

## シアル化糖鎖抗原KL-6測定試薬 「AIA-パックCL KL-6」の基礎的検討

Evaluation of a sialylated carbohydrate antigen KL-6 assay kit,  
“CL AIA-PACK KL-6”

藤村博和<sup>1)</sup>, 湯本浩史<sup>1)</sup>, 山下朋子<sup>1)</sup>, 辰巳翔基<sup>1)</sup>, 篠原絵里<sup>1)</sup>, 池本敏行<sup>1)</sup>, 九嶋亮治<sup>1)</sup>

**要旨** シアル化糖鎖抗原KL-6測定試薬AIA-パックCL KL-6の基礎的検討を行った。併行精度は変動係数が1.8~2.2%, 検出限界は8.7 U/mLで2,122 U/mLまで良好な直線性を認めた。試薬の安定性は冷蔵保存で15日まで変化を認めず, 干渉物質の影響はすべての項目で影響を認めなかった。血漿検体(y)と血清検体(x)の相関係数は,  $r = 0.992$ , 回帰式 $y = 0.93x + 5.9$ と良好であった。化学発光酵素免疫測定法を測定原理とするAIA-パックCL KL-6(y)とラテックス免疫比濁法を測定原理とするナノピア KL-6(x)による相関係数は,  $r = 0.947$ , 回帰式 $y = 1.12x - 10.0$ と良好であった。AIA-パックCL KL-6の基礎的性能は良好であり, 日常検査に有用な測定試薬である。

**Key words** sialylated carbohydrate antigen KL-6, AIA-CL2400, CLEIA

### はじめに

シアル可糖鎖抗原 KL-6 (sialylated carbohydrate antigen KL-6: KL-6) は, 肺のII型肺胞上皮細胞等に発現する分子量100万以上の巨大分子で, ムチンMUC1ファミリーに属するシアル化糖鎖抗原である<sup>1)</sup>。KL-6に対するモノクローナル抗体は, 1895年河野ら<sup>2)</sup>がヒト肺腺癌由来細胞株をマウスに免疫して作製された。健常者および肺炎や肺気腫等の間質性肺炎疾患患者を対象とした研究により, 間質性肺炎を診断するための血清KL-6の臨床的カットオフ値は500 U/mLが適当とされている<sup>3)</sup>。このカットオフ値を用いた場合, 特発性間質性肺炎や膠原病関連肺炎, 薬剤性肺炎では70%以上の症例でKL-6陽性となるが, 健常者や気管支喘息, 慢性閉塞性肺疾患の症例では陽性となる率は極めて低い<sup>2,4)</sup>。また, 血清中のKL-6値は肺胞腔内線維化や肺胞虚脱の所見を反映し, 病勢把握や治療効果の判定にも有用で

ある。間質性肺炎のマーカーとして肺コレクチンに属する糖蛋白である肺サーファクタント蛋白AおよびDもあるが, これらが分泌型蛋白質であるのに対しKL-6は細胞膜構成蛋白質であり, 疾患や重症度によって反応性に違いのあることが報告されている<sup>5)</sup>。

積水メディカル株式会社が開発したモノテスト凍結乾燥試薬KL-6測定キット「AIA-パックCL KL-6」の基礎的性能を評価する機会を得た。一般的に, 液状試薬では試薬が残っていても開封後一定の期間を過ぎると廃棄せざるを得ない。そのため, 検査依頼が少ない場合はコストの面から院内測定が困難となる可能性がある。一方, モノテスト凍結乾燥試薬は有効期限が長く, 試薬包装が単回使用であるため検体数が少ない施設でも無駄なく使用することができ, 施設の状況に合わせた柔軟な運用が可能となる。その結果を報告する。

Received Jan. 9, 2024; Accepted Jun. 3, 2024

Hirokazu FUJIMURA<sup>1)</sup>, Hirofumi YUMOTO<sup>1)</sup>, Tomoko YAMASHITA<sup>1)</sup>, Shouki TATSUMI<sup>1)</sup>, Eri SHINOHARA<sup>1)</sup>, Toshiyuki IKEMOTO<sup>1)</sup>, Ryouji KUSHIMA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>滋賀医科大学医学部附属病院 検査部

