

ラテックス免疫比濁法測定試薬「ナノピア SP-D」の性能評価

Analytical Evaluation of the Novel Surfactant Protein-D Measurement Kit
“Nanopia SP-D” Based on a Latex Immunoturbidimetric Assay早坂美香¹⁾, 小木曾葉摘¹⁾, 鳴海武長¹⁾, 渡部百合子²⁾, 加藤政利¹⁾,
遠藤育子³⁾, 金子朋広⁴⁾

要旨 ラテックス免疫比濁法を測定原理としたSP-D測定試薬「ナノピア SP-D」の基礎性能評価を行い、精密度、試薬の安定性などはいずれも良好であった。本試薬による血清・血漿検体の相関は良好で（回帰式 $y=0.996x+3.12$, 相関係数 $r=0.997$ ）、血清検体での従来法との相関は乖離検体を2件認めたが良好であった（回帰式 $y=0.927x+19.89$, 相関係数 $r=0.983$ ）。またKL-6との相関は、回帰式 $y=0.106x+101.85$, 相関係数 $r=0.420$ と相関性は低かった。以上より、基礎性能は良好であり、血清・血漿検体での検査が可能な本試薬は日常検査に有用と考えられた。

Key words ナノピア SP-D, 間質性肺炎, ラテックス免疫比濁法

1. はじめに

サーファクタント蛋白質（Surfactant protein: SP）-Dは肺コレクチンに属する分泌型糖蛋白質で、分子量43-kDaの蛋白質が12量体を形成した十字架様構造をとる。SP-Dは主にII型肺胞上皮細胞に発現し、細気管支を中心に局在するクララ細胞にも発現する。SP-Dは肺の自然免疫を担い、血中SP-Dは、特発性間質性肺炎（idiopathic interstitial pneumonia: IIPs）、急性呼吸窮迫症候群、過敏性肺炎や膠原病肺で高値となるが、特に間質性肺炎（interstitial

pneumonia: IP）において疾患特異性が高く、保険診療上、同時測定は認められていないもののKrebs von den Lungen-6（KL-6）と共に間質性肺炎の診断や疾患活動性の指標のみならず、予後予測因子として有用な血清バイオマーカーとして広く用いられ、厚生労働省のびまん性肺疾患研究班によるIIPsの臨床診断基準の主要項目の一つである。更に、血中SP-D濃度は、間質性肺炎の高分解能CT画像において、肺葉の収縮による牽引性気管支拡張を伴う濃い肺葉濃度上昇所見との関連が認められており、間質性肺炎による病理組織学的変化を示唆する指標と考

Received Nov. 28, 2024; Accepted Feb. 26, 2025
Mika HAYASAKA¹⁾, Natsumi OGISO¹⁾,
Takenobu NARUMI¹⁾, Yuriko WATANABE²⁾,
Masatoshi KATO¹⁾, Ikuko ENDOH³⁾,
Tomohiro KANEKO⁴⁾

¹⁾ 日本医科大学多摩永山病院 中央検査室
Department of Clinical Laboratory Nippon Medical
School Tama Nagayama Hospital
〒206-8512 東京都多摩市永山1-7-1
1-7-1, Nagayama, Tama-shi, Tokyo 206-8512, Japan

²⁾ 日本医科大学武蔵小杉病院 中央検査室
Department of Clinical Laboratory Nippon Medical
School Musashikosugi Hospital
〒211-8533 神奈川県川崎市中原区小杉町1-383
1-383, Kosugi-machi, Nakahara-ku, Kawasaki-shi,
Kanagawa 211-8533, Japan

³⁾ 日本医科大学多摩永山病院 循環器内科
Department of Cardiovascular Medicine Nippon
Medical School Tama Nagayama Hospital
〒206-8512 東京都多摩市永山1-7-1
1-7-1, Nagayama, Tama-shi, Tokyo 206-8512, Japan

