる検査である。また、検体の安定性も悪く髄液採取後に細胞が変性し結果に影響することも知られている¹⁾。その為、夜間、休日においても検査する必要があるが、ルーチン業務で髄液細胞検査を担当していない技師も時間外業務を勤務する場合には検査を担当することになる。顕微鏡を使って検査することに慣れていない技師にとっては目視法で髄液細胞検査を実施することは大きな負担となっており、検査室としても精度管理が大きな課題となる⁶⁾。近年では自動分析装置に髄液を測定できる機能が備わっており、内部精度管理用の管理試料も発売されている。このため、髄液細胞検査の技術的な技師間差や教育的負担が軽減され内部精度管理も容易に行うことが出来るようになった。しかし、自動分析装置での髄液細胞分類にはいくつかの課題も指摘されている。今回は、課題の1つである脳外科領域における髄液細胞検査について検討を行った。

脳外科領域は、通常の髄液細胞検査と異なり、細胞の崩壊像や組織球が多く認められる。機械法は検体の測定レンジなどは異なるが基本的な原理は末梢血と同じであり、通常の末梢血では出現しない細胞崩壊や組織球を鑑別して測定できるのが課題とし

て挙げられる。

細胞数算定について、機械法と目視法との間には良好な相関性が確認できたが、機械法では目視法と比べて細胞を多くカウントする傾向を認めた。機械法と目視法との相関性は久末ら²⁾の報告では $y=0.96x+1.51, r=0.997$ 、畑ら³⁾の報告では $y=0.86x+8.1, r=0.950$ であり、我々の結果のように細胞を多くカウントするといった傾向は認めていない。本研究は脳外科領域からの髄液を対象としていることから、対象の違いに何らかの要因があると考えられた。その要因の一つとして、機械法において、組織球がHF-BF領域にカウントされることを考えたが、機械法と目視法の相関性を単球と組織球の割合が増加した髄液のみで見た場合でも同様に機械法が多い傾向であった。従って、機械法において、組織球の多くはHF-BFではなくMNに分類されていることが推察され、細胞数算定結果にほとんど影響しないと考えられた。また、機械法の髄液細胞数算定については、WBC-BFの少ない検体において精度が落ちる事が報告されている⁴⁾。しかし、脳外科領域から提出される髄液のほとんどは細胞数が多く、久末ら²⁾や畑ら³⁾の報告と比較しても明らかである。その為、細胞数が少ないことが機械法で細胞を多くカウントする要因とは考えにくく、細胞分類と合わせてその原因を検討する必要がある。

細胞分類について、機械法と目視法およびMG法それぞれの相関について概ね良好な結果であったが、幾つかの髄液検体で大きな結果の乖離を認めた。結果の乖離を認めた髄液検体の中で、機械法と目視法およびMG法ともに大きな結果の乖離を認めた3例

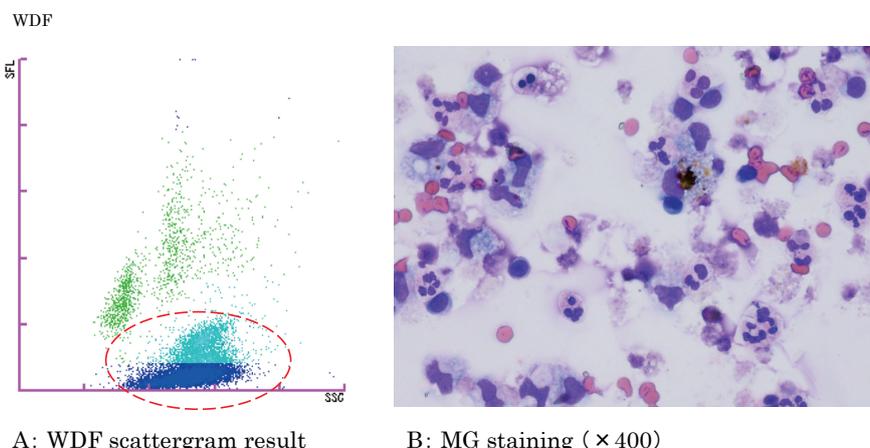


Fig. 7 Divergence sample 3
The bottom of neutrophil plots was estimated to be debris in WDF scattergram, and many collapsed cells were observed in MG staining

を、機械法のスキュッタグラム結果とMG法での細胞形態から原因の検討を行なった。

乖離検体1は、MG法では白血球は少なく赤血球が目立つ症例であった。機械法では赤血球を溶血させて測定を行うため、赤血球の崩壊はスキュッタグラムに影響せず、乖離の原因とは考えられないが、その他の細胞の崩壊もMG法で認めており、白血球が少ないため、わずかに崩壊した細胞でも多形核球領域にプロットされた事により、細胞比率として目視法およびMG法との乖離が大きくなったものと考えられた。

乖離検体2は、MG法でリンパ球、単球、組織球の単核球主体で稀に脳組織由来だと思われる大型の細胞集塊も認めた症例であったが、機械法では多形核球を目視法とMG法に比較して多くカウントしていた。脳組織由来と思われる細胞集塊に関しては蛍光強度の強いエリアであるHF-BF領域に分画されるため細胞分類には干渉しないと考えられた⁴⁾。多形核球を多くカウントした原因については、WDFスキュッタで好中球プロットのSFLの位置が低くプロットされており、プロットされている集団の一部はDebrisの領域にわたっていた。このことから、好中球が変性して一部は崩壊していることが考えられ、機械法では好中球としてカウントされている細胞がMG法や目視法ではカウント外になったことが乖離の原因と考えられた。

乖離検体3は、MG法で細胞崩壊が多数見られた。変性細胞を有する検体では変性細胞が機械法のスキュッタグラムでDebris領域、単核球領域、多形核球領域の境界領域にプロットされる事が知られている⁴⁾。乖離検体3においては、好中球プロットの下にプロット集団がみられ、Debris集団の一部が好中球としてカウントされており、機械法で多形核球が多くカウントされている原因と考えられた。

以上3つの乖離検体の結果から、細胞崩壊の進んだ検体では細胞分類結果に乖離が生じ、細胞数が少ないほど細胞比率に大きく影響することが示唆された。また、崩壊した細胞はDebrisとして細胞数から除外されているが一部はカウントされていることが考えられ、特に好中球で機械法の比率が多くなる原因と考えられた。これは白血球数が機械法で多くなる原因であることも示唆された。

アポトーシスにおける細胞の形態変化は広く知られており、核の濃縮、断片化が起こり、細胞自体の断片化も引き起こされる⁷⁾。機械法では、細胞の内部構造の複雑さを反映するSSCと、核酸や細胞小器官の種類と多さを反映するSFLを用いて細胞分

類を行なっている。細胞崩壊が起こると、細胞質内の内部構造が変化してその細胞本来のSSC位置がずれることになり、更に細胞の断片化により細胞質内の細胞小器官の絶対数が減少することからSFLは低くなることが考えられる。これにより、本来の細胞領域と異なる位置にプロットされた細胞崩壊群の一部が多形核球領域に分布することによってカウントされたことが示唆された。

脳外科から提出される髄液検体は脳腫瘍をはじめ脳血管障害や水頭症の手術後のものが多く、その治療として適応される脳室ドレナージから排液された髄液が提出される事もある。その為、髄液一般検査においては腫瘍細胞の出現や手術後の感染症所見がないか注意が必要となる。今回の研究に使用した髄液52検体中に腫瘍細胞を認めるものは存在しなかったため、髄液中に腫瘍細胞が出現した際にXN-3000 BFモードで腫瘍細胞が検出できるかは不明であった。一方で、細胞崩壊の進んだ検体以外は機械法で良好な細胞分類結果を得られる事が今回の研究で示唆された。細胞崩壊を疑う場合においては、今後症例数を増やしスキュッタグラムパターンをさらに理解することで、目視法で再検査するなどの検査フローの確立が進み、脳外科から提出される髄液においても機械法で検査することは可能であると考えられた。

5. 結論

脳外科から提出された髄液検体において、XN-3000 BFモードを使用した髄液細胞検査は概ね良好な結果であり、手術後の感染症所見の判別に有用であると考えられた。しかし、髄液細胞数が少ない検体や細胞崩壊が起こっている検体では細胞数や細胞分類結果に目視法と差が生じるため、使用する際にはスキュッタグラムを観察し必要に応じて目視法で検査する必要がある。

なお、本論文の要旨は日本医療検査科学会 第54回大会にて報告した。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) 保科ひづる, 3.2 髄液細胞の観察, 一般社団法人日本臨床衛生検査技師会, JAMT 教本シリーズ 髄液検査技術標本, 第1版, 丸善出版株式会社: 東京都, 2015:31-44

- 2) 久末崇司, 田中雅美, 宿谷賢一 他, 当院の夜間・休日における自動血球分析装置による髄液細胞算定の運用法, *Sysmex Journal* 2014:15:1-8
- 3) 畑 諒祐, 竹田英世, 松田尚子 他, 多項目自動血球分析装置 XN-3000 を用いた脳脊髄液細胞数算定の検討 *医学検査* 2017:66:524-529
- 4) 田中 雅美, 宿谷 賢一, 3. 各検査領域におけるフローサイトメトリーの活用 3)一般検査 (2) 体腔液検査, *Medical Technology* 2016:44:745-749.
- 5) 保科ひづる, 羽原利幸, 小関紀之 他, 穿刺液検体の検査法－細胞数と細胞分類を中心に－～胸水, 腹水, 心嚢水, 関節液, CAPD 廃液～, *医学検査* 2020:69:701-710
- 6) 深谷 仁, 下仮屋雄二, 打田瑞紀 他, 当院における髄液内部精度管理方法と評価について, *医学検査* 2022:71:138-142
- 7) Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis 他, 18 細胞死, 中村桂子, 松原謙一, 細胞の分子生物学, 第6版, 株式会社ニュートンプレス: 東京都, 2017:1021-1034

Rivaroxaban は凝固因子インヒビター模擬検体およびサーベイ検体として有用である

Rivaroxaban is useful as the simulated specimen of inhibitor to coagulation factor and the survey specimen.

荒尾ほほみ¹⁾, 上妻行則^{1),2)}

要旨 交差混合試験 (CMT) は、凝固時間延長の原因を鑑別するスクリーニング法である。これまで我々は、rivaroxabanが活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)-CMTの模擬検体として有用であることを報告してきた。一方、プロトロンビン時間 (PT) 延長でもCMTが実施されるため、本研究では、rivaroxabanがPT-CMTで使用可能か検証し、rivaroxabanはPT-CMTのインヒビター模擬検体として、-80℃保存で安定した結果を示すためサーベイ検体として使用できる可能性が示された。

Key words cross mixing test, direct oral anticoagulants (DOAC), rivaroxaban, prothrombin time (PT)

1. はじめに

凝固検査の一つである交差混合試験 (cross mixing test : CMT) は、プロトロンビン時間 (prothrombin time : PT) や活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time : APTT) など、凝固時間が延長した際に原因を鑑別するスクリーニング法として有用な検査であり、2008年には保険収載された¹⁾。CMTは、正常血漿および患者血漿を一定の比率で混合後、混合比を横軸に、凝固時間を縦軸にプロット後グラフ化し、視覚的に上に凸のパターンを呈した場合にはインヒビターの存在を、下に凸のパターンを呈した場合には凝固因子の欠損を疑う。しかし、①CMTにおける検査法、試薬の選択、判定方法などが標準化されていないこと、②血液を専門とする医師や経験豊富な医師以外にCMTの意義が十分に認知されていないことなどから、臨床現場ではCMTが十分に活用

されていない現状がある。

一方、現在臨床検査技師教育機関の学内実習においてはAPTT-CMTが実施されることが多いが、凝固時間の延長の原因として、第VIII因子インヒビターなどの内因系の異常、第VII因子インヒビターなど外因系の異常、低プロトロンビン血症など共通系の異常があるため^{2,3)}、学内実習ではAPTT-CMTのみならず、PT-CMTも実施し、その意義を理解することは臨床現場でCMTを活用する上で極めて重要であると考えられる。しかし、現在の学内実習においては患者検体の入手が困難であることから、CMT実習で使用可能なインヒビター検体はなく、学生のCMTに対する理解が深まらない要因と考える。

ビタミンK非依存性の直接経口抗凝固薬 (direct oral anticoagulants : DOAC) は、ワルファリンとは異なり、①半減期が短いこと、②ビタミンKの代謝に関与しないことによる食物や他薬剤の影響が少な

