

肺サーファクタントプロテインD測定試薬「ナノピア SP-D」の基礎的性能評価

Evaluation of surfactant protein D measuring reagent “Nanopia SP-D”

渡部芽以, 福島紘子, 大野一彦, 市村直也, 東田修二

要旨 積水メディカル株式会社で開発された肺サーファクタントプロテインD (SP-D) 測定試薬「ナノピア SP-D」の基礎的性能評価を行った。検討内容は併行精度, 室内再現精度, 正確性, 検出限界 (LoD: Limit of Detection), 定量限界 (LoQ: Limit of Quantitation), 希釈直線性, 特異性・選択性, 対照法との相関性, プロゾーン, オンボード安定性であり, 結果はいずれも概ね良好であった。従来SP-Dは測定可能な分析装置が限られていたが, 本試薬は汎用の自動分析装置で測定することができる。採血当日に結果を臨床に報告することができるため, 間質性肺炎の早期診断および治療への貢献が期待される。

Key words Interstitial lung disease, Surfactant protein D (SP-D), Nanopia SP-D

1. はじめに

肺サーファクタントプロテインD (Surfactant protein D: SP-D) は肺コレクチンに属する分泌型糖蛋白質であり, II型肺胞上皮細胞と細気管支領域に存在するクララ細胞から産生される¹⁾。SP-Dは肺内での自然免疫の調整作用や, 肺胞内腔の虚脱防止, 肺の換気能力維持などに働いているが, 上皮及び内皮細胞間関門が破壊されることにより血流に漏出すると考えられている。肺に極めて特異性が高く, 間質性肺疾患で高値を示す²⁾ため, その診断補助や予後予測因子としても有用であると考えられている。

間質性肺炎のマーカーとして他にKL-6が挙げられるが, KL-6よりもSP-Dの方が病変の早期から上昇するという報告がある³⁾。KL-6の分子量が5000 kDa以上, 分子径が200 nm以上であるのに対し, SP-Dの分子量は約500 kDa, 分子径は90~100 nmと, KL-6よりも小さい。この大きさの差がSP-Dの方が肺内から血中へ移行しやすい要因の一つと考えられている⁴⁾。

SP-Dの臨床的意義として, 間質性肺炎の存在診断,

間質性肺炎の早期診断, 特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) の予後予測, 抗線維化薬の治療効果予測などが挙げられる。IPFは最も予後の悪い特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonias: IIPs) の中でも最も頻度が高く, 慢性経過で高度な線維化, 不可逆性の蜂巣肺を形成する予後不良な疾患であり, 早期診断および治療が重要である。生存期間の中央値は約3年と報告されており⁵⁾, 日本のIPFの死因の4割は急性増悪であるという報告もある⁵⁾。SP-Dは間質性肺炎の急性増悪によっても上昇する⁶⁾ため, その診断補助としても使用されている。

しかし, SP-Dの測定が可能な分析装置は限られていたため, 当院でのSP-D測定は外部委託しており, 採血から結果報告までに2日程度を要していた。今般, 積水メディカル株式会社より汎用の自動分析装置での測定が可能な試薬「ナノピアSP-D」が開発されたことから, その基礎的検討を行い, 本試薬キットの有する性能を評価したので報告する。

Received Mar. 1, 2024; Accepted Apr. 18, 2024
Mei WATANABE, Hiroko FUKUSHIMA, Kazuhiko OHNO, Naoya ICHIMURA, Shuji TOHDA
東京科学大学病院検査部
Institute of Science Tokyo Hospital

〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45
1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan.
Corresponding author: 東田修二
TEL: 03-5803-5334
E-mail: tohda.mlab@tmd.ac.jp

2. 対象および検討試薬・機器

1) 対象

対象検体は、東京科学大学病院を受診し検査部に提出された検査終了後の患者血清の残余を用いた。なお、本研究は東京科学大学医学部倫理審査委員会の承認（M2022-328）を得て行った。

2) 検討試薬・機器

試薬はナノピアSP-D（積水メディカル株式会社）、機器はLABOSPECT 008 *a*（株式会社日立ハイテク）を用いた。性能評価のうち併行精度、室内再現精度、正確性、検出限界、定量限界、希釈直線性、特異性・選択性、対照法との相関性については、バリデーション算出用プログラム（Validation-Support/Excel Ver3.5、一般社団法人日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会）を用いて評価した。