Department of Clinical Laboratory Medicine, Shiga

University of Medical Science Hospital

〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町

Setatukinowacho, Outu-shi, Shiga 520-2192

Corresponding author: 藤村博和

TEL: 077-548-2111

E-mail: fujimu@belle.shiga-med.ac.jp

## 1. 対象および方法

### 1) 対象

本研究は2021年10月27日から2022年2月28日までの期間に、当院検査部にKL-6測定依頼のあった患者の残余検体を用いた。なお、本研究は滋賀医科大学倫理審査委員会の承認を得て実施した（受付番号：R2021-122）。

### 2) 試薬および装置

化学発光酵素免疫測定法を測定原理とするAIA-パック CL KL-6（積水メディカル株式会社）は全自動化学発光酵素免疫測定装置AIA-CL2400（東ソー株式会社）で測定した。対照試薬としてラテックス免疫比濁法を原理とするナノピア KL-6（積水メディカル株式会社）を用い、JCA-BM6070自動分析装置（日本電子株式会社）で測定した。

### 3) 測定原理

本試薬は、抗KL-6マウスモノクローナル抗体を用いた2ステップサンドイッチCLEIAを測定原理としている。

### 4) 検討項目

#### (1) 併行精度

2濃度のプール血清をAIA-パック CL KL-6試薬でそれぞれ10回連続測定し、得られた測定値の平均値、標準偏差（Standard deviation: SD）および変動係数（Coefficient of variation: CV）を算出した。

#### (2) 検体の冷蔵保存安定性

3濃度のプール血清を冷蔵（2～8℃）で保存、保存当日、1日後、8日後および15日後にそれぞれ1回測定し、変動を冷蔵保存当日の測定値に対する相対値（%）として示した。それぞれの検体における測定値の変動を相対変化率として評価し、±10%以内は問題なしと判断した。

#### (3) 希釈直線性

2濃度のプール血清を生理食塩水で10段階希釈し、AIA-パック CL KL-6試薬でそれぞれ3重測定し希釈直線性を確認した。

#### (4) 検出限界（Limit of detection: LOD）

生理食塩水で6段階希釈したプール血清およびブランク試料（生理食塩水）を、AIA-パック CL KL-6試薬でそれぞれ10回測定し、2.6SD法によりLODを求めた。

#### (5) 干渉物質の影響

複数回の機会に分けて検討し、KL-6が235～263 U/mLのプール血清を低値域検体として、2300～2544 U/mLのプール血清を高値域検体としてそれぞれに干渉チェック・Aプラス（シスメックス株式

会社）を添加し、遊離型ビリルビン（以下、ビリルビンF）、抱合型ビリルビン（以下、ビリルビンC）、溶血ヘモグロビン（以下、Hb）、乳びの影響を検討した。リウマトイド因子（以下、RF）の影響の検討には干渉チェック・RFプラス（シスメックス株式会社）を用いた。干渉物質の影響は、干渉物質非添加時の測定値に対する干渉物質添加時の測定値の変動率（%）として算出した。

#### (6) 相関性

①AIA-パック CL KL-6（y）とナノピア KL-6（x）による測定値の相関性

患者血清検体204例を検討試薬（AIA-パック CL KL-6）と対照試薬（ナノピア KL-6）でそれぞれ測定し、相関係数および標準主軸回帰により回帰直線の傾きならびに切片を算出した。

②AIA-パック CL KL-6による血漿検体（y）、血清検体（x）のKL-6測定値の相関性

同時に採取した患者50例の血清検体および血漿（ヘパリンリチウム）検体のKL-6を測定し、相関係数および回帰直線の傾きと切片を算出した。

なお、解析ソフトはJMP<sup>®</sup> pro 17を使用し、相関係数の解析にはKendallの順位相関係数を使用した。

#### (7) 希釈試験による乖離検体の検証

AIA-パック CL KL-6とナノピア KL-6の測定値間で乖離が認められた1検体を2倍、5倍および10倍希釈し、それぞれの試薬でKL-6を測定し相対値を求めた。乖離検体は対照試薬測定値の±20%外の検体を対象とした。

## 2. 結果

#### (1) 併行精度

2濃度のKL-6濃度既知検体を10回同時に測定した場合のCVは1.8%および2.2%であった（Table 1）。

#### (2) 検体の冷蔵保存安定性

3濃度のKL-6濃度既知検体を冷蔵保存した場合の相対値は、検体1は101.9～104.5%、検体2は97.6～103.0%、検体3は90.8～94.4%であった（Table 2）。いずれの検体も相対値は±10%以内であり測定値に影響は認めなかった。