Received Jun. 9, 2023; Accepted Nov. 8, 2023

Hohomi ARAO¹⁾, Yukinori KOZUMA^{1),2)}

¹⁾熊本保健科学大学大学院 保健科学研究科 保健科学専攻

Division of Health Sciences, Graduate School of Health Sciences, Kumamoto Health Science University

²⁾熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科

Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kumamoto Health Science University
〒861-5598 熊本県熊本市北区和泉町325

325 Izumi-machi, Kita-ku, Kumamoto, 861-5598

Corresponding author : 上妻行則

TEL : 096-275-2111 FAX : 096-245-3172

E-mail : kozuma18@kumamoto-hsu.ac.jp

いこと、③用量調整が容易であること、④出血リスクが少ないことなどから、近年注目を集めている^{4,5)}。DOACには、トロンビン阻害剤であるdabigatran、第Xa因子阻害剤であるrivaroxaban, apixaban, edoxabanなどがある。これまで我々は、CMT実習で使用可能なインヒビター模擬検体としてDOACに着目し検証した結果、学内実習におけるAPTT-CMTの模擬検体としてrivaroxabanを用いたところ、APTT延長が顕著に認められ、かつ上に凸のインヒビターパターンを呈すること、バリウム吸着血漿検体の場合に比べ、rivaroxaban模擬検体を併用した方が学生のCMTに対する理解度が向上することを報告してきた^{6,7)}。

そこで今回、APTT-CMTで有用であったrivaroxaban添加検体が、PT-CMT実施時においても模擬検体として有用であるか否か、さらには将来サーベイ検体としての応用の可能性を探るために保存条件の検証を行った。

2. 材料および方法

1) 検体

研究に同意を得ることのできた健常人ボランティアより採血(3.2%クエン酸Na:血液=1:9)し、3,400rpm, 10分間遠心分離し、乏血小板血漿(platelet poor plasma: PPP)を分離した。本研究は、熊本保健科学大学人を対象とする医学系研究に関する倫理審査において承認済みである(承認番号: 18055)。

2) 機器および試薬

測定機器は、コアプレスタ[®]2000(積水メディカル株式会社, 東京), PT試薬として、コアグピア[®]PT-N(コアグピア, 積水メディカル株式会社), ヒーモスアイエル リコンビプラスチン(ヒーモス, Instrumentation Laboratory), トロンボチェックPT(トロンボチェック, シスメックス株式会社), レボヘムTMPT(レボヘム, シスメックス株式会社)を使用した。

3) 第Xa因子阻害剤; rivaroxabanを用いたインヒビター模擬検体の作製

Rivaroxaban(Chemscene社, Monmouth Junction, NJ, USA)にdimethyl sulfoxide(DMSO)を添加し、50mg/mLのrivaroxaban溶液を準備した後、rivaroxaban濃度を3.2mg/mLに調整した。次に、rivaroxaban溶液を正常血漿で希釈し、最終濃度が1.6 μ g/mLおよび3.2 μ g/mLとなるインヒビター模擬検体を作製した。

4) 交差混合試験(cross mixing test: CMT)

3)で作製した模擬検体(rivaroxaban添加正常血漿, 3.2 μ g/mL)と正常血漿を任意の比率(100, 80, 50, 20, 0%)で混合し、混合直後(即時反応)および37 $^{\circ}$ C, 2時間インキュベーション後のPT-CMTを測定し(遅延反応)、波形パターン法で解析した。

5) 波形パターン法

正常血漿(模擬検体比率0%), とインヒビター模擬検体(模擬検体比率100%)との凝固時間を結ぶ直線を基準に、反応曲線が上に凸か、下に凸であるかを視覚的に判断した。

6) Rivaroxaban添加模擬検体の保存条件の検証

Rivaroxaban 3.2 μ g/mLを添加した模擬検体を-20 $^{\circ}$ Cおよび-80 $^{\circ}$ Cで保存し、模擬検体作製当日、翌日、1週間後、1ヶ月後のPTおよびPT-CMTを測定した。

7) 統計処理

今回の検証で行ったコアプレスタ[®]2000によるPT-CMT測定は、同時再現性を考慮し、全て3重測定した。学内実習においては、各検体2重測定した。2群間の平均値の比較には、Microsoft Excel(Microsoft社, Seattle, WA, USA)を用いて、Student *t* 検定を行った。また、 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

3. 成績

1) Rivaroxaban至適濃度の検討

これまで我々は、rivaroxaban 1.6 μ g/mL添加検体が、APTT-CMTにおけるインヒビター模擬検体として有用であることを報告してきた⁶⁾。そこで、PT-CMTにおいても同様の濃度(rivaroxaban 1.6 μ g/mL)で検討を行ったところ、コアグピア(模擬検体100% vs. 0% = 45 \pm 0.5秒 vs. 9.9 \pm 0.1秒)

(Fig. 1-A実線), ヒーモス(模擬検体100% vs. 0% = 36.8 \pm 0.5秒 vs. 9.9 \pm 0.2秒)(Fig. 1-B実線), トロンボチェック(模擬検体100% vs. 0% = 34.2 \pm 0.2秒 vs. 10.8 \pm 0.1秒)(Fig. 1-C実線), レボヘム(模擬検体100% vs. 0% = 27.6 \pm 0.4秒 vs. 9.7 \pm 0.0秒)

(Fig. 1-D実線)となり、いずれの試薬においてもPTは延長するものの、グラフは直線的で、視覚的に上に凸のインヒビターパターンを呈しなかった(Fig. 1-A-D実線)。

そこでrivaroxaban 3.2 μ g/mLで再度PT-CMTを行ったところ、コアグピア(模擬検体100% vs. 0% = 103 \pm 0.6秒 vs. 12.1 \pm 0.0秒)

(Fig. 1-A破線), ヒーモス(模擬検体100% vs. 0% = 78.0 \pm 0.2秒 vs. 10.9 \pm 0.1秒)(Fig. 1-B破線), トロンボチェック(模擬検体100% vs. 0% = 57.3 \pm 0.0

秒 vs. 11.5 ± 0.0 秒) (Fig. 1-C 破線), レボヘム (模擬検体 100% vs. 0% = 71.4 ± 1.0 秒 vs. 10.2 ± 0.0 秒) となり (Fig. 1-D 破線), レボヘム以外の3試薬において上に凸のインヒビターパターンを呈した (Fig. 1-A-C 破線)。

一方, rivaroxaban 添加検体を臨床検体に近づけるために, より低濃度の条件 (rivaroxaban 0.2, 0.4, 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) も検証したが, いずれの検体においても直線的なグラフを示した (data not shown)。

2) 即時反応・遅延反応

1) の結果をもとにして rivaroxaban 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加検体において, 上に凸のインヒビターパターンを呈した3試薬で遅延反応を実施したところ, コア

グピアとヒーモスにおいては上に凸のグラフパターンがより顕著となったが (Fig. 2-A,B), トロンボチェックにおいては即時・遅延の間で差は認められなかった (Fig. 2-C)。以上の結果から, 学内実習ではコアグピアとヒーモスのうち安価なコアグピアを PT 試薬として用いることとした。

3) 学内実習における CMT

学内実習では, rivaroxaban 添加模擬検体を配布し, 用手法で PT-CMT を行った。即時反応では, 模擬検体 100% で 117.6 ± 11.1 秒, 80% で 98.6 ± 10.9 秒, 50% で 69.7 ± 7.0 秒, 20% で 40.3 ± 4.8 秒, 0% で 13.2 ± 2.1 秒 (Fig. 3-A 実線), 遅延反応においては, 模擬検体 100% で 209.1 ± 31.5 秒, 80% で 183.2 ± 34.6 秒,

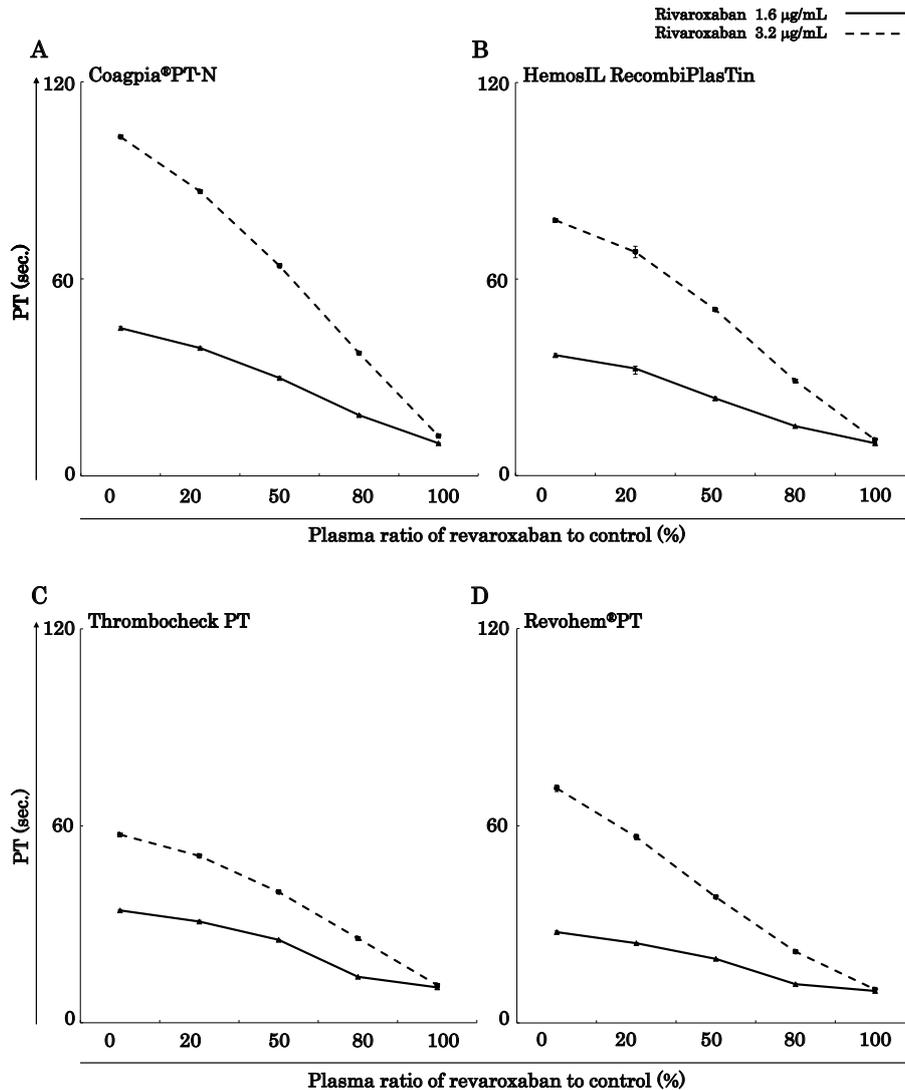


Fig. 1 Examination of optimal concentrations of rivaroxaban for cross mixing test