⁴⁾ 日本医科大学多摩永山病院 腎臓内科
Department of Nephrology Nippon Medical School
Tama Nagayama Hospital
〒206-8512 東京都多摩市永山1-7-1
1-7-1, Nagayama, Tama-shi, Tokyo 206-8512, Japan
Corresponding author（連絡責任者）：遠藤育子
TEL: 042-371-2111
E-mail: ikuko@nms.ac.jp

えられる¹⁾。

これまで、SP-Dの測定には化学発光酵素免疫測定法 (chemiluminescent enzyme immunoassay: CLEIA) を測定原理とした試薬が用いられてきたため、その測定には専用装置が必要であった。2023年7月に積水メディカル株式会社より新たにラテックス免疫比濁法を測定原理とした測定試薬「ナノピアSP-D (以下nSP-D)」が発売され、生化学汎用自動分析装置に適応し迅速な結果報告が可能となった。ラテックス免疫比濁法は、抗体あるいは抗原を固相化したラテックス粒子を使用し、液相中で生じた抗原抗体反応によるラテックス凝集塊を透過光により吸光度変化として自動分析装置で計測することで、あらかじめ作成した検量線により分析値を求める。これまで、ラテックス免疫比濁法を用いたKL-6やクレアチンキナーゼMB分画測定試薬が開発されており、いずれもCLEIA法や電気化学発光免疫測定法との良好な相関が報告され、臨床応用されている^{2),3)}。

今回、新規発売されたnSP-Dが緊急検査や診察前検査などの迅速検査に有用であるかを評価するために、本試薬の基礎性能並びに患者検体を用いた血清と血漿検体の相関、従来法との相関を評価し臨床的有用性について検討を行った。また、血中SP-D・KL-6濃度はいずれも間質性肺炎のマーカーとして日常診療に用いられるものの、特に予後予測の指標としては単独ではなく両マーカーを用いた評価が有用であり、両者の乖離例も報告されている為、nSP-DとKL-6の相関性も併せて検討したので報告する。

2. 対象および方法

1) 対象

日本医科大学多摩永山病院で血中SP-Dが測定された患者血清、及び同患者の血漿検体 (血清110例、血漿108例) を用いた。尚、本研究は日本医科大学多摩永山病院倫理委員会の承認 (F-2023-080) を得て施行された。

2) 試薬及び測定機器

検討試薬はnSP-Dを使用し、日立自動分析装置LABOSPCT008 *a* (株式会社日立ハイテク) にて測定した。対照試薬は「CL SP-D「ヤマサ」NX (ヤマサ醤油株式会社: 以下ySP-D)」を使用し、測定機器はCL-JACK NX (ミナリスメディカル株式会社) にて測定した。更に、従来からの間質性肺炎のマーカーであるKL-6 (測定試薬は「ナノピアKL-6 (積水メディカル株式会社)」, 測定機器は日立自動分析装置LABOSPCT008 *a* (株式会社日立ハイテ

ク) との相関を検討した。尚、nSP-Dによる測定は、添付文書に従い血漿・血清検体を冷蔵保存し採取後7日以内に測定を施行した。従来法によるSP-D測定は、血清検体を冷蔵保存し採取後3日以内に測定し、KL-6は血清検体を用いて採取同日に測定した。

3) 測定条件

測定条件はメーカーの推奨する分析パラメーター (検体量: 3.8 μ L, 第1試薬: 90 μ L, 第2試薬: 30 μ L, 測定波長: 主波長570 nm・副波長800 nm, 分析法: 2ポイントエンド, キャリブレーション法: スプライン) に準拠した。

4) 結果の解析

各結果の解析には日本臨床化学会が提供しているバリデーション算出用プログラムValidation-Support-V63を参考にした。

3. 検討方法および成績

1) 併行精度・室内再現精度

ナノピアSP-D/KL-6共通コントロール (積水メディカル株式会社) 2濃度 (低濃度 Level I, 高濃度 Level II) とプール血清を20回連続測定し、平均値、標準偏差 (SD), 変動係数 (CV) を求め、併行精度を確認した。その結果, CVは0.98~1.96%と良好であった (Table 1A)。また同様の試料を用い、初回キャリブレーション後連続10日間、1日2回測定し、室内再現精度を確認した。その結果, CVは0.75~1.89%と良好であった (Table 1B)。