#### (3) 希釈直線性

AIA-パック CL KL-6によるKL-6濃度測定は、低値域（理論値 310 U/mL）から高値域（理論値 2122 U/mL）まで直線性を示した（Fig. 1）。

#### (4) 検出限界（Limit of detection: LOD）

AIA-パック CL KL-6の検出限界は、2.6SD法により8.7 U/mLであった（Fig. 2）。

Table 1 Repeatability

	Sample1	Sample2
mean (U/mL)	462	1103
SD	8.3	24.0
CV (%)	1.8	2.2
min (U/mL)	443	1070
MAX (U/mL)	472	1140
Range (U/mL)	29	70

(n=10)

Table 2 Sample stability

		0-day	1-day	8-day	15-day
Sample1	KL-6 (U/mL)	3899	3973	4075	3972
	Relative value (%)	100.0	101.9	104.5	101.9
Sample2	KL-6 (U/mL)	1231	1202	1267	1251
	Relative value (%)	100.0	97.6	103.0	101.7
Sample3	KL-6 (U/mL)	660	599	623	610
	Relative value (%)	100.0	90.8	94.4	92.5

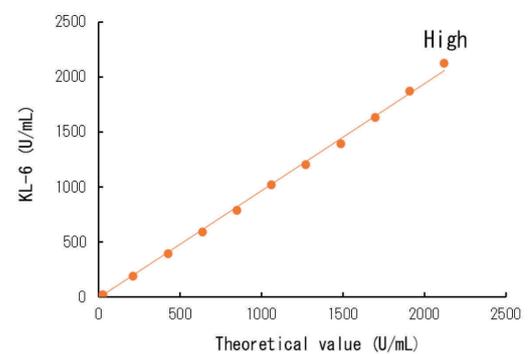
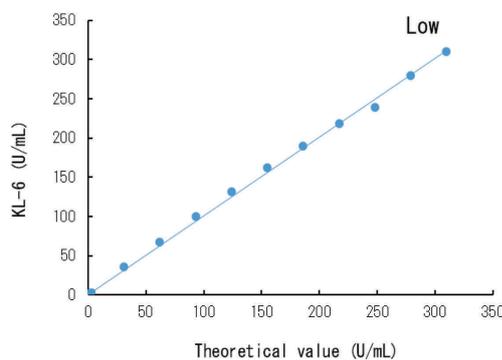


Fig. 1 Dilution linearity

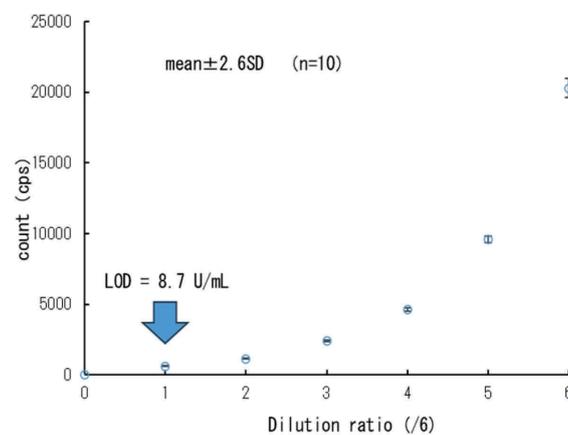


Fig. 2 Limit of detection

(5) 干渉物質の影響

AIA-パック CL KL-6によるKL-6濃度測定は、ビリルビンCは20.2 mg/dLまで、ビリルビンFは20.1 mg/dLまで、Hbは450 mg/dLまで、乳びは1770ホルマジン濁度まで、RFは550 IU/mLまで影響を認めなかった (Fig. 3)。

(6) 相関性

① AIA-パック CL KL-6 (y) とナノピア KL-6 (x) による測定値の相関性

Passing-Bablok法を用いて算出した回帰式は  $y = 1.12x - 10.0$ 、相関係数  $r = 0.947$ であった (Fig. 4-1)。