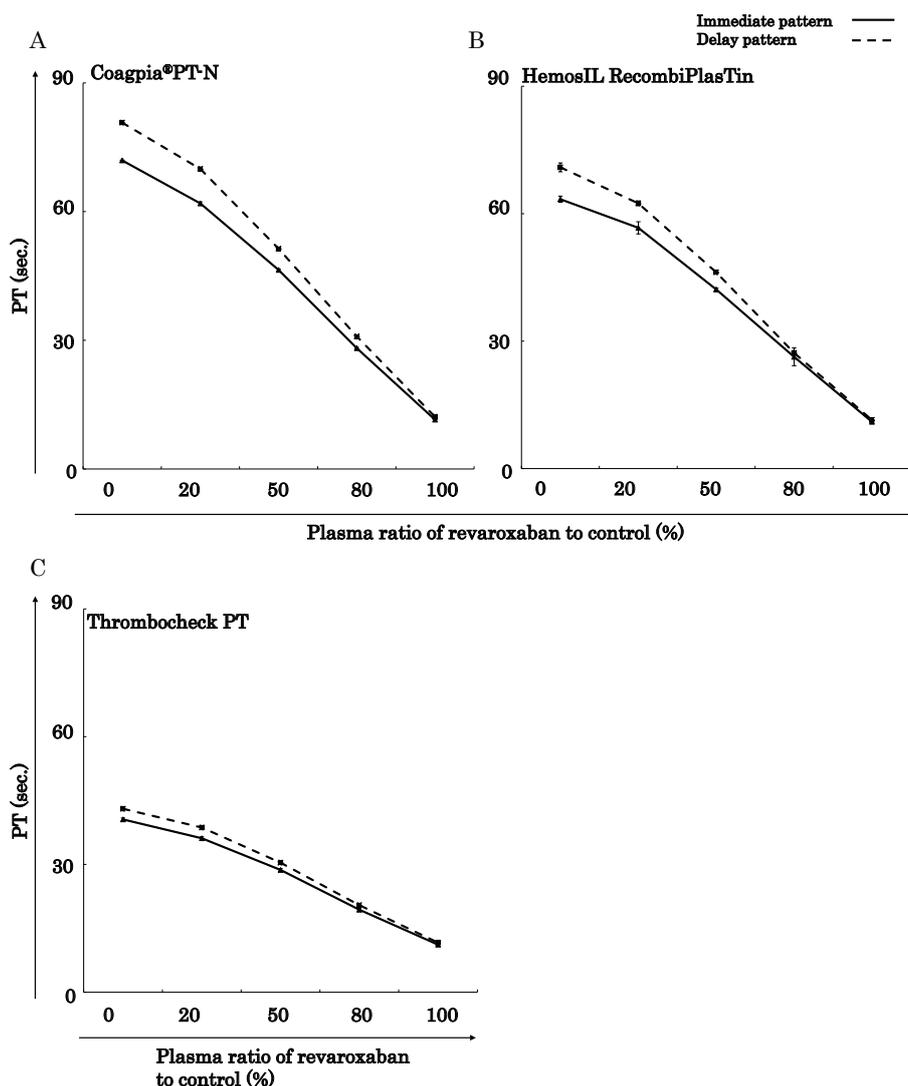


Fig. 2 Difference in the immediate pattern and delay pattern in various PT reagents

50%で 118.6 ± 23.4 秒, 20%で 63.8 ± 20.2 秒, 0%で 15.8 ± 3.4 秒となり (Fig. 3-A破線), APTT-CMTの即時反応・遅延反応いずれにおいても, 上に凸のインヒビターパターンを示した (Fig. 3-B)。

4) Rivaroxaban 添加模擬検体の保存条件の検証

rivaroxabanの将来サーベイ検体としての応用の可能性を探るために rivaroxaban $3.2 \mu\text{g/mL}$ を添加した模擬検体を -20°C および -80°C で保存し, 模擬検体作製当日, 翌日, 1週間後, 1ヶ月後のPTおよびPT-CMTを測定し, 保存条件の検証を行った。その結果, PT試薬としてコアグピアを用いて測定した場合, -20°C 保存条件下のPTは, 検体作製当日で

103.8 ± 1.3 秒, 翌日で 117.8 ± 0.9 秒, 1週間後で 125 ± 0.5 秒, 1ヶ月後で 133.4 ± 1.2 秒であり (Fig. 4-A-i), 検体作製当日と比較して, 翌日, 1週間後, 1ヶ月後のPTは有意に延長していた (Fig. 4-A-i,ii)。ヒモスでは, 検体作製当日で 82.6 ± 0.8 秒, 翌日で 103.0 ± 2.4 秒, 1週間後で 108.2 ± 1.5 秒, 1ヶ月後で 116.5 ± 0.3 秒であった (Fig. 5-A-i,ii)。一方, -80°C 保存条件下において, コアグピアを用いて測定した場合のPTは, 検体作製当日で 62.3 ± 0.1 秒, 翌日で 71.1 ± 0.8 秒, 1週間後で 73.1 ± 0.3 秒, 1ヶ月後で 77.5 ± 0.8 秒であった (Fig. 4-B-i)。また, ヒモスでは検体作製当日で 53.2 ± 0.6 秒, 翌日で 59.4 ± 0.9

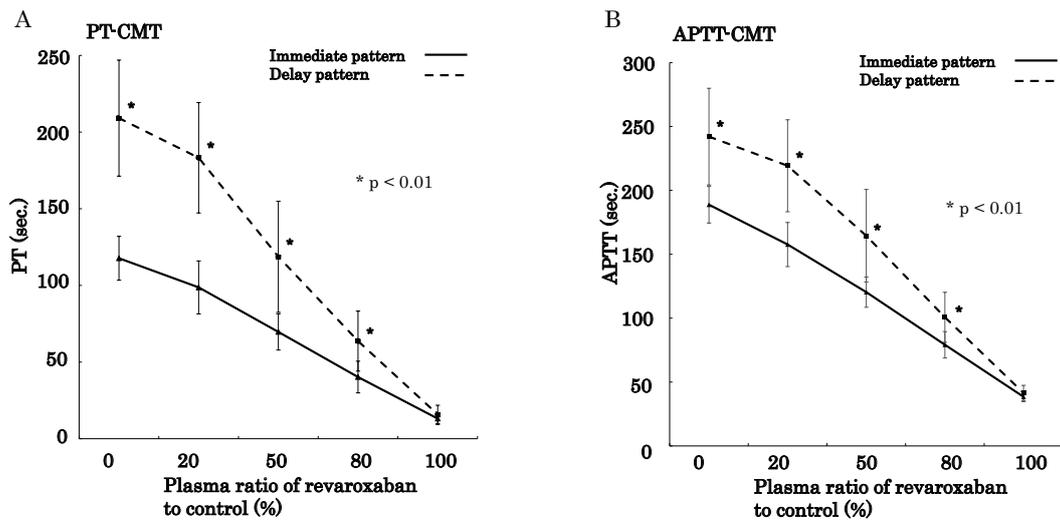


Fig. 3 Cross mixing test in practicum

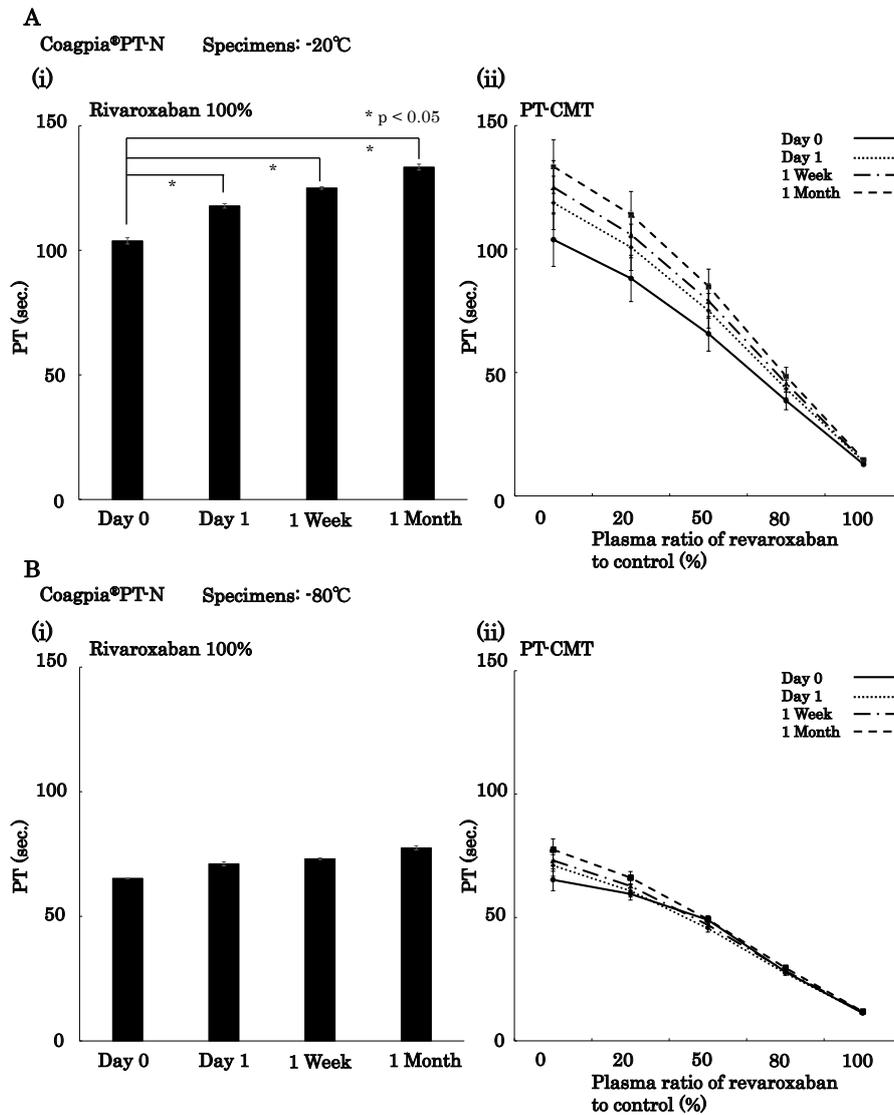


Fig. 4 Examination of the preservation condition for rivaroxaban-added specimens by using Coagpia®PT-N

秒, 1週間後で 58.0 ± 0.2 秒, 1ヶ月後で 59.0 ± 1.3 秒であり (Fig. 5-B-i), 1ヶ月後においても, -20°C 保存のような有意なPTの延長は認められず, CMTも -20°C 保存と比較して安定した結果を示した (Fig. 5-B-i,ii)。

4. 考察

本研究では, これまでの我々の検討から APTT-CMTの模擬検体として有用であった rivaroxaban 添加検体が, PT-CMT実施時においても有用であるか波形パターン法にて検証を行った。一般的に CMTは, APTTが延長した場合にその原因を精査

するために実施されることが多いため⁴⁾, 臨床検査技師教育機関においては選択的抗トロンビン剤アルガトロバン水和物注射液 (ノバスタンHI) やナファモスタットメシル酸塩注射用 (フソー), パルナパリンナトリウム注射液 (ミニヘパ), rivaroxaban などの疑似検体を用いて APTT-CMTのみ学内実習で行われている⁶⁻⁸⁾。一方, 200万人に1人と極めて稀な先天性プロトロンビン低下/異常症ホモ接合体あるいはヘテロ接合体例や vitamin K 欠乏症, 稀な後天性プロトロンビン低下症であるループスアンチコアグラント低プロトロンビン血症症候群 (LAHPS), さらに産褥や悪性新生物に加え, 基

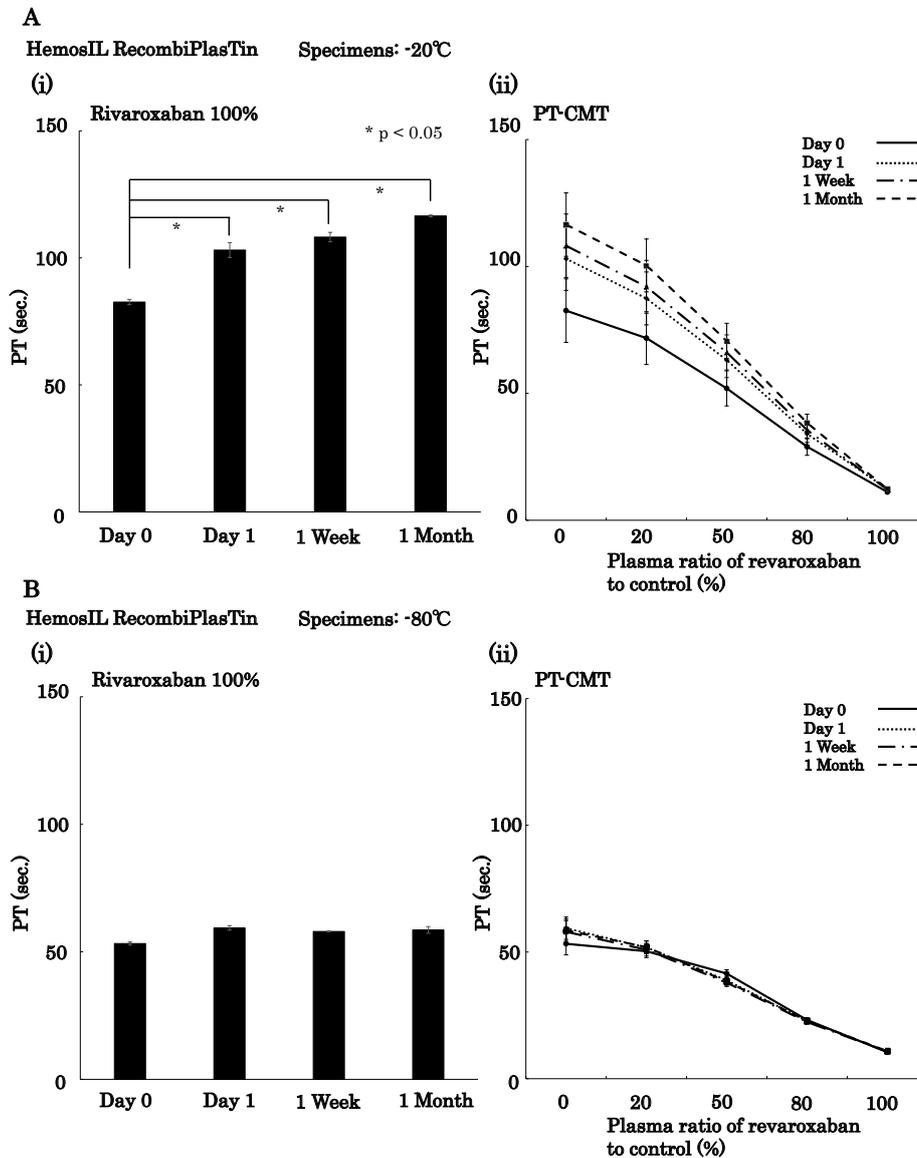


Fig. 5 Examination of the preservation condition for rivaroxaban-added specimens by using HemosIL RecombiPlasTin