2) 希釈直線性

1100 ng/mLのSP-D高濃度試料を生理食塩水にて10段階希釈し、生理食塩水を含む11試料に対し各々3重測定を行い、希釈直線性を確認した。分散分析法を用いて、F検定を施行し有意確率を求めたところ、有意差は認めず、1085.5 ng/mLまで直線性が認められた (Fig. 1)。

Table 1 Repeatability (A) and Intermediate precision (B) of nSP-D measurements

SD: standard deviation. CV: coefficient of variation

(A) Repeatability			
	Level I	Level II	pooled serum
Mean (ng/mL)	79.37	309.73	157.38
SD (ng/mL)	1.55	3.05	1.73
CV (%)	1.96	0.98	1.10
(B) Intermediate precision			
	Level I	Level II	pooled serum
Mean (ng/mL)	82.45	322.65	160.45
SD (ng/mL)	1.55	5.26	1.20
CV (%)	1.89	1.63	0.75

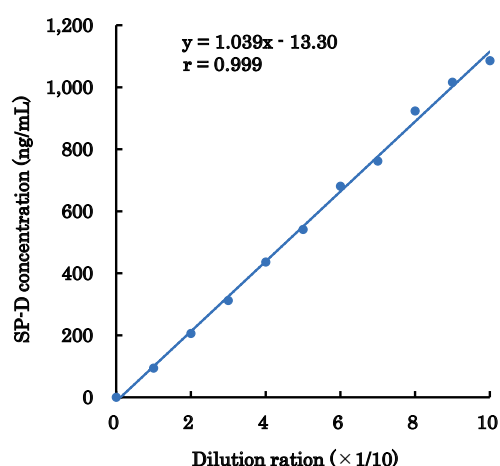


Fig. 1 Dilution linearity analysis of nSP-D.
The linearity of nSP-D was assessed by measuring SP-D in serially diluted samples and blanks (blue dots).

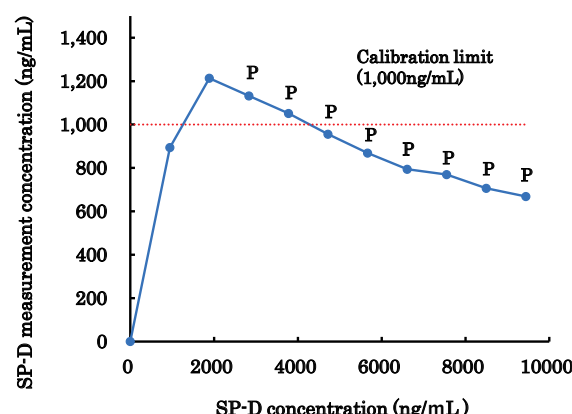


Fig. 2 Prozone phenomenon analysis of nSP-D.
SP-D measurements (blue dots) of high SP-D concentration samples and blanks are shown. The red dashed line indicates the upper limit of SP-D measurement (1000 ng/mL). "P" marks indicate data points with prozone alarms.

3) プロゾーンの確認

約9400 ng/mLのプロゾーン用試料を生理食塩水にて10段階希釈し、各々3重測定して抗原過剰による影響を確認した。その結果、約2000 ng/mLまではSP-D濃度の上昇に従って測定値の上昇が認められ、それ以上の濃度では測定機器に設定されたプロゾーンチェック機能によるアラームが付き、SP-D濃度の上昇に従い測定値低下がみられたが、約4000 ng/mLまで測定値がキャリブレーションリミットである1000 ng/mL以下となるような測定値低下は認められなかった (Fig. 2)。