② AIA-パック CL KL-6による血漿検体 (y) および血清検体 (x) のKL-6測定

Passing-Bablok法を用いて算出した回帰式は  $y =$

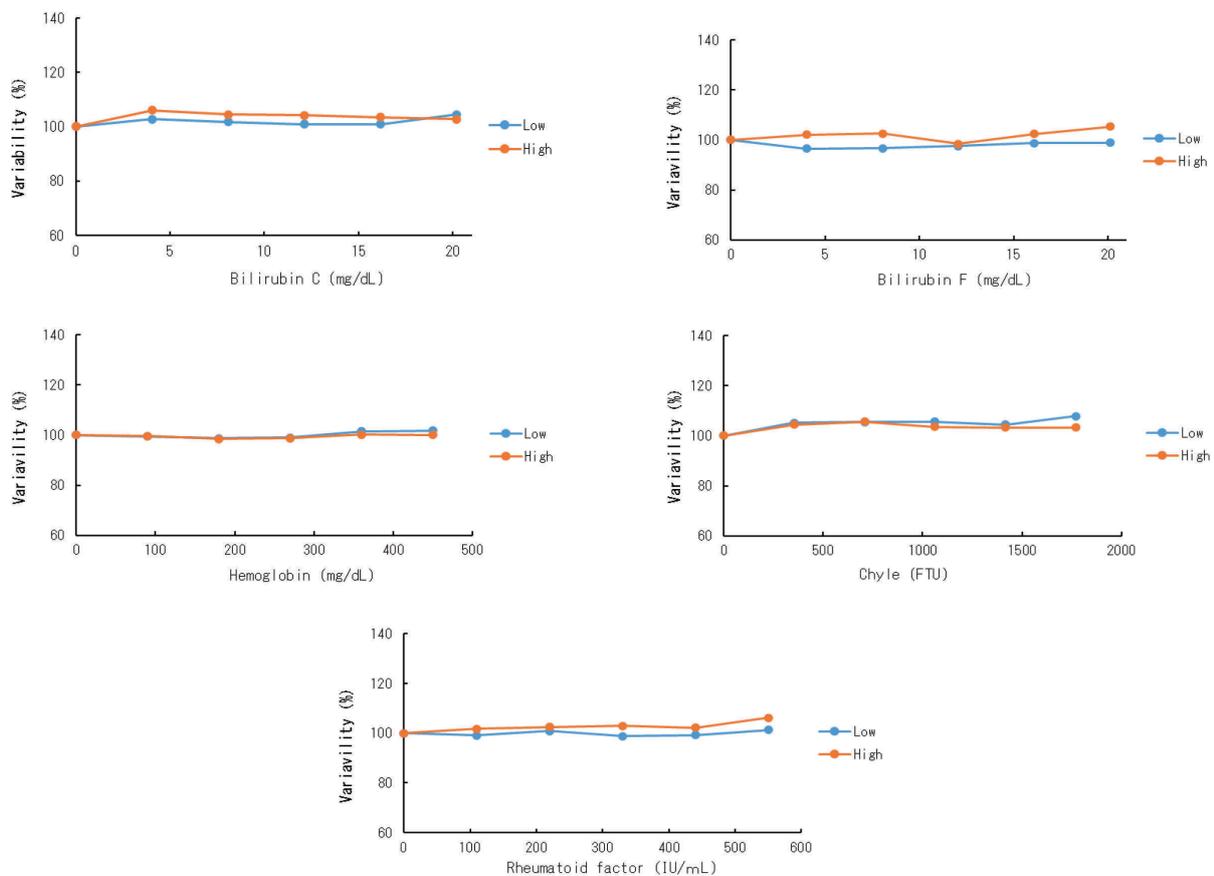


Fig. 3 Effect of interfering substances on KL-6 assay

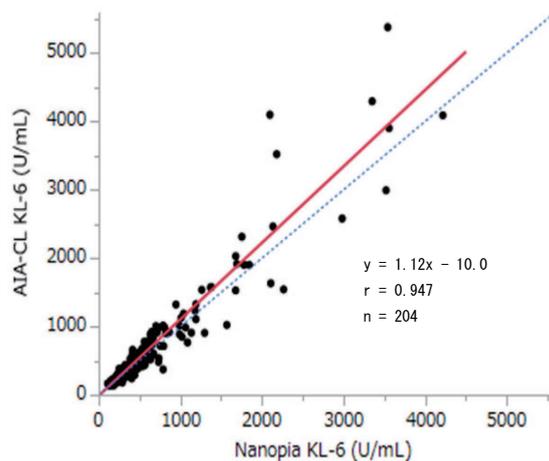


Fig. 4-1 Correlation between KL-6 by Nanopia and AIApackCL

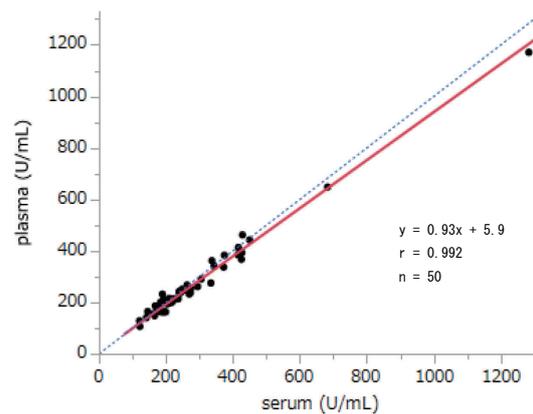


Fig. 4-2 Correlation between serum and plasma

0.93x + 5.9, 相関係数  $r = 0.992$ であった (Fig. 4-2)。

(7) 希釈試験による乖離検体の検証

AIA-バック CL KL-6とナノピア KL-6の測定値間に乖離を認めた1検体について、希釈回収試験を

実施した結果、相対値はAIA-バック CL KL-6で89.9~99.9%，ナノピア KL-6で93.2~99.0%であった (Table 3)。

Table 3 Verification with diluted testing of discrepancy sample

Dilution ratio	AIA-packCL KL-6			Nanopia KL-6		
	KL-6 (U/mL)	Theoretical Value (U/mL)	Recovery rate (%)	KL-6 (U/mL)	Theoretical Value (U/mL)	Recovery rate (%)
-	5375	5375	100.0	3540	3540	100.0
1/2	2648	2688	99.9	1752	1770	99.0
1/5	1017	1075	94.6	694	708	98.0
1/10	483	538	89.8	330	354	93.2

### 3. 考察

AIA-パックCL KL-6の併行精度は2.2%以下と良好であった。検体安定性は3濃度のKL-6濃度既知検体を冷蔵保存した場合、保存15日後まで安定であった。検出限界は8.7 U/mLであり、2000 U/mLを超える範囲まで良好な直線性を示した。さらに、干渉物質の影響については、全ての項目で検討した濃度範囲では測定値への影響は認められなかった。以上のことから、AIA-パックCL KL-6は、高い精度と特異性を有するKL-6測定試薬であると考えられた。ラテックス免疫比濁法を測定原理とするナノピア KL-6とは、相関係数0.947、回帰式 $y = 1.12x - 10.0$ と良好な相関性を示したことより、AIA-パックCL KL-6は間質性肺炎等の診断に十分使用可能であると考えられた<sup>7)</sup>。また、血清検体と血漿検体の測定値については相関係数0.992および回帰式 $y = 0.93x + 5.9$ と良好で、血清あるいは血漿検体どちらでも測定可能であり、ナノピア KL-6と同様に利便性の高い測定試薬である。