礎疾患を持たない高齢者の手術時に用いられるフィブリン糊に混入する第V因子がヒト第V因子との共通抗原に対して抗体産生を促すことにより術後に多く認められる後天性第V因子インヒビター症例など先天性および後天性にかかわらず凝固時間が延長する際にはAPTT-CMTのみならずPT-CMTが実施される⁹⁻¹⁴⁾。従って、臨床に出る前にAPTT-CMTおよびPT-CMTを理解し、実践できることは重要と考えるが、PT-CMTを学内実習で行っている教育機関は我々が調べた限りない。

臨床現場ではCMTのグラフパターンが典型的な症例ばかりではなく、むしろ判定困難な症例における結果の解釈方法や測定結果が検査実施者の経験に依存することによるグラフパターン解釈における個人差などが目視的判定法の課題となっている。そこで、APTT-CMTの判定法としてRosner index (index of circulation anticoagulant; ICA) やWaS-ALD50法などの定量化指標が報告されているが^{15, 16)}、本邦においては波形パターン法による鑑別を行うことが多い。従って、臨床現場でCMTを活用できる臨床検査技師を養成するためには学内実習において波形パターン法にて判別できるインヒビター模擬検体の用意が必須である。今回我々が作製したrivaroxaban添加検体のPTは、いずれのPT試薬でも臨床で経験される測定結果とかけ離れた値を示したものの、コアプレスタ[®]2000を用いてrivaroxaban 3.2 µg/mL濃度でPT-CMTを実施した結果、コアグピア、ヒーモス、トロンボチェックで上に凸のインヒビターパターンを呈したことから、臨床検査技師教育機関におけるPT-CMTの模擬検体として広く利用できると考えた。また、実習対象学年が100名を超える本学では、手法によるAPTT-CMTおよびPT-CMTいずれにおいても測定結果にばらつきが大きく、かつ客観性は乏しかったものの比較的容易にCMTが実施できたこと、そしてrivaroxaban添加検体でインヒビターパターンを呈したことから、rivaroxabanは学内実習の模擬検体として活用できる可能性が示唆された (Fig. 3)。

以前我々は、rivaroxabanの凍結・融解を繰り返し、安定性をAPTTで評価したところ、20回の凍結・融解を繰り返しても凝固時間は安定かつ維持されることを報告した⁶⁾。そこで、凍結・融解に伴う安定性をPTで評価したところ、rivaroxaban添加模擬検体を-20℃で保存した場合、保存期間に伴いPTが有意に延長するのに対し、-80℃では有意なPTの延長は確認できなかった。従って、作製した模擬検体は-80℃条件下であれば少なくとも1ヶ月は保存可

能であると考えた。

以上から、rivaroxaban模擬検体はCMT教育はもちろん、サーベイ検体として使用可能である可能性が示唆されたが、今後サーベイ検体としてrivaroxaban模擬検体を使用することを考えると、コアプレスタ[®]2000以外の測定機器を用いてPT-CMTおよびAPTT-CMTを実施することは不可欠であり、今後さらなる検証が必要と考える。

5. 結論

直接経口抗凝固薬 rivaroxaban 添加模擬検体は、APTT-CMT, PT-CMTにおいて上に凸のインヒビターパターンを呈し、-80℃条件下であれば少なくとも1ヶ月間は保存可能であることから、臨床検査技師教育機関の学内実習におけるCMT教育や各施設におけるサーベイ検体として使用可能であると考えられる。

本論文の発表に関して開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- 1) 厚生労働省 HP : <https://www.mhlw.go.jp/bunya/iryouhoken/iryouhoken15/dl/2-7.pdf> [2023.6.2 アクセス]
- 2) Okajima K, Ishii M. Life-threatening bleeding in a case of autoantibody-induced factor VII deficiency. *Int J Hematol* 1999;69:129-32.
- 3) Naismith K, Allevato pa, Hamm C. A Rare Case of Factor VII Inhibitor in a Patient Presenting with Primary Splenic Marginal Zone Lymphoma. *Am J Case Rep* 2021;22:e932704.
- 4) 山崎哲, 鈴木典子, 後藤宏実ほか. APTTの現状と標準化に向けた課題. *生物試料分析* 2009;32:365-370.
- 5) 小嶋哲人, 抗凝固薬の歴史とXa阻害薬の開発の目的を探る, 池田康夫ほか編, Xa阻害薬のすべて, 第1版, 先端医学社;東京, 2007;68-75.
- 6) 登尾一平, 山本隆敏, 上妻行則. Rivaroxabanは学内実習における交差混合試験の凝固因子インヒビターとして有用である. *熊本保健科学大学研究誌* 2019;16:131-140.
- 7) 登尾一平, 山本隆敏, 坂本亜里紗ほか. 交差混合試験の新規教材の開発: 直接抗凝固薬を用いたインヒビター疑似検体の開発の可能性. *臨床検査教育* 2019;11:175-181.

- 8) 山口航, 瀬川美桜, 瀧口響子, 高嶋真理, 眞鍋紀子. 学内実習のための交差混合試験 (クロスミキシング試験) 疑似検体の作製. 臨床検査学教育 2018;10:14-18.
- 9) 小山大輔, 葉名尻良, 兼松毅ほか. 濾胞性リンパ腫を背景に発症したループスアンチコアグラント低プロトロンビン血症症候群. 臨床血液 2020;61:745-749.
- 10) 内場光浩, 安東由喜雄. 凝固補正試験を用いた凝固時間延長症例へのアプローチ: その応用と問題点. 臨床病理 2009;57:1004-1012.
- 11) Lancellotti S, De Cristofaro R. Congenital prothrombin deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:367-381.
- 12) Lancellotti S, Basso M, De Cristofaro R. Congenital prothrombin deficiency: an update. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:596-606.
- 13) Knobl BL, Lechner K. acquired factor V inhibitors. *Baillieres Clin Haematol* 1998;11:305-318.
- 14) Nesheim ME, Nichols WL, Cole TL, et al. Isolation and study of an acquired inhibitor of human coagulation factor V. *Clin Invest* 1986;77:405-415.
- 15) Rosner E, Pautzner R, Lusky A, et al. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity, *Thromb Haemost* 1987;57:144-7.
- 16) 下村大樹, 高田旬生, 河野紋ほか. 新規APTTクロスミキシング判定法であるWaS-ALD50法の確立. 医学検査 2021;70:613-621.

全自動化学発光酵素免疫測定システムルミパルスL2400を用いた 「SARS コロナウイルス抗原キットルミパルスプレスト SARS-CoV-2 Ag」の性能評価

Basic performance of the reagent kit LUMIPULSE Prest SARS-CoV-2 Ag
using the automatic immune analyzer L2400

大久保学, 木村千紘, 古川聡子, 上杉里枝, 岡崎希美恵, 通山 薫

要旨 ルミパルスプレスト SARS-CoV-2 Agの併行精度の変動係数 (CV) は0.8% (平均値178.01pg/mL), 日差再現性のCVは2.6% (平均値184.01pg/mL), 希釈直線性は9,800.98pg/mLまで原点を通る直線性を認め, 定量限界は0.12pg/mLであり高感度かつ精度も良好であった。RT-PCR法との判定一致率91% (73/80) であった。この試薬を用いたルミパルスL2400は多検体を迅速に測定できるため, 感染症診療に貢献できると期待される。

Key words LUMIPULSE Prest SARS-CoV-2 Ag, L2400, CLEIA

1. はじめに

新型コロナウイルス感染症 (coronavirus disease 2019: COVID-19) は新型コロナウイルス (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2) による急性の呼吸器感染症である。症状は, 呼吸器症状, 発熱, 倦怠感, 頭痛などがみられ, 呼吸不全, 血栓塞栓症等の合併症や重症化に伴い死亡する場合がある。よって, SARS-CoV-2検査による早期診断・治療が重要である¹⁾。

SARS-CoV-2の検出は核酸増幅検査, 抗原定性検査, 抗原定量検査を原理とする各種方法がありそれぞれ特徴がある¹⁾。核酸増幅検査の一つである逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR) は微量のウイルスを検出できるが, 専用の検査装置

が必要であり, 測定結果が得られるまでに時間を要し, また多検体を同時に測定できないという問題点があった¹⁾。イムノクロマト法による抗原定性検査は, 検査機器が不要で簡便かつ短時間で検査結果が得られる利点もあるが, ウイルス量不足による偽陰性, 非特異反応による偽陽性が問題とされる²⁾。免疫測定装置で測定可能な抗原定量検査は, 多検体の迅速な測定が可能である事が利点である。今回我々は抗原定量検査の1つである化学発光酵素免疫測定法 (Chemiluminescent enzyme immunoassay: CLEIA) を原理とする全自動化学発光酵素免疫測定システム ルミパルス L2400 (以下 ルミパルス L2400) を用いたSARS コロナウイルス抗原キットルミパルスプレスト SARS-CoV-2 Agの性能評価を行ったので報告する。

Received Jun. 28, 2023; Accepted Nov. 16, 2023
Manabu OKUBO, Chihiro KIMURA, Satoko HURUKAWA, Satoe UESUGI, Kimie OKAZAKI, Kaoru TOHYAM
川崎医科大学附属病院 中央検査部
Department of Clinical Laboratory, Kawasaki Medical School Hospital

〒701-0192 岡山県倉敷市松島577
577 Matsushima, Kurashiki-shi, Okayama 701-0192, Japan
Corresponding author: 大久保学
TEL: 086-462-1111
E-mail: okubo@hp.kawasaki-m.ac.jp

2. 対象および試薬・機器

1) 対象

対象は2022年9月～10月の間、COVID-19疑いでRT-PCR検査が依頼された外来および入院患者80例とした。検査材料は鼻咽頭ぬぐい液検体を用い、検体の採取は鼻腔用滅菌綿棒Ex スワブ002T（デンカ）を使用した。なお、本研究は川崎医科大学・同附属病院倫理委員会の承認（受付番号:5894-00）を得て実施した。

2) 測定試薬および機器

検討試薬はルミパルスプレストSARS-CoV-2 Ag（以下本試薬）を用いてルミパルスL2400で測定した。コントロール、標準液、検体処理液はそれぞれLPコントロール・SARS-CoV-2 Ag、標準SARS-CoV-2 Ag、および検体処理液セットSARS-CoV-2&Flu（以下検体処理液）を用いた（測定試薬、機器、コントロール、標準液、検体処理液は全て富士レビオ）。対照法としてRT-PCRを用いたスマートジーンSARS-CoV-2（以下RT-PCR法）を用いて全自動遺伝子解析装置Smart Gene（測定試薬、機器共にミズホメディール）で測定した。

3) 測定原理

本試薬は2ステップサンドイッチ法を用いたCLEIA法である。以下に反応プロトコルを示す。

1. 抗体結合粒子上の抗SARS-CoV-2モノクローナル抗体（マウス）と検体中のSARS-CoV-2抗原を反応させ、免疫複合体が形成される。
2. 反応液除去後、抗体結合粒子の洗浄を行い、未反応液を除去する。
3. アルカリフォスファターゼ（ALP）標識抗SARS-CoV-2モノクローナル抗体（マウス）を加え、抗体結合粒子と結合したSARS-CoV-2抗原を介した免疫複合体を形成させる。
4. 再び、反応液除去後、抗体結合粒子の洗浄を行い、未反応液を除去する。
5. 発光基質3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3"-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・2ナトリウム塩（AMPPD）を加え、抗体結合粒子上のALPにより分解された際の発光の強度を測定する。
6. 既知濃度の検量線より試料中のSARS-CoV-2抗原量を求める。