4) 検出限界・定量限界

SP-D濃度約30 ng/mLの試料を生理食塩水にて5段階希釈し、各々10回測定し、2.6SD法により検出限界を求めた。その結果、検出限界は7.1 ng/mLであった (Fig. 3)。また、同様の試料を生理食塩水にて5段階希釈し、各々10回測定した結果を基に回帰式で回帰し定量限界を求めた。設定方法は、誤差許容限界値をCV 10%とし、X軸に平行に引いた線と回帰曲線が交わる点のSP-D濃度を定量限界とした。その結果、定量限界は12.6 ng/mLであった (Fig. 4)。

5) 試薬の安定性

nSP-D試薬を開栓のまま機器に設置し、初回キャリブレーション後、以後はキャリブレーション未実施のまま、2濃度のコントロール試料を30日間にわたり1日3回測定して 試薬の安定性を確認したところ、試薬開封直後に比して低値コントロール試料で最大10%、高値コントロール試料で最大6%の測定値の上昇を認めた (Fig. 5)。

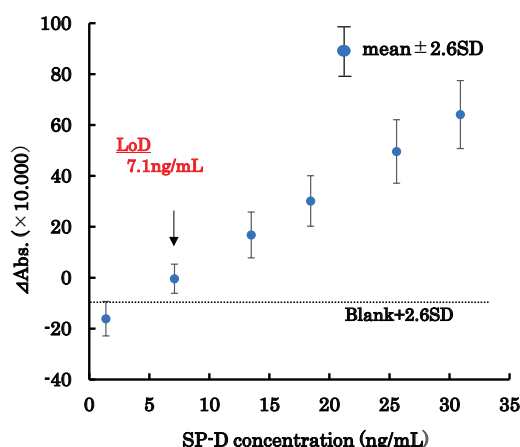


Fig. 3 Limit of Detection (LoD) of nSP-D.
The LoD of nSP-D is determined by calculating the mean $\pm$ 2.6 SD of the delta absorbance (blue dots) at each SP-D concentration (x-axis). Delta absorbance (y-axis, $\times 10,000$) was calculated according to the manufacturer's instructions. The dashed line represents the mean + 2.6 SD absorbance of the blank.

6) 共存物質の影響

干渉チェック・A プラスおよび干渉チェック・RF プラス (いずれもシスメックス株式会社) を用いて、2濃度のプール血清 (約150 ng/mL, 約300 ng/mL) に、5段階希釈した遊離型ビリルビン、抱合型ビリルビン、溶血ヘモグロビン、乳び、リウマトイド因子を添加後、各々3重測定して、測定への

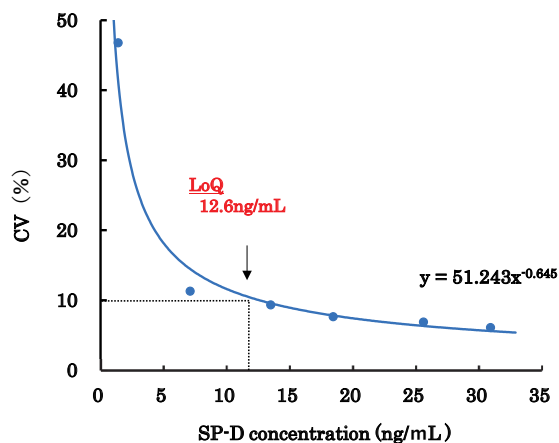


Fig. 4 Limit of Quantification (LoQ) of nSP-D.

The LoQ of nSP-D was determined by plotting the SP-D concentration (x-axis) of each measured sample (blue dots) against the corresponding coefficient of variation (CV%; y-axis). The blue line represents the fitted curve. The black dashed line indicates the threshold CV (10%) used to define the LoQ, and the corresponding nSP-D concentration.

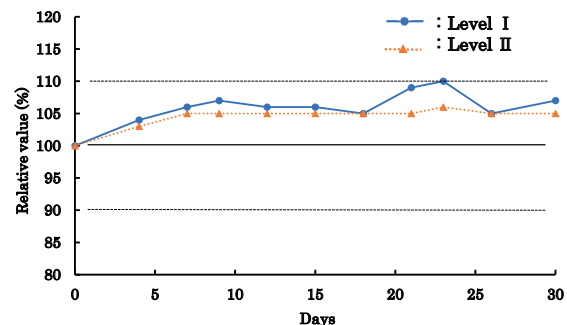


Fig. 5 Onboard Stability of the nSP-D Reagent.