3) 測定原理

検体中のSP-Dは、抗ヒトSP-Dマウスモノクローナル抗体感作ラテックスと抗原抗体反応を起こし、凝集を生じる。この凝集を吸光度変化として測定することにより、検体中のSP-D濃度を求める。

4) 対照法の試薬、測定原理および機器

試薬はCL SP-D「ヤマサ」NX（ミナリスメディカル株式会社）、測定原理は化学発光酵素免疫測定法、機器はCL-JACK NX（ミナリスメディカル株式会社）を用いた。

3. 方法

1) 併行精度

2濃度の精度管理用試料（ナノピア用SP-D/KL-6共通コントロールLevel I, Level II（積水メディカル株式会社））と患者血清を試料として用いて、20回連続測定した。測定値より変動係数(Coefficient of variation: CV)を算出し評価した。

2) 室内再現精度および試薬安定性

2濃度の精度管理用試料（ナノピア用SP-D/KL-6共通コントロールLevel I, Level II（積水メディカル株式会社））を試料として用いて、1日2回15日間測定した。測定値よりCVを算出し評価した。また初日の測定平均値に対する各測定日の測定平均値の割合を算出し評価した。

3) 正確性

濃度既知試料を連続10回測定し、平均値の95%信頼区間に表示値が含まれているか評価した。SP-Dは常用参照標準物質がないため、血清に市販SP-D抗原を添加し作製した3濃度の既知濃度試料

（積水メディカル株式会社より提供）を使用した。

4) 検出限界（Limit of Detection: LoD）

ブランク上限（Limit of Blank: LoB）は生理食塩水を1日12回5日間測定し、LoDは低濃度検体を生理食塩水で希釈して6濃度の試料を作製し、それぞれを1日2回5日間測定した。得られた測定値をノンパラメトリック法にて評価した。

5) 定量限界（Limit of Quantitation: LoQ）

低濃度検体を生理食塩水で希釈して6濃度の試料を作製し、1日2回5日間測定した。測定値のCV10%点をLoQとして算出し評価した。

6) 希釈直線性

高濃度検体を生理食塩水で10段階希釈し、それぞれ3重測定を行った。

7) 特異性・選択性

患者プール血清に干渉チェックAプラス（シスメックス株式会社）、干渉チェックRFプラス（シスメックス株式会社）を用いて共存物質（ビリルビンC, ビリルビンF, ヘモグロビン, 乳び, リウマトイド因子）の影響を検討し、変化率10%以内を影響なしと判定した。各共存物質未添加時の患者プール血清SP-D値はそれぞれ、76.4 ng/mL（ビリルビンC）、76.1 ng/mL（ビリルビンF）、76.5 ng/mL（ヘモグロビン）、69.0 ng/mL（乳び）、85.0 ng/mL（リウマトイド因子）であった。

8) 対照法との相関性

検討試薬と対照法であるCL SP-D「ヤマサ」NX（ミナリスメディカル株式会社）で血清検体110例をそれぞれ測定し、相関性を標準主軸回帰にて評価した。

9) プロゾーン

高濃度試料（10,000 ng/mL）を生理食塩水で2ⁿ段階希釈し、それぞれ3重測定を行った。

4. 成績

1) 併行精度

各試料のCVは0.6~1.2%であった（Table 1）。

2) 室内再現精度および試薬安定性

各試料のCVは1.0~1.2%であった（Table 1）。また初日測定値に対する各測定日の測定値の変動率はいずれも±5%以内であった（Fig. 1）。

3) 正確性

測定した3濃度の濃度既知試料は、いずれも平均値の95%信頼区間に表示値が含まれていた（Table 2）。

4) 検出限界（LoD）

LoBは4.1 ng/mL, LoDは6.4 ng/mLであった。

Table 1 Repeatability and intermediate precision

		Control Level I	Control Level II	Pooled serum
Repeatability	N	20	20	20
	Mean (ng/mL)	79.7	303.2	95.9
	SD	0.95	1.80	0.86
	CV (%)	1.2	0.6	0.9
Intermediate precision	N	30	30	
	Mean (ng/mL)	78.7	300.3	
	SD	0.98	3.00	
	CV (%)	1.2	1.0	