4) 統計

各測定性能の解析には、日本臨床化学会が提供している定量測定法のバリデーション算出用プログラムValidation-Support/Excel Ver.428を用いた。

3. 方法

1) 併行精度

2濃度のLPコントロール・SARS-CoV-2Agをそれぞれ10回連続測定し、変動係数（CV）を評価した。

2) 日差再現性

2濃度のLPコントロール・SARS-CoV-2Agを1日1回、10日間測定し、CVを評価した。

3) 希釈直線性

10,000 pg/mLの標準SARS-CoV-2Agを溶解溶液で5段階希釈し、各試料を1回測定し、直線性を評価した。

4) 定量限界

LPコントロール・SARS-CoV-2Agを溶解溶液で希釈し、低濃度試料を5例作成した。その試料を5日間にわたってそれぞれ2重測定し、測定平均値およびCVを算出し、precision profileを作成した。CV20%の濃度を定量限界とした。

5) 相関

患者80例を対象に、本試薬とRT-PCR法の判定一致率を求めた。以下に本試薬とRT-PCR法の検体処理方法を示す。

・本試薬

1. 採取した綿棒の綿球部分を検体処理液に浸し、スクイズチューブの周りから綿球部分を指で押さえながら10回程度綿棒を回転させた。
2. 綿球部分の液体を絞り出しながら綿棒を取り出した。
3. 調整した試料液の入ったスクイズチューブにろ過フィルター付きの滴下チップを取り付け、5分間静置した。
4. スクイズチューブから日立カップに試料液を滴下した。
5. 試料を入れた日立カップを1880×g・5分間遠心し、測定を行った。

・RT-PCR法

1. 抽出液を5回転倒混和し、水色のキャップを取り外した。
2. 綿棒を抽出液の底まで入れ、綿球をはさむ様におさえ、綿棒を5回程度左右に回転させた。
3. 抽出液の容器側面に綿球を押し当てながら液を絞り出し、綿棒を取り出した。
4. フィルターをしっかりと締め、抽出液を数回揺すって十分混和し、試料とした。
5. フィルターキャップをはずし、試料4滴をテストカートリッジの試料滴加孔に滴下し、テストカートリッジを機器に設置し、測定した。

本試薬は1.34 pg/mL以上³⁾, RT-PCR法はThreshold cycle 値 (Ct 値) 40 以下⁴⁾を陽性とした。また、本試薬と RT-PCR 法では、1本の綿棒を用いて、RT-PCR 法、本試薬の順番で検体処理した。

4. 結果

1) 併行精度

2濃度のLPコントロール・SARS-CoV-2 Agを用いた併行精度は、LOWは全て<0.12 pg/mLであり、HIGHのCVは0.8 % (平均値178.01 pg/mL)であった (Table 1)。

2) 日差再現性

2濃度のLPコントロール・SARS-CoV-2 Agを用いた日差再現性は、LOWは全て<0.12 pg/mLであり、HIGHのCVは2.6 % (平均値184.01 pg/mL)であった (Table 2)。

3) 希釈直線性

標準SARS-CoV-2Agを用いた希釈試験では、9,800.98 pg/mLまで原点を通る直線性を認めた (Fig. 1)。

4) 定量限界

低濃度に調整したLPコントロール・SARS-CoV-2Agを用いて求めた定量限界は0.12 pg/mLであった (相対標準偏差CV=20 %) (Fig. 2)。

5) 相関

本試薬と RT-PCR 法との判定一致率、判定不一致症例の一覧をそれぞれ Table 3, Table 4 に示す。感度 (陽性一致率) は92 % (23/25), 特異度 (陰性一致率) は91 % (50/55), 判定一致率は91 % (73/80)であった。判定不一致となった7症例のうち本試薬陽性、RT-PCR法陰性であった5例のSARS-CoV-2抗原量は2.25~5.04 pg/mLであり、本試薬陰性、RT-PCR法陽性であった2例のSARS-CoV-2抗原量は0.12, 0.37 pg/mLであった。

5. 考察

ルミパルスプレストSARS-CoV-2Agの性能評価を行った。併行精度はCV0.8 %以下、日差再現性はCV2.6 %以下であったことから、他メーカーの化学発光酵素免疫測定法の試薬と同等な結果であり⁵⁾, 精度の高い試薬と考えられる。希釈直線性は測定上限 (10,000 pg/mL) 付近の9,800.98 pg/mLまで原

Table 1 Within-run precision of the measurement of SARS-CoV-2 antigen concentration.

	LP Control・SARS-CoV-2 Ag	
	LOW	HIGH
Mean (pg/mL)	<0.12	178.01
SD	-	1.46
CV (%)	-	0.8
Max (pg/mL)	<0.12	180.20
Min (pg/mL)	<0.12	176.02

Table 2 Between-run precision of the measurement of SARS-CoV-2 antigen concentration.

	LP Control・SARS-CoV-2 Ag	
	LOW	HIGH
Mean (pg/mL)	<0.12	184.01
SD	-	4.85
CV (%)	-	2.6
Max (pg/mL)	<0.12	191.92
Min (pg/mL)	<0.12	176.76

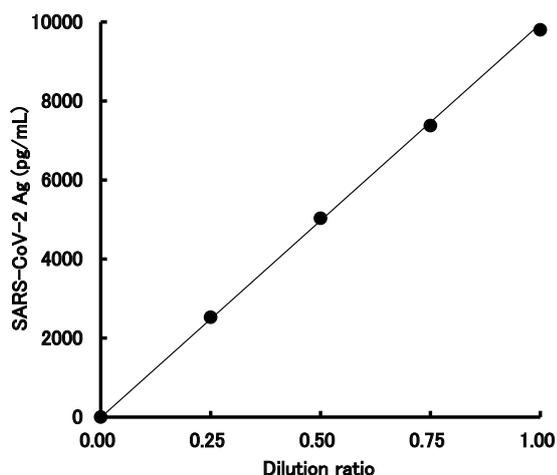


Fig. 1 Dilution linearity for the SARS-Co-2 antigen.

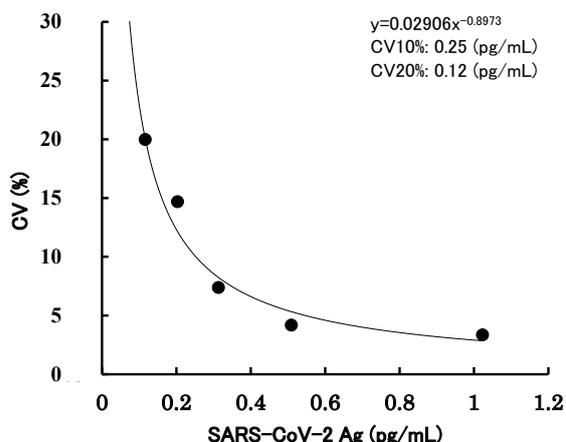


Fig. 2 Limit of quantitation for the SARS-Co-2 antigen.

Table 3 Relationship between SARS-CoV-2 antigen concentration and RT-PCR quantitative.

		RT-PCR				Total
		Positive			Negative	
		≤30	31~35	36~40	≥41	
Lumipulse Presto SARS-CoV-2 Ag	Positive					
	≥10000	14	0	0	0	14
	≥1000~<10000	0	0	2	0	2
	≥100~<1000	0	2	0	0	2
	≥10~<100	0	0	3	0	3
Negative	<1.34	0	1	1	50	52
Total		14	4	7	55	80

Concordance 91% (73/80)

Table 4 Clinical characteristics of seven cases showing the discrepancy in the judgement of SARS-CoV-2 antigen concentration and RT-PCR quantitative.

No	Antigen concentration (pg/mL)	RT-PCR	Ct value	Initial symptoms	Body temperature (°C)	Test day from onset (days)
1	3.55	-	>40 No amplification	None	35.7	-
2	5.04	-	>40 No amplification	Fever	37.8	-
3	2.31	-	>40 No amplification	None	36.8	-
4	4.10	-	>40 No amplification	None	36.8	-
5	2.25	-	>40 No amplification	Fever	38.4	-
6	0.37	+	40	None	36.3	2week ago onset
7	0.12	+	31	Fever	37.6	1

点を通る直線性を確認し、本検討においてSARS-CoV-2抗原が10,000 pg/mL以上の検体は、全てRT-PCR法のCT値が30以下の症例であった。SARS-CoV-2抗原が1,000 pg/mL以上では90%以上の検体で感染性を有する可能性が報告されており⁶⁾、本試薬は感染把握に十分な直線性であることが確認できた。定量限界は0.12 pg/mLであり、本試薬の添付文書に記載された定量限界0.60 pg/mL³⁾を満たしていることが確認できた。荒川ら⁷⁾は、発熱によって来院した患者のSARS-CoV-2抗原量は高値であったが、治療を行い症状の軽快時にはSARS-CoV-2抗原量が低値となったと報告しており、本試薬を用いたSARS-CoV-2抗原量測定は、治療効果、重症度の指標に繋がる可能性がある。

当院では、SARS-CoV-2感染の判定はRT-PCR法のCt値が40以下となった場合を陽性としている。今回、本試薬とRT-PCR法との判定一致率を検討した結果、陽性一致率は92%、陰性一致率は91%、判定一致率は91%であり良好な結果であった。しかし、SARS-CoV-2抗原量が1.34 pg/mL以上10 pg/mL未満ではRT-PCR法陰性、陽性の症例を認めたこと、判定不一致となった7症例のうち本試薬陽性、RT-PCR法陰性の症例1~5のSARS-CoV-2抗原量が2.25~5.04 pg/mLであったことから、添付文書に記載されたSARS-CoV-2陽性の判定補助のカットオフ値は1.34 pg/mL³⁾であるが、SARS-CoV-2抗原量が1.34 pg/mL以上10 pg/mL未満は判定保留とし、時間をおいてから再度検体採取を行い再検査、またはRT-PCR法での追加検査が望ましいと考える。本検討では、SARS-CoV-2抗原量が10 pg/mL以上の検体は全ての検体でRT-PCR法が陽性であったが、大出ら⁸⁾は本試薬のSARS-CoV-2抗原量が10 pg/mL以上500 pg/mL未満の症例で原因不明の偽陽性が認められたと報告している。また、金ら⁵⁾は、化学発光酵素免疫測定法を原理とするSARS-CoV-2抗原測定試薬において粘膜表皮などの微細な不純物が原因で偽陽性反応を起し、ボルテックス攪拌が偽陽性反応回避に有用であったとの報告もある。本試薬の添付文書³⁾の「不純物を多く含む検体、粘性が高い検体は遠心後、上清を取り、検体希釈液で希釈して遠心後に測定する」を参考にして、本検討は検体処理後の検体を1880×g・5分間遠心した後に測定を行った。検体処理後の試料を遠心することによって微細な不純物が沈殿し、偽陽性を回避した可能性がある。今後、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)の偽陽性を確認するHBsAg-HQ抑制試薬⁹⁾のようなSARS-CoV-2Ag抑制試薬が開発され

れば、SARS-CoV-2抗原量が1.34 pg/mL以上10 pg/mL未満の検体も正確に判定できると考える。

また、判定不一致症例で本試薬陰性、RT-PCR法陽性となった2例のうち、症例6はカルテ記載から2週間前にSARS-CoV-2感染した既往例であった。SARS-CoV-2のウイルス量は、発症から15~18日後にはRT-PCRでは検出限界以下(40サイクルのPCRで検出されない)になるとの報告がある。しかしながら、SARS-CoV-2感染後の症状が消失した後もSARS-CoV-2 RNA検出限界前後まで減少しながら長期にSARS-CoV-2 RNAが検出され続ける症例があること¹⁰⁾、その場合SARS-CoV-2 RNAの検出のみを反映しており必ずしも生きたウイルスの存在を示すものではないことが報告されている¹¹⁾。残念ながら、SARS-CoV-2 RNAが長期に検出され続ける症例の特徴は言及されておらず、症例6と関連付けることはできなかったが、本症例もSARS-CoV-2 RNAが長期に検出された症例と推測する。症例7はRT-PCR法のCt値31であること(他のRT-PCR法(試薬:コバスSARS-CoV-2(ロシュ・ダイアグノスティクス))のCt値19.5)からもウイルス感染極初期の症例と考える。本試薬の結果が陰性でも臨床症状などからSARS-CoV-2感染を疑う場合は、積極的にRT-PCR法で確認することが望ましいと考える。