The relative SP-D concentration is shown for each indicated day, with the first day defined as 100%. Low SP-D levels (≈ 80 ng/mL) are represented by blue circles and solid lines, and high SP-D levels (≈ 320 ng/mL) are represented by orange triangles and dashed lines.

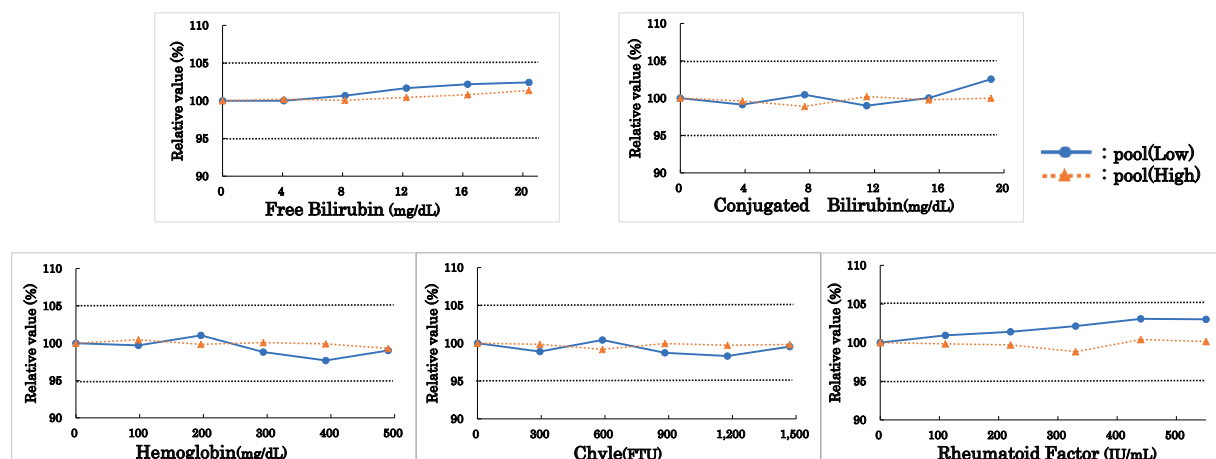


Fig. 6 Effects of Interfering Substances on nSP-D Measurement.

The interference of (A) free bilirubin, (B) conjugated bilirubin, (C) homolytic hemoglobin, (D) chyle, and (E) rheumatoid factor on nSP-D measurement was evaluated. The effect of each interfering substance is shown as a relative value, with the measurement in the absence of the interfering substance defined as 100%. Low SP-D levels (≈ 150 ng/mL) are represented by blue circles and solid lines, and high SP-D levels (≈ 300 ng/mL) are represented by orange triangles and dashed lines.

影響を確認した。その結果、5項目全ての項目において変化率 $\pm 5\%$ 以内（図中破線）であり、検討範囲内では干渉が認められなかった（Fig. 6）。

7) 関連

血清と血漿との測定値の相関性を評価するために、患者血清・血漿ペア検体108例を用いてnSP-Dにおける相関性試験を施行したところ、測定範囲全域で

相関係数(r)=0.997、回帰式 $y = 0.996x + 3.12$ と良好であった。また、血清と血漿の測定値に $\pm 30\%$ 以上の差があり、且つ、相関の回帰式から算出した理論値と実測値に $\pm 10\%$ 以上の差を認めたものを乖離検体としたところ、nSP-Dにおける血清検体測定値は血漿検体測定値と乖離する例は認められなかった（Fig. 7A）。

また、従来法との血清相関性を確認するために、患者血清検体110例を用いて、nSP-DとySP-Dとの相関性試験を実施した。その結果、測定範囲全域で $r=0.983$ 、回帰式 $y = 0.927x + 19.89$ と良好な相関を示した。また、検討試薬と対照試薬の測定値に $\pm 30\%$ 以上の差があり、且つ、相関の回帰式から算出した理論値と実測値に $\pm 10\%$ 以上の差を認めたものを乖離検体としたところ、乖離する検体が2例認められた (Fig. 7B)。

更に、KL-6との血清相関性を確認するためにnSP-Dと同一の患者血清検体108例を用いて相関性試験を施行したところ、測定範囲全域で $r=0.420$ 、回帰式 $y = 0.106x + 101.85$ と相関性は低かった (Fig.