Table 2 Accuracy evaluation

	Sample1	Sample2	Sample3
Indicated Value	84.4	230.1	787.1
N	10	10	10
Mean (ng/mL)	82.7	228.3	784.7
SD	1.3	4.6	11.4
CV(%)	1.5	2.0	1.5
95% Confidence interval	77.1 - 88.3	201.7 - 255.0	729.7 - 839.6

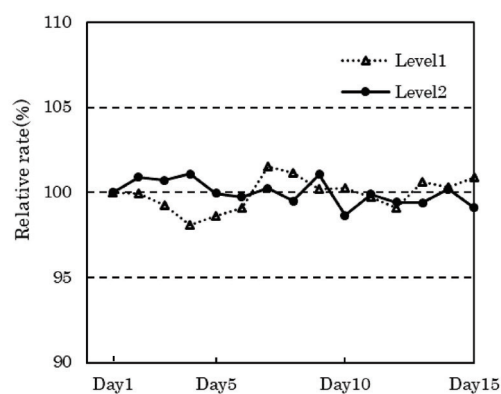


Fig. 1 Reagent stability on-board

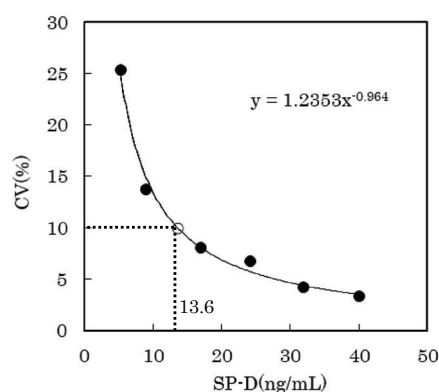


Fig. 2 Limit of quantitation

5) 定量限界 (LoQ)

LoQは13.6 ng/mLであった (Fig. 2)。

6) 希釈直線性

942.4 ng/mLまで直線性を認めた (Fig. 3)。

7) 特異性・選択性

ビリルビンCは20.0 mg/dLまで、ビリルビンFは20.0 mg/dLまで、ヘモグロビンは500 mg/dLまで、乳びは2,000ホルマジン濁度まで、リウマトイド因子は500 IU/mLまで影響を認めなかった (Fig. 4)。