本検討には限界がある。相関では、1本の綿棒をRT-PCR法、本試薬の順番で使用した結果、RT-PCR法の抽出液(界面活性剤及びカオトロピック塩を含む緩衝液)⁴⁾が本試薬の反応に影響を与えた可能性が考えられる。抽出液が本試薬の反応を促進することによって症例1~5の判定不一致症例(本試薬陽性、RT-PCR法陰性)、または阻害することによって症例6や症例7の判定不一致症例(本試薬陰性、RT-PCR法陽性)が生じた可能性も考えられる。また、RT-PCR法の検体処理に多くのウイルスが抽出され、本試薬の検体処理には少量のウイルスしか抽出されないことによって、症例6や症例7の判定不一致症例(本試薬陰性、RT-PCR法陽性)が生じた可能性も考えられる。これらの可能性がどの程度結果に影響しているかは定かではないが、本検討の限界とする。

6. 結語

ルミパルスプレストSARS-CoV-2Agの分析性能は、併行精度、日差再現性、定量限界、希釈直線性、RT-PCR法との判定一致率においていずれも良好であった。この試薬を用いたルミパルスL2400は多検

体を迅速に測定できるため、感染症診療に貢献できると期待される。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) 新型コロナウイルス感染症COVID-19診療の手引き第9版
- 2) 山本肇, 佐藤愛実, 齋川健志ほか.SARS-CoV-2抗原定性検査キット「クイックナビTM-COVID19Ag」における核酸増幅検査との判定比較と不一致症例の提示. 医学検査2022;71(2):335-341.
- 3) ルミパルスプレストSARS-CoV-2 Ag添付文書第12版. 2022.
- 4) スマートジーン新型コロナウイルス検出試薬抽出液セット第3版. 2020.
- 5) 金貞姫, 菊池良介, 鈴木敦夫ほか. HISCLTMSARS-CoV-2抗原定量値に対するカットオフ値のバリデーション-当院における新型コロナウイルス抗原検査の現状と課題-. 医学検査2022;71(3):457-464.
- 6) 小堺利恵, 高橋瑞恵, アジヨウ ムムニ ポール フランク アデイシミほか. SARS-CoV-2抗原定量検査試薬の性能評価-ウイルスRNA 定量値およびウイルス分離結果との関係性. 医学と薬学2022;79(1):107-113.
- 7) 荒川聡, 兵藤理, 瀬戸文望ほか.新型コロナウイルスのスクリーニングを目的とした栄研化学 Loopamp®SARS-CoV-2とルミパルス®G1200 SARS-CoV-2抗原定量の使用経験. 日本染色体遺伝子検査 2021;39:40-48.
- 8) 大出恭代, 並木美奈, 川名孝幸ほか. COVID-19スクリーニング検査(抗原定量検査)の有効性の検討について. 医学検査2022;71(1):25-31.
- 9) ルミパルスHBsAg-HQ抑制試薬添付文書 第4版. 2017.
- 10) Zou L, Ruan F, Huang M et al.SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. N Eng J Med 2020;382(12):1177-1179.
- 11) Nandimi S, SundararaJ, Akihida R. Interpreting Diagnostic Test for SARS-CoV-2. JAMA 2020;323(22):2249-2251.

SARS-CoV-2 検査における唾液検体処理に関する検討

Investigation about saliva sample treatment in Lumipulse SARS-CoV-2 antigen test.

及川真依¹⁾, 千葉美穂¹⁾, 村井良精¹⁾, 遠藤明美¹⁾, 高橋 聡¹⁾²⁾

要旨 今回、我々は、「ルミパルス™検体希釈液」を唾液検体希釈液として用いた際のSARS-CoV-2抗原定量検査及び核酸増幅法検査へ及ぼす影響について検討した。比較対照であるPBS希釈検体との陽性・陰性一致率は、抗原定量検査でそれぞれ97.8%, 94.4%であり、測定値にも有意な差は認めなかった。核酸増幅法検査においては、陽性・陰性一致率いずれも93.0%、さらにそれぞれの希釈検体において算出されたCt値比の95%信頼区間は0.995-1.010であり、両検査ともに影響は認められなかった。以上より、「ルミパルス™検体希釈液」は唾液検体希釈液として使用できることが確認された。

Key words SARS-CoV-2, Saliva, sample dilution

1. はじめに

新型コロナウイルス (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2) 感染症検査には、現在、遺伝子検査および抗原 (定量・定性) 検査が実施され¹⁾、これらの検査に用いる検体種として、鼻咽頭ぬぐい液や鼻腔ぬぐい液に加え、唾液が用いられている。唾液検体は、鼻咽頭ぬぐい液とほぼ同等の検出感度を有し、患者自身によって採取可能で侵襲性も低いことから、広く用いられているが、夾雑物の多さや粘性が高いため、検査結果への影響が報告されている²⁾。抗原定量検査においては、粘性等によるサンプリングエラーを回避する目的で、リン酸緩衝液 (phosphate-buffer saline : PBS) あるいは検体希釈液を用いて検査を行うが³⁾、PBSを用いる場合には、新たに準備する必要がある。さらに、PBSと検体希釈液を用いた際、測定値に差異を認めるかについては不明であり、抗原定量検査では確認のための核酸増幅法検査を必要とする場合があ

るが、検体処理液によって希釈した検体で実施可能かについては不明である。また、希釈検体を用いているにもかかわらず、唾液検体では非特異反応による偽陽性が散見される⁴⁾。

今回、我々は、唾液を用いたSARS-CoV-2感染症検査における、検体希釈液による抗原定量検査および核酸増幅法検査の測定値および非特異反応への影響について検討を行ったので報告する。

2. 材料および方法

1) 対象

2020年2月から2023年3月までにSARS-CoV-2感染と診断された、またはその疑いにて札幌医科大学附属病院で検査を行った唾液検体200例を用いた。なお、本研究は札幌医科大学臨床研究審査委員会の承認を得て行った (整理番号342-28)。

2) 測定試薬および機器

検体希釈液に関する検討は、検討試薬として「ルミパルス™検体希釈液」(富士レボ株式会社、以下

Received Apr. 7, 2023; Accepted Nov. 20, 2023
Mai OIKAWA¹⁾, Miho CHIBA¹⁾, Ryosei MURAI¹⁾,
Akemi ENDOH¹⁾, Satoshi TAKAHASHI¹⁾²⁾

¹⁾ 札幌医科大学附属病院 検査部

Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital.

²⁾ 札幌医科大学医学部 感染制御・臨床検査医学講座

Department of Infection Control and Laboratory

Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine.

〒060-8543 北海道札幌市中央区南1条西16丁目
South-1, West-16, Chuo-ku, Sapporo, 060-8543, Japan.

Corresponding Author : 及川真依

TEL : 011-611-2111 (内線36430)

FAX : 011-615-3646

E-mail : moikawa@sapmed.ac.jp

Dil), 対照試薬としてPBSを用いた。測定には, 化学発光酵素免疫測定法を原理とする「ルミパルス SARS-CoV-2 Ag」および「ルミパルスプレスト SARS-CoV-2 Ag」を用い, それぞれ「ルミパルス G1200 plus」(以下, G1200) および「ルミパルス L2400」(以下, L2400) (いずれも富士レビオ株式会社) で測定した。また, すべての検体は, 「Ampdirect™ 2019-nCoV検出キット」(島津製作所株式会社) を用いて核酸増幅法検査を実施した。抗原定量検査は0.67 pg/mL以上を陽性とし, 核酸増幅法検査では増幅曲線の立ち上がりを認めたものを陽性と判定した。

3) 測定方法

唾液検体500 μ LとDil500 μ Lを等量混合し, 2000g \times 10分遠心した上清500 μ Lに対して, さらに2000g \times 5分遠心したものをを用いた。ここから分注した10 μ Lに対して核酸増幅法検査を実施し, 残りの検体をG1200, L2400で測定した。比較対照にはDilの代わりにPBSを用い, 同様に処理したものをを用いた。

4) 用いる唾液検体希釈液による判定結果への影響に関する検討

DilおよびPBSで希釈した唾液検体の抗原定量検査とPBS希釈した唾液検体の核酸増幅法検査における判定一致率を算出することで, Dilの検体希釈液としての有用性を評価した。さらに, G1200とL2400による抗原定量検査におけるDil希釈検体とPBS希釈検体の判定一致率をそれぞれ算出し, 機種間差を調べた。

5) 検体希釈液による核酸増幅法検査に及ぼす影響に関する検討

Dil希釈検体とPBS希釈検体の核酸増幅法検査における判定一致率を算出した。また, それぞれの希釈検体において得られたCt値比を算出し, Dilの核酸増幅法検査における測定値への影響を解析した。

6) 検体希釈液による測定値への影響に関する検討

陽性検体において, 用いる検体希釈液による抗原定量値へ及ぼす影響を検討した。その方法として, PBS希釈検体の抗原定量値を, 試薬添付文書に記載されている再検推奨基準値(4.00pg/mL)および抗原定性検査の検出感度として報告されている値⁵⁾(100.00pg/mL)より, 0.67pg/mL以上4.00pg/mL未満, 4.00pg/mL以上100.00pg/mL未満, 100.00pg/mL以上の3群に分け, 各群のDil希釈検体とPBS希釈検体の測定値に差を認めるか否か検討した。また, 同様の影響について機種間で差を認めるかについて検討した。なお, 統計解析として

Steel-Dwass検定を用いて解析した。

7) 統計解析

統計解析はSAS Platform JMP Pro version 17.0.0 (SAS Institute Japan株式会社) を用い, $p < 0.05$ の場合, 有意差ありと判定した。

3. 成績

1) 用いる検体希釈液による判定結果への影響に関する検討

カットオフ値を0.67pg/mLとした場合のDil希釈検体およびPBS希釈検体の抗原定量検査結果およびPBS希釈検体を用いた核酸増幅法検査結果の判定一致率を算出したところ, 希釈液および機器に関わらず全てにおいて陰性一致率は100%であった。一方, 陽性一致率はG1200ではDil希釈検体で75.2%, PBS希釈検体で72.1%, L2400ではDil希釈検体で72.1%, PBS希釈検体で70.5%であった(**Table 1a-d**)。

また, 抗原定量検査におけるDil希釈検体とPBS希釈検体の判定一致率は, G1200で陰性一致率94.4%, 陽性一致率97.8%, 判定不一致は8例認めた。一方, L2400ではそれぞれ, 96.3%, 97.8%であり, 判定不一致例は6例であった(**Table 2a, b**)。なお, G1200およびL2400で認めた判定不一致例は全て核酸増幅法検査で陽性であった(**Table 3a, b**)。

2) 検体希釈液による核酸増幅法検査に及ぼす影響に関する検討

Dil希釈検体とPBS希釈検体の核酸増幅法検査における陽性・陰性一致率は, いずれも93.0%であり(**Table 4a**), 判定不一致はDil希釈検体陽性, PBS希釈検体陰性が5例, Dil希釈検体陰性, PBS希釈検体陽性が9例の計14例であった(**Table 4b**)。また, Dil希釈検体とPBS希釈検体ともに増幅曲線の立ち上がりが認められた検体120例に関して, Dil希釈検体とPBS希釈検体から得られたCt値は, 両群で有意な差を認めず, その比も1.002 (95%信頼区間: 0.995-1.010) であり, 良好な相関関係であった。

3) 検体希釈液による測定値への影響に関する検討

PBS希釈検体の抗原定量値を, 0.67pg/mL以上4.00pg/mL未満, 4.00pg/mL以上100.00pg/mL未満, 100.00pg/mL以上の3群に分け, 各群のDil希釈検体とPBS希釈検体のG1200とL2400における測定値を解析したところ, いずれにおいても有意差は認めなかった(**Fig. 1a-c**)。

4. 考察

今回, 我々は, 唾液検体の希釈液におけるDilの有用性について検討した。DilおよびPBS希釈検体

Table 1 Analytical performances of SARS-CoV-2 antigen quantification test using saliva by measuring device and sample diluent.

a. Lumipulse®G specimen Diluent

		RT-PCR		total
		(+)	(-)	
Lumipulse G1200 plus	(+)	97	0	97
((+) ≥0.67 pg/mL)	(-)	32	71	103
total		129	71	200

Specification: 100.0 %, Sensitivity: 75.2 %

b. PBS

		RT-PCR		total
		(+)	(-)	
Lumipulse G1200 plus	(+)	93	0	93
((+) ≥0.67 pg/mL)	(-)	36	71	107
total		129	71	200