7C)。尚、いずれの回帰分析においても直線回帰分析を使用した。

8) 乖離検体の解析

nSP-DとySP-Dによる測定値に乖離を認めた血清検体は、2例ともySP-Dで測定した測定値に比し、nSP-Dでの測定値が+31%、+45%であった。これらの乖離検体を生理食塩水で2倍、4倍、8倍希釈しnSP-Dにて測定後、それぞれ希釈倍率をかけてSP-D濃度を算出した (Table 2)。いずれの乖離検体においても希釈倍率の上昇に伴いSP-D濃度は低下したものの、その差は8倍希釈で-8.7%、-15.2%であった。

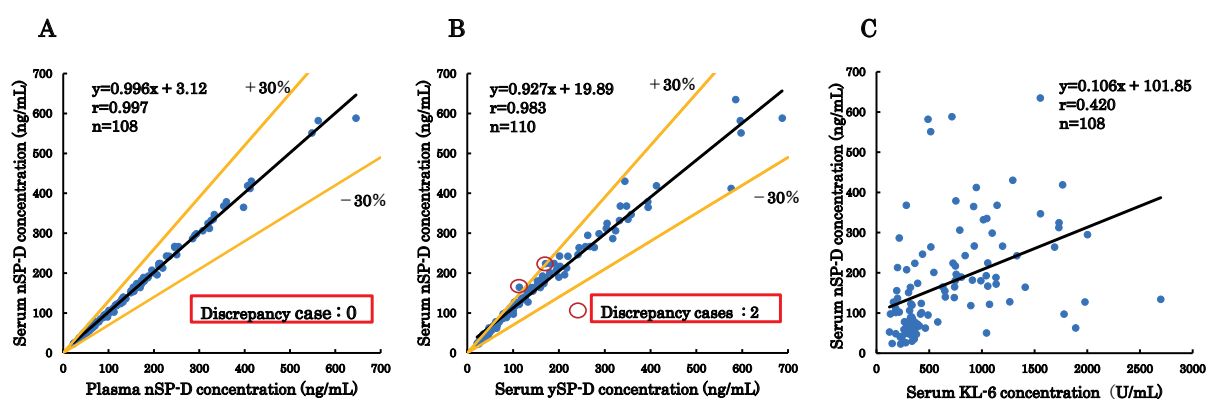


Fig.7 Correlation Analysis.

Scatter plots and regression analyses are shown. Blue dots represent individual patient sample measurements, and black lines represent the corresponding regression lines. Yellow lines indicate the $\pm 30\%$ deviation from the regression line (black line).

(A) Correlation of serum (y-axis) and plasma (x-axis) SP-D levels measured by nSP-D ($n = 108$).

(B) Correlation of serum SP-D levels measured by nSP-D (y-axis) and ySP-D (x-axis) ($n = 110$). Red circles highlight discrepant data points.

(C) Correlation of serum nSP-D (y-axis) and KL-6 (x-axis) levels ($n = 108$).