8) 対照法との相関性

患者血清検体110例において対照法であるCL SP-D「ヤマサ」NXをx, ナノピアSP-Dをyとした

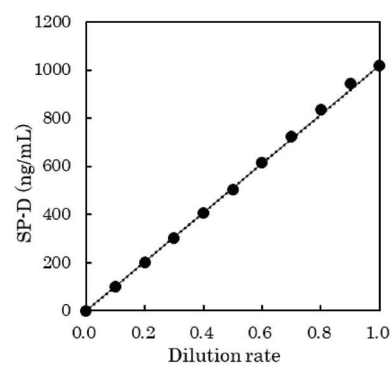


Fig. 3 Dilution linearity

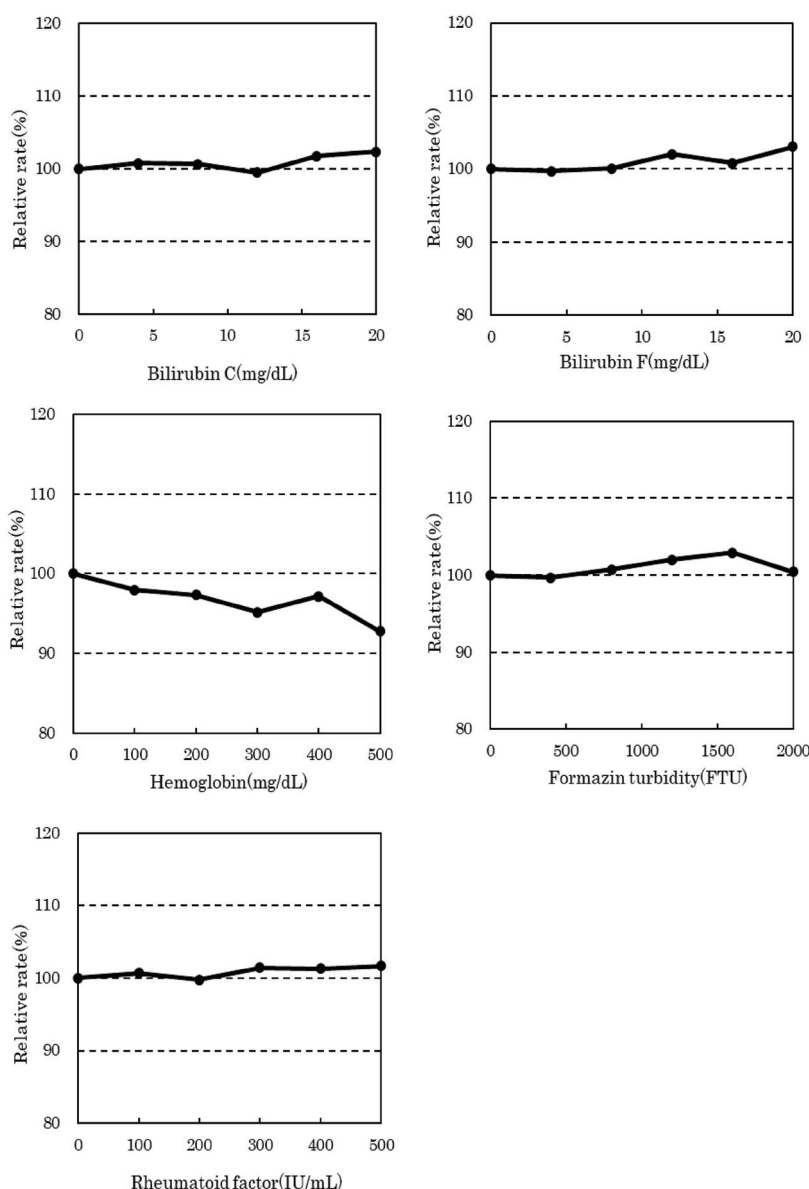


Fig. 4 Effects of interfering substances on SP-D measurement

とき、回帰式は $y = 0.983x + 11.2$ ($r = 0.993$)となった (Fig. 5)。

9) プロゾーン

1,114.8 ng/mLまではプロゾーンを認めず、理論濃度2,500 ng/mLの試料測定時にプロゾーンエラーが発生した。(Fig. 6)。

5. 考察

積水メディカル株式会社が開発されたSP-D測定試薬「ナノピア SP-D」の基礎的性能評価を行った。併行精度および室内再現精度は全ての試料において

CVが2%未満となり、良好な結果を認めた。正確性においては、測定した3濃度の濃度既知試料はいずれも平均値の95%信頼区間内に表示値が含まれており、良好な結果を認めた。また、試薬開封後より15日間測定値が安定していることを確認した。

健常成人(20~80歳)の血清SP-D濃度は平均 49.0 ± 30.4 ng/mL^{6),7)}、カットオフ値は109.8 ng/mL⁸⁾である。検出限界、定量限界はそれぞれ6.4 ng/mL、13.6 ng/mLとカットオフ値よりも大幅に低い値となり、患者血清中のSP-Dの定量に十分な性能を有していた。

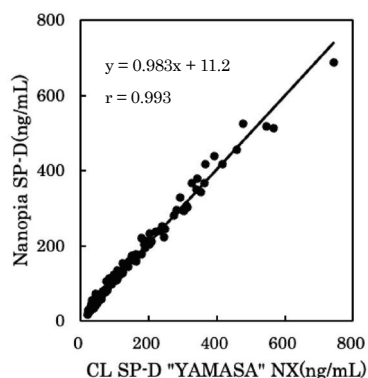


Fig. 5 Correlation between Nanopia SP-D and CL SP-D "YAMASA" NX

希釈直線性の上限は942.4 ng/mLとなり、また1,114.8 ng/mLまでプロゾーンを認めなかった。今回使用した自動分析装置LABOSPECT 008 aは、反応タイムコースの形状から測定上限を超えた値やプロゾーンをエラーとして検知することができる。当院ではSP-Dの測定を年間に約8,400件外部委託しているが、そのうち942.4 ng/mLを超えた検体は約20件であり、測定超過検体やプロゾーン検体が現れたとしても希釈再検をすることで十分対応可能と考えられる。