Specification: 100.0 %, Sensitivity: 72.1 %

c. Lumipulse®G specimen Diluent

		RT-PCR		total
		(+)	(-)	
Lumipulse L2400	(+)	93	0	93
((+) ≥0.67 pg/mL)	(-)	36	71	107
total		129	71	200

Specification: 100.0 %, Sensitivity: 72.1 %

d. PBS

		RT-PCR		total
		(+)	(-)	
Lumipulse L2400	(+)	91	0	91
((+) ≥0.67 pg/mL)	(-)	38	71	109
total		129	71	200

Specification: 100.0 %, Sensitivity: 70.5 %

の抗原定量検査の比較をしたところ、陰性一致率はG1200で94.4%、陽性一致率はG1200で97.8%であり、判定不一致例はL2400の結果を合わせて14例、いずれも核酸増幅法は陽性であった。判定不一致例の内訳は、PBS希釈検体の偽陰性によるものが10例、Dil希釈検体の偽陰性によるものが4例とDilの方がわずかに少なかった。抗原定量検査と核酸増幅法検査の陽性一致率についても、DilではG1200で75.2%、L2400で72.1%、PBSではG1200で72.1%、L2400で70.5%と、Dilを使用した場合の方が高く、良好な結

Table 2 Analytical performances of Lumipulse®G specimen Diluent and PBS for SARS-CoV-2 quantitative antigen test.

a. Lumipulse G1200 plus

		PBS		total
		((+) ≥0.67 pg/mL)		
		(+)	(-)	
Lumipulse®G	(+)	91	6	97
specimen Diluent	(-)	2	101	103
total		93	107	200

Specification: 94.4 %, Sensitivity: 97.8 %

b. Lumipulse L2400

		PBS		total
		((+) ≥0.67 pg/mL)		
		(+)	(-)	
Lumipulse®G	(+)	89	4	93
specimen Diluent	(-)	2	105	107
total		91	109	200

Specification: 96.3 %, Sensitivity: 97.8 %

果が得られた。抗原定量値ごとに0.67pg/mL以上4.00pg/mL未満、4.00pg/mL以上100.00pg/mL未満、100.00pg/mL以上の3群に分けて解析したところ、最低でも $p=0.4917$ と、いずれの群においても測定値に有意差を認めないことから、唾液の検体希釈液や測定機器に影響を受けることなく、同等の測定値が得られることが示された。抗原定量検査の比較や核酸増幅法検査との比較で判定不一致となった原因として、得られた抗原定量値が低く検出感度付近であることから、わずかなサンプリング誤差や測定誤

Table 3 Discrepant samples between Lumipulse®G specimen Diluent and PBS for SARS-CoV-2 quantitative antigen test.

a. Lumipulse G1200 plus			
		Antigen test (pg/mL)	Nucleic acid amplification (Ct value)
1	Lumipulse®G specimen Diluent	0.63(-)	35.88
	PBS	0.67(+)	35.78
2	Lumipulse®G specimen Diluent	0.47(-)	40.20
	PBS	0.84(+)	40.82
3	Lumipulse®G specimen Diluent	1.03(+)	41.04
	PBS	0.21(-)	40.87
4	Lumipulse®G specimen Diluent	0.71(+)	not detected
	PBS	0.54(-)	38.73
5	Lumipulse®G specimen Diluent	0.75(+)	41.60
	PBS	0.55(-)	39.19
6	Lumipulse®G specimen Diluent	1.41(+)	35.54
	PBS	0.60(-)	36.89
7	Lumipulse®G specimen Diluent	0.72(+)	36.22
	PBS	0.65(-)	36.37
8	Lumipulse®G specimen Diluent	0.86(+)	35.33
	PBS	0.66(-)	36.91
b. Lumipulse L2400			
		Antigen test (pg/mL)	Nucleic acid amplification (Ct value)
1	Lumipulse®G specimen Diluent	0.51(-)	40.20
	PBS	0.68(+)	40.82
2	Lumipulse®G specimen Diluent	0.65(-)	38.84
	PBS	0.82(+)	36.06
3	Lumipulse®G specimen Diluent	1.13(+)	41.04
	PBS	0.28(-)	40.87
4	Lumipulse®G specimen Diluent	0.72(+)	35.33
	PBS	0.57(-)	36.91
5	Lumipulse®G specimen Diluent	0.73(+)	39.39
	PBS	0.64(-)	38.77
6	Lumipulse®G specimen Diluent	1.05(+)	35.86
	PBS	0.66(-)	36.38

Table 4 Comparison of Lumipulse®G specimen Diluent and PBS for SARS-CoV-2 nucleic acid amplification.

a. Analytical performances				
		PBS		total
		(+)	(-)	
Lumipulse®G specimen Diluent	(+)	120	5	125
	(-)	9	66	75
total		129	71	200
Specification: 93.0 %, Sensitivity: 93.0 %				
b. Discrepant findings				
		Nucleic acid amplification (Ct value)		
1	Lumipulse®G specimen Diluent	41.19		
	PBS	not detected		
2	Lumipulse®G specimen Diluent	41.07		
	PBS	not detected		
3	Lumipulse®G specimen Diluent	40.97		
	PBS	not detected		
4	Lumipulse®G specimen Diluent	40.80		
	PBS	not detected		
5	Lumipulse®G specimen Diluent	39.60		
	PBS	not detected		
6	Lumipulse®G specimen Diluent	not detected		
	PBS	38.73		
7	Lumipulse®G specimen Diluent	not detected		
	PBS	38.77		
8	Lumipulse®G specimen Diluent	not detected		
	PBS	39.47		
9	Lumipulse®G specimen Diluent	not detected		
	PBS	40.12		
10	Lumipulse®G specimen Diluent	not detected		
	PBS	40.79		
11	Lumipulse®G specimen Diluent	not detected		
	PBS	41.05		
12	Lumipulse®G specimen Diluent	not detected		
	PBS	41.12		
13	Lumipulse®G specimen Diluent	not detected		
	PBS	42.10		
14	Lumipulse®G specimen Diluent	not detected		
	PBS	42.39		

差が考えられた。また、本検討にて抗原定量検査で 0.67pg/mL以上で陽性と判定された93例はすべて核酸増幅法検査においても陽性と判定されており、既報⁶⁾で1.7%程度報告されている抗原定量検査の偽陽性反応は認めなかった。この原因として、唾液検体の適切な遠心処理が非特異反応の頻度を低下させる可能性が報告されており⁷⁾、今回の検討においても十分とされる遠心条件で実施したことによると

考えられた。

Dilの核酸増幅法検査への影響については、陽性・陰性一致率いずれも93.0%、増幅曲線の立ち上がり認められたDil希釈検体およびPBS希釈検体のCt値の比の95%信頼区間が0.995-1.010であることから、核酸増幅法検査への影響は認められず、必要に応じて核酸増幅法検査への使用も可能であると考えられた。DilはG1200に搭載し、機器上で高値検体希釈

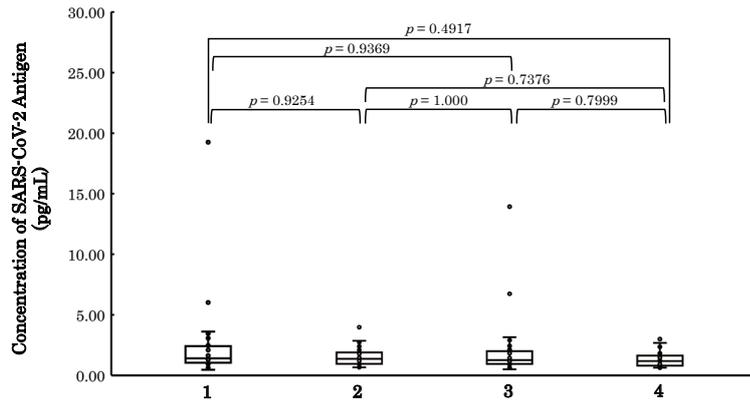


Fig. 1a Differences in SARS-CoV-2 antigen quantification test using saliva by measuring device and sample diluent in the groups from 0.67 pg/mL to less than 4.00 pg/mL

1. Lumipulse®G Specimen Diluent 1 using Lumipulse G1200 plus, 2. PBS using Lumipulse G1200 plus,
3. Lumipulse®G Specimen Diluent 1 using Lumipulse L2400, 4. PBS using Lumipulse L2400

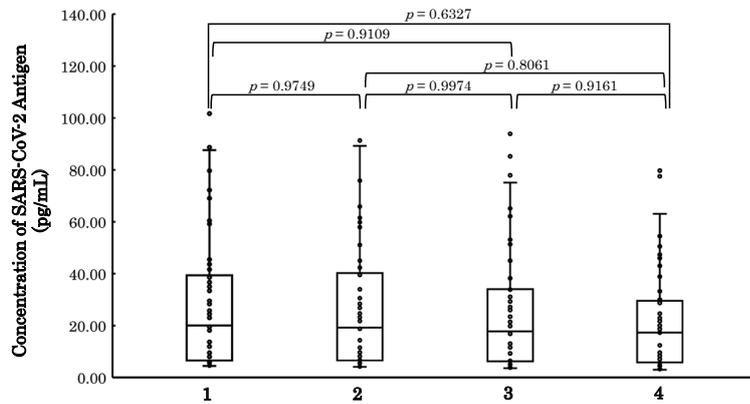


Fig. 1b Differences in SARS-CoV-2 antigen quantification test using saliva by measuring device and sample diluent in the groups from 4.00 pg/mL to less than 100.00 pg/mL

1. Lumipulse®G Specimen Diluent 1 using Lumipulse G1200 plus, 2. PBS using Lumipulse G1200 plus,
3. Lumipulse®G Specimen Diluent 1 using Lumipulse L2400, 4. PBS using Lumipulse L2400

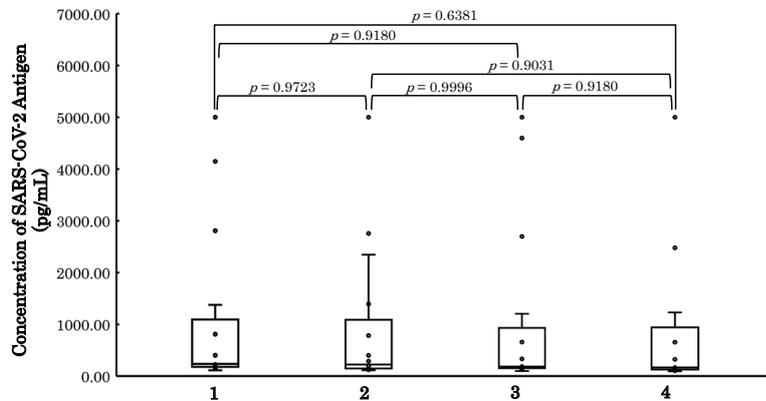


Fig. 1c Differences in SARS-CoV-2 antigen quantification test using saliva by measuring device and sample diluent in the groups over 100.00 pg/mL

1. Lumipulse®G Specimen Diluent 1 using Lumipulse G1200 plus, 2. PBS using Lumipulse G1200 plus,
3. Lumipulse®G Specimen Diluent 1 using Lumipulse L2400, 4. PBS using Lumipulse L2400

の際に用いられる試薬である。そのため、Dilを準備している場合は、別途PBSを用意せずとも唾液を用いたSARS-CoV-2抗原測定および核酸増幅法検査の実施が可能であると考えられた。

5. 結論

「ルミパルス™検体希釈液」による唾液検体の希釈は、偽陽性反応も認めず、従来法のPBSと比べ、抗原定量検査および核酸増幅法検査において同等の結果が得られることが確認された。以上より、「ルミパルス™検体希釈液」はPBSの代用品として用いて問題ないと考えられる。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文献