Table 2 Dilution Analysis of Discrepant Samples

Discrepancy case 1

Dilution ratio	× 1	× 2	× 4	× 8
Measured value(ng/mL)	220.9	209.2	212.4	201.6
Relative ratio(%)	100.0	94.7	96.2	91.3

Discrepancy case 2

Dilution ratio	× 1	× 2	× 4	× 8
Measured value(ng/mL)	165.1	159.8	162.8	140.0
Relative ratio(%)	100.0	96.8	98.6	84.8

4. 考察

新規SP-D測定試薬「ナノピアSP-D」の基礎的検討を行ったところ、併行精度並びに室内再現精度はCV 2.0%以内で、良好な希釈直線性を示した。試薬の安定性において、試薬開封直後に比べ最大10%の測定値の上昇を認めたが、本試薬の正確性は測定期待値の $\pm 20\%$ の性能であるため、許容範囲であり、頻回なキャリブレーションは不要であると考えられる。また、2.6SD法による検出限界は7.1 ng/mL、定量限界は12.6 ng/mLと良好であり、明らかな共存物質の影響は認められなかった。本試薬による血漿並びに血清検体における測定値の相関性も良好であった。また、化学発光酵素免疫測定法を測定原理とする対照試薬ySP-Dとの相関性において、 $r=0.983$, $y=0.927x+19.89$ であり、良好な結果であることから、本試薬は日常検査に十分利用可能な試薬性能を有していると考えられた。

近年、2施設より報告された同一対照試薬・測定機器を用いた患者血清検体における本試薬の性能評価試験では、いずれも我々の報告と同様に対照試薬との良好な相関を認めている^{4),5)}。

本試薬の測定範囲は15.0~1000.0 ng/mLであるが、2000.0 ng/mLまでプロゾンの影響による偽低値は認めなかった。日常検査においてSP-D測定値が2000.0 ng/mLを超える検体に遭遇することは稀であり^{6),7)}、日常検査に十分対応可能であると考ええる。

従来法であるySP-D試薬とnSP-D試薬による測定値の相関性は良好であったが、nSP-Dでは従来法との乖離検体を2例認めたため、希釈試験を施行した。希釈試験の結果、両検体は原液の測定値と~15%程度の差を認めたが、非特異反応を強く示唆する所見は得られなかった。尚、乖離検体の主診断名はいずれも特発性器質化肺炎であり、他の特発性器質化肺炎検体では乖離が認められなかった。また、乖離検体2では総蛋白6.3 g/dLの軽度低蛋白血症を認めたものの、いずれの乖離検体もアルブミン、A/G比に関しては基準範囲内であり、明らかな血中グロブリンの増加は示唆されず、免疫グロブリン濃度の測定は施行されていなかったため、IgMの関与を評価することは不可能であった。乖離検体1は抗SSA抗体が陽性であったが特発性器質化肺炎以外にSjogren症候群を示唆する臨床症状を認めず、リウマトイド因子や抗SSB抗体、抗環状シトルリン化ペプチド抗体などの自己抗体は陰性で、ガム試験並びにシルマー試験も陰性であり、病理組織検査

は施行されていないものの本疾患の可能性は低いと判断されている。今回、いずれの乖離検体も検体量不足からジチオスレイトール処理や添加回収試験などのIgMやIgGの関与を評価する検討は行われなかったため、免疫グロブリンによる偽反応は完全に否定しえないものの、これらの免疫グロブリンの増加をきたす背景疾患を有していないことから、用いている抗体の違いによる反応性の違いが乖離の原因として推察された。尚、SP-Dのカットオフ値は109.8 ng/mLとされており、IPをきたす疾患によりSP-D濃度の差異が生じることから疾患活動性のみならず病態も反映していると考えられる⁶⁾。本検討において乖離検体2例はいずれもnSP-Dによる測定値が従来法より高値であったものの、両症例とも従来法でもカットオフ値を超えており、陽性と判断されるため、厚生労働省の診断基準に基づく臨床診断への影響はないと考えられる。両症例とも従来法でもカットオフ値を超えていることから臨床判断値への影響はないものとする。