特異性・選択性において、ナノピアSP-Dの添付文書に記載されているよりも高い濃度まで干渉物質を添加し検討したところ、良好な結果が得られた。（添付文書の記載はビリルビンCは20.0 mg/dLまで、ビリルビンFは16.0 mg/dLまで、ヘモグロビンは300 mg/dLまで、乳びは2000ホルマジン濁度まで、リウマトイド因子は200 IU/mLまで影響なし）ヘモグロビン濃度依存的に負誤差となる傾向を認めたが、いずれも測定値変化率は±10%以内に収まった。健常人のSP-D濃度が平均 49.0 ± 30.4 ng/ml^(6,7)であるのに対しカットオフ値は109.8 ng/mL⁽⁸⁾と優位に高く、IIPs患者の急性増悪時のSP-D濃度は平均302 ng/mlから1,263 ng/mlと著しい上昇を示す⁽⁸⁾。よって±10%以内の影響であれば間質性肺炎の治療方針に影響はないと思われるが、ヘモグロビン濃度500 mg/dLを超える強溶血検体には注意が必要である。

対照法との相関性において、対照法であるCL SP-D「ヤマサ」NXをx、ナノピアSP-Dをyとしたとき、回帰式は $y = 0.983x + 11.2$ ($r = 0.993$)となり強い相関を認めた。切片は+11.2となったが、先に示した通り間質性肺炎の治療方針に影響のない値

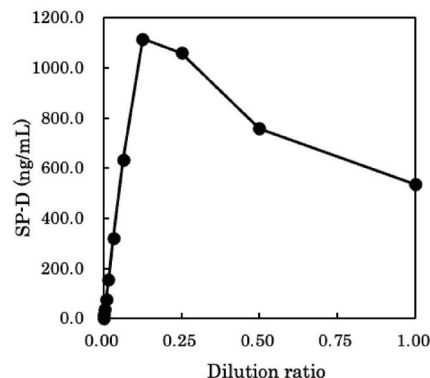


Fig. 6 Prozone phenomenon analysis

と考えられる。

6. 結論

SP-D測定試薬「ナノピア SP-D」の基礎的性能は概ね良好であった。また、既存法のCL SP-D「ヤマサ」NXと良好な相関を示した。本試薬の使用により、SP-Dを汎用の自動分析装置で測定することが可能となるため、間質性肺炎の早期診断および治療への貢献が期待される。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業である積水メディカル株式会社より以下の試験材料の提供を受けた。

- ・SP-D測定試薬「ナノピア SP-D」
- ・ナノピア用SP-D/KL-6共通コントロールLevel I, Level II
- ・ナノピア用SP-D/KL-6共通キャリブレーター
- ・干渉チェックAプラス
- ・干渉チェックRFプラス

文 献

- 1) 大成洋二郎, 服部登, 河野修興. I.新しい検査の意義と使い方 4. KL-6とSP-D. 日本内科学会雑誌 2007;96(10):2144-2150.
- 2) Honda Y, Kuroki Y, Matsuura E, et al. Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:1860-1866.
- 3) 大塚満雄, 高橋弘毅, 藤嶋卓哉ほか. 肺特異的血清マーカーの経時的測定が治療効果の判定に有用と思われた間質性肺炎の一例. 日呼吸会誌

- 2001;39(4):298-302.
- 4) 高橋弘毅, 白鳥正典, 千葉弘文. 病態からとらえた血清マーカー乖離の解釈. 分子呼吸器病 2006;10(2):111-116.
- 5) Natsuizaka M, Chiba H, Kuronuma K, et al. Epidemiologic survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences. Am J Respir Crit Care Med 2014;190(7):773-779.
- 6) Nagae H, Takahashi H, Kuroki Y, et al. Enzymelinked immunosorbent assay using F(ab')₂ fragment for the detection of human pulmonary surfactant D in sera. Clin Chim Acta 1997;266:157-171.
- 7) 阿部庄作, 高橋弘毅. 特発性間質性肺炎における肺サーファクタント蛋白質の動態と活動性の指標. 内科1996;77:664-666.
- 8) 阿部庄作, 高橋弘毅. 間質性肺炎のバイオマーカーとしての肺サーファクタント蛋白質. 日呼吸会誌 2000;38(3):157-165.