- 1) 山岡悠太郎, 宮川敬, 森田武志ほか. 新型コロナウイルス感染症に対する抗原検査. 感染制御と予防衛生 2021;5:60-66.
- 2) Nagura M, Imai K, Tabata S, et al. Clinical evaluation of self-collected saliva by quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR), direct RT-qPCR, reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification, and a rapid antigen test to diagnose COVID-19. *Journal of Clinical Microbiology* 2020;58:e01438-20
- 3) 国立感染症研究所 2019-nCoV (新型コロナウイルス) 感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル ~2020/06/02 更新版~ https://www.niid.go.jp/niid/images/pathol/pdf/2019-nCoV_200602.pdf (2023年7月25日アクセス)
- 4) Kobayashi R, Murai R, Moriai M, et al. Evaluation of false positive in the SARS-CoV-2 quantitative antigen test. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2021;27:1477-1481.
- 5) Pollock NR, Savage TJ, Wardell H, et al. Correlation of SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen and RNA concentrations in nasopharyngeal samples from children and adults using an ultrasensitive and quantitative antigen assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2021;59:e03077-20.
- 6) Asai N, Sakanashi D, Ohashi W, et al. Efficacy and validity of automated quantitative chemiluminescent enzyme immunoassay for SARS-CoV-2 antigen test from saliva specimen in the diagnosis of COVID-19. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2021;27:1039-1042.
- 7) 小林亮, 村井良精, 米澤仁ほか. 唾液を用いたSARS-CoV-2抗原定量検査における遠心条件に関する検討. 医療検査と自動化 2021;46:271-274

一般社団法人 日本医療検査科学会
2023 年度 第 6 回理事会 議事録

開催日時：2024 年 1 月 26 日（金）15 時 00 分～17 時 00 分

開催場所：日本医療検査科学会事務所（および ZOOM 会議）

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、橋口照人理事、藤巻慎一理事、堀田多恵子理事、
増田亜希子理事
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、本理事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：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. 副理事長職務報告（清宮理事）

清宮副理事長より、毎月の経費確認と JACLaS との定例会議、会員システムの改修に関する打合せを行ったと報告した。

2-2. 日本臨床検査振興協議会より能登半島地震に関して（高橋理事）

日本臨床検査振興協議会、大規模災害対策委員会委員長より能登半島地震に関連して POC 技術委員会への協力の依頼があり快諾したと報告した。

2-3. 第 55 回大会に関する申立書（高橋理事）

第 55 回大会における盗用被害申立書が提出された旨の報告があり、資料に基づき説明があった。今回の案件は施設内での問題であると考えられる為、申立者への確認の上施設責任者へ報告することを確認した。またランチョンセミナーでの案件の為、対象企業へ申立があったことのみを報告し、発表者との契約内容について確認することとなった。今後の対応として演題登録時のチェック項目の作成と趣意書等を見直すこととなった。

2-4. 認定 POC コーディネーター試験結果報告（藤巻理事）

認定 POC コーディネーター試験結果報告について、資料に基づき説明があった。

2-5. 日本臨床化学会のピットフォール事例集について（清宮理事）

日本臨床化学会のピットフォール検証推進委員会にて異常反応などの解析に利用するため検査項目ごとの国内外の事例を日本臨床化学会 HP にて掲載されている旨の報告があった。科学技術委員会にて昨年度発刊した「治療薬物および透析による検査値への影響」より25例をこちらに掲載することを報告した。

2-6. その他

特になし

3. 審議事項

3-1. 評議員推薦（高橋理事）

2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。

3-2. 微生物委員会委員長推薦について（高橋理事）

微生物検査・感染症委員会長尾委員長より次期委員長推薦についての申請があり、資料に基づき説明があった。審議の結果、申請通り2024年度より中村竜也先生（京都橘大学）を委員長とすることで承認された。

3-3. 編集委員長交代について（高橋理事）

編集委員会高橋委員長より、委員長交代に関する申請があった。審議の結果、申請通り2024年度より大川龍之介先生（東京医科歯科大学）を委員長とすることで承認された。

3-4. 学術委員会より各委員会議事録（増田理事）

学術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。

3-5. 学術委員会より委員異動申請（中山理事）

科学技術委員会と微生物検査・感染症委員会の委員移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。

3-6. 科学技術委員会内規更新について（清宮理事）

科学技術委員会内規更新について資料に基づき説明があった。内規更新については承認された。また萩原監事より「学術委員会毎に内規記載の有無がはっきりしていないので統一すべき」「内規を掲載している委員会および外部に公開している情報源の中で旧学会名の記載が残っていないか確認の必要がある」との意見があり再確認をすることとなった。

3-7. POCセミナーの外部機関への掲載について（藤巻理事）

第88回POCセミナー内容の「医療と検査機器試薬」への投稿掲載について申請があり、資料に基づき説明があった。審議の結果申請通り承認され、「医療と検査機器試薬」への投稿経緯やルールについて再度確認することとなった。また技術セミナーの活動実績など学会誌に掲載する方針とすることとし、掲載方法や内規の作成について今後検討していくこととなった。

3-8. 遺伝子委員会より外部管理について（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内容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ていることを確認し案内文に問い合わせ先を明記する事となった。審議の結果申請通り承認された。

3-9. 大会参加事前登録システム改修費用について（事務局）

大会参加事前登録システム改修費用について資料に基づき説明があった。見積書内の金額の内訳や具体的な詳細内容などを再度確認することとなった。

3-10. 大会参加事前登録システム英語対応費用について（事務局）

大会参加事前登録システム英語対応費用について資料に基づき説明があった。見積書内の金額の内訳や具体的な詳細内容などを再度確認することとなった。

3-11. 社員総会招集通知の電磁的方法について（事務局）

社員総会招集通知や資料の発送を電磁的方法（メール等）での発送方法に変更について申請があった。増田理事より「一般社団法人の法律上では社員総会招集通知は郵送のみ可能なため、電磁的方法での通知は出来ない」「資料の提供については電磁的方法を利用することが可能であるが、定款の変更した上、総会の3週間前まで提供する必要がある」との意見あった。審議の結果、司法書士に確認の上進捗状況を報告していくこととなった。

3-12. 優秀論文規定改訂について（高橋理事）

優秀論文規定改訂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。

3-13. 投稿規定改訂について（高橋理事）

投稿規定改訂について資料に基づき説明があり、審議の結果、以下の点を修正することとなった。

- ・7. オーサーシップの基準条件に関する記載内の句読点の追記
- ・8. 最終文「必要な際、当該研究が～」の記載内容と掲載位置の変更検討

3-14. その他

大川理事より春季セミナーについての取材申し込みがあったこと報告し承認された。また春季セミナーの開催について現地の状況を確認し、現地開催をする意向で準備を進めている。今後の状況によってはオンデマンド開催にする可能性があり、シミュレーションを行い2月中旬までは開催方法の変更が可能である事を報告した。

石山理事より第39回春季セミナー開催日を4月20日にて検討している事を報告した。

4. その他

- ・次回の理事会：4月13日（土）12：00（予定） 金沢市文化ホール

以上

2024年2月13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 藤原 三平 
(出席監事)

投稿規定

投稿規定が改定されました。
令和6年3月1日以降の投稿に適用します。

(令和6年1月26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。
オーサーシップの基準としては下記の4条件を満たしている場合¹⁾とする。
 - 1) 論文の構想、デザイン、データの収集、分析と解釈において相応の貢献をした。
 - 2) 論文作成または重要な知的内容に関わる批判的校閲に関与した。
 - 3) 発表原稿の最終承認をした。
 - 4) 論文のいかなる部分においても、正確性あるいは公正性に関する疑問が適切に調査され、解決されることを保証する点において、論文の全側面に責任があることに同意した。オーサーシップの基準を満たさない貢献者は、著者としてではなく、貢献者として、謝辞に記載する。謝辞に記載する際は、個別に、あるいは、「臨床調査者」「参加調査者」の見出しのもとに記載し、貢献内容に関して「科学的助言」「データ収集」「論文作成・校閲」のように明記する。
ギフトオーサーシップ、ゲストオーサーシップ、ゴーストオーサーシップは認められない。
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。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。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。
9. 不正行為に対する罰則規定
 - 1) 特定不正行為である捏造、改ざん、盗用が判明した場合、審査中であれば論文を却下、掲載後であればその論文を撤回する旨を誌上に掲載する。
 - 2) 当該論文の筆頭著者および共著者はその後、5年間投稿禁止とする。
 - 3) 編集委員会の判断により非常に悪質と判断された場合は、理事会の議を経て、著者の雇用主や所属団体への告知および調査依頼、他誌への周知、あるいは厚生労働省への報告を含めた対応を行う。
 - 4) 多重投稿（同一内容の原稿を、同一言語、複数言語にかかわらず、同時に、複数の雑誌に投稿すること）、サラム論文（1つの研究を、複数の研究に分割して、細切れに発表した論文）については、その扱いを編集委員会で判断する。
10. 内容の誤りへの対応
内容に誤りがあり、論文の結果、解釈、結論の方向性や有意性が変わらない場合は、「訂正」の掲載にて対応する。

別表 1 引用文献

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

〈雑誌〉

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

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

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

〈単行本〉

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

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

Goldfin A Adrenal medulla. In: Greenspan FS, Baxter JD, eds, Basic & Clinical Endocrinology, 4th ed, Appleton & Lange; 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} = μ (micro)	10 = da (deca)	10^9 = G (giga)
10^{-15} = f (femto)	10^{-3} = m (milli)	10^2 = h (hecto)	10^{12} = T (tera)
10^{-12} = p (pico)	10^{-2} = c (centi)	10^3 = k (kilo)	10^{15} = P (peta)
10^{-9} = n (nano)	10^{-1} = d (deci)	10^6 = M (mega)	10^{18} = E (exa)

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

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

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

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

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

追記

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

「医療検査と自動化」論文投稿時の著者チェックリスト 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)カインス	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
セラビジョン・ジャパン(株)	220-0004	神奈川県横浜市西区北幸1-11-5 相鉄KSビル 9F
テルモ(株)	163-1450	東京都新宿区西新宿3-20-2 東京オペラシティタワー 49F
デンカ(株)	103-8338	東京都中央区日本橋室町2-1-1
東京貿易メディシス(株)	191-0052	東京都日野市東豊田1-14-21
東ソー(株)	105-8623	東京都港区芝3-8-2
東洋鋼鈹(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
ビオメリュー・ジャパン(株)	107-0052	東京都港区赤坂2-17-7 赤坂溜池タワー 2F
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
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)ベリタス	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
ラジオメーター(株)	140-0001	東京都品川区北品川4-7-35
ロシュ・ダイアグノスティックス(株)	105-0075	東京都港区港南1-2-70 品川シーズンテラス

(令和6年2月25日現在)

編集後記

本号には、総説「高比重リポタンパクーインパクトの大きい小さな粒子ー」、第55回大会シンポジウム「凝固検査の課題と今後の展開」、[LC-MS/MS (質量分析装置)による臨床検査としての薬物濃度測定]、「POCTの精度管理、機器管理を探る～制度保証できていますか?～」の講演要旨、ならびに技術論文が掲載されている。

血清高比重リポタンパクコレステロール(HDL-C)はHDLが抗粥状動脈硬化能を有するため、脂質異常症診断基準の一つとして用いられている。しかしながら、HDL-Cは様々な種類の粒子であり、それぞれの機能が異なっているため、HDL-Cの量=抗粥状動脈硬化能でないことが明らかになってきた。大川先生の総説では、HDLの多様性につき、教室のデータを中心にわかりやすく記載されている。

抗凝固薬の進歩に伴い、凝固検査の重要性は高まっている。凝固検査値は治療方針を左右する上に、詳しい臨床医が少ないため、検査部門の役割は大きい。「凝固検査の課題と今後の展開」では、Turnaround time, 凝固波形解析, 抗リン脂質抗体

関連検査に関する最新情報を吸収していただきたい。

臨床検査領域では、質量分析装置は微生物の同定に広く用いられている。細菌同定に用いられているMALDI-TOF MASSとは異なり、LC-MSは薬物濃度を測定する際に有用である。「LC-MS (質量分析装置)による臨床検査としての薬物濃度測定」では、免疫抑制剤濃度測定の実際やLC-MS活用における世界の動向について知識が得られる。

POCTの精度管理をどうするかは、難しい問題である。「POCTの精度管理、機器管理を探る～精度保証できていますか?～」では、実態や課題について記載されており、大変参考になる。

髄液細胞検査における多項目自動血球分析装置の有用性、Rivaroxabanの凝固検査における活用、SARS-Cov-2検査の唾液検体処理、COVID-19検査における抗原定量検査に関する技術論文も日常検査に携わる我々にとって、すぐに役立つ内容である。

本号も、会員の皆様にとって有益な情報を提供できますことをうれしく思います。

(柳原克紀)

「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, 大川龍之介, 長田 誠, 上岡樹生, 小飼貴彦, 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2号 (通巻第275号)

2024年4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

制作 「医療検査と自動化」編集委員会

〒113-0033 東京都文京区本郷2-31-2

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

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

送付先変更等の手続きのご案内

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