今回の検討において、ラテックス免疫比濁法によるSP-DとKL-6の測定値の相関性は低く、SP-DとKL-6の乖離を呈した症例に関しては、基礎疾患などの背景因子を今後検討する予定である。膠原病関連性間質性肺炎において、胸部CT画像上早期例ではKL-6上昇を伴わないSP-D上昇を示すのに対し、線維化終末病変を反映する広範な蜂巣肺を認める症例ではSP-D上昇を伴わないKL-6上昇を呈することがあると報告されている⁸⁾。SP-DとKL-6はいずれも産生細胞は共通であるものの、前者が分泌型糖蛋白質であるのに対し、後者は細胞膜構成蛋白質であり約10倍の分子量を有する。詳細な機序には不明な点が多いが、血清KL-6の上昇には肺胞上皮細胞障害により上皮細胞の細胞膜内コア蛋白に結合したKL-6の細胞外ドメインが細胞膜から切断される特異的酵素の活性化が必要と考えられている⁹⁾。これらの産生細胞による発現形式や分子特性、血中への移行形式などの相違が、肺胞障害時のSP-DとKL-6の循環血への移動に作用し、両者の乖離を引き起こすと考えられる。また、血清KL-6濃度は肺癌や乳癌などでも上昇すると報告されている^{10),11)}。SP-DやKL-6は間質性肺炎の診断や病勢に有用な血清マーカーであるが、測定に医療保険上の測定回数制限があるため、いずれの血清マーカーを選択するかに関しては、それぞれの患者の病態を考慮する必要がある。

今回施行した検討において、nSP-D試薬はLABOSPECT 008 aによる基本性能が良好であり、

従来法との相関も高かった。本試薬は自動分析装置を保有している施設であれば他の一般生化学検体と同時に測定が可能であり、サンプリングから約10分で測定が終了し測定時間の短縮ができることから、日常的な臨床検査に有用な試薬と考えられた。

5. 結語

ラテックス免疫比濁法を測定原理とした本試薬は汎用自動分析装置対応試薬であり、良好な基本性能を有し、従来法であるCLEIA法との相関も良好であった。このため、診察前検査や緊急検査などに有用性が高いことが示された。

尚、本論文の要旨は、日本医療検査科学会第56回大会にて発表した。

謝辞

本研究の進め方や枠組みに多くの示唆や有益なコメントを下された日本医科大学付属病院 中央検査室の井上淳先生並びに遠藤康実先生に深く御礼申し上げます。

Disclosure

開示すべきCOIは以下のとおりである。
積水メディカル株式会社

文 献

- 1) 阿部庄作, 高橋弘毅. びまん性肺疾患. 日内会誌 2000;89(9):98-102.
- 2) 田村 祥子, 高木 豊, 櫻田 裕太 ほか. LABOSPECT 008を用いた「ナノピア®KL-6エーザイ」の基本性能評価. 医学検査 2015;64(6):713-718.
- 3) 染野智治, 戸枝義博. ラテックス比濁法を利用

したCK-MB蛋白量測定試薬「LタイプワコーCK-MB mass」の基礎的検討. 医学検査 2014;63(2):232-235.

- 4) 渡部芽以, 福島紘子, 大野一彦ほか. 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. 医療検査と自動化 2024;49(5):464-469.
- 5) 関根かりん, 小林亮, 田中真輝人ほか. 医療検査と自動化 2024;49(3):186-190.
- 6) Arai T, Akira M, Sugimoto C, Tachibana K, et al. Seroradiologic prognostic evaluation of acute exacerbation in patients with idiopathic interstitial pneumonia: a retrospective observational study. J Thorac Dis. 2020;12(8):4132-4147.
- 7) Murohashi K, Hara Y, Saigusa Y, Kobayashi N, et al. Clinical significance of Charlson comorbidity index as a prognostic parameter for patients with acute or subacute idiopathic interstitial pneumonias and acute exacerbation of collagen vascular diseases-related interstitial pneumonia. J Thorac Dis 2019;11(6):2448-2457.
- 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.
- 9) 高橋弘毅, 白鳥正典. びまん性肺疾患と血清マーカー. 日内会誌 2006;95:86-992.
- 10) 河野修興. 間質性肺炎診療におけるKL-6の使い方. 医事新報 2002;4075:89-89.
- 11) 土井卓子, 田辺美樹子. 乳癌患者血清中KL-6の腫瘍マーカーとしての意義の検討. 日臨外会誌 2008;69(6):1293-1302.