AIA-パックCL KL-6はAIA-CL2400専用であり、モノテスト凍結乾燥試薬であるため試薬管理が容易で試薬のロスもないことから検体数の少ない施設でも使用できる。また、検体の希釈、試薬の溶解、測定までがすべて自動であり、AIA-パックCL KL-6は高いユーザビリティを有している<sup>6)</sup>。さらに結果報告時間も15分と短く迅速性にも優れている。

### 4. まとめ

化学発光酵素免疫測定法を測定原理とする「AIA-パックCL KL-6」の基礎的検討を行った。併行精度、検出限界、希釈直線性はすべて良好であった。また、既存の測定試薬ならびに血清・血漿間の相関性も良好であった。

本論文の要旨は、日本医療検査科学会第54回大会（2022神戸）で発表した。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

### 文献

- 1) Kohno N, Akiyama M, Kyoizumi S, et al. Detection of soluble tumor-associated antigens in sera and effusions using novel monoclonal antibodies, KL-3 and KL-6, against lung adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 1988;18:203-216
- 2) 河野修興. KL-6. *呼吸* 1997;16:391~397
- 3) 北村諭, 日和田邦男, 小林淳, ほか. ED046による間質性肺炎症例の血清KL-6値の検討. *日胸疾会誌* 1996;34:639-645
- 4) Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, et al. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respir Investig* 2012;50:3-13
- 5) 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;96:2144-2150
- 6) 丸尾直子. 化学発光酵素免疫測定法を原理とした新システム「AIA-CLシステム」について. *生物試料分析* 2016;Vol. 39, No 4:250-255
- 7) 河野修興, 日和田邦男, 小林淳, ほか. 電気化学発光免疫測定法によるKL-6測定キットED066の間質性肺炎に対する診断能. *臨床と研究*, 1998;75:1167-1172