

C反応性蛋白測定試薬「イムノジェネシス CRP」の性能評価

Performance evaluation of a C-reactive protein analysis reagent “Immunogenesis CRP”.

三浦早貴¹⁾, 小林 亮¹⁾, 田中真輝人¹⁾, 鈴木瑛真¹⁾, 近藤 崇¹⁾,
遠藤明美¹⁾, 高橋 聡^{1,2)}

要旨 測定範囲の拡大を図ったCRP測定試薬「イムノジェネシス CRP」の性能評価を行った。その結果, 併行精度の変動係数は最大1.42%であり, 室内再現精度の総合変動係数は最大1.23%と良好であった。希釈直線性は42.8 mg/dLまで得られ, 検出限界は0.015 mg/dL, 定量限界は0.027 mg/dLであった。また試薬搭載時に転倒混和を行うことで搭載後30日目まで測定値は安定していた。プロゾン現象および共存物質の影響は認められなかった。以上より, 本試薬の基礎的性能は良好で, 従来と比較し測定範囲が拡大したため希釈再検数の減少が期待できることから日常検査に有用と考えられた。

Key words C-reactive protein, CRP, latex agglutination turbidimetric immunoassay.

1. はじめに

C反応性蛋白 (C-reactive protein: CRP) は, 細菌感染や組織損傷・傷害などの炎症反応により肝臓で合成される急性相反応蛋白である¹⁾。急性炎症の場合, 血中CRP濃度は健常人の1000倍程度に上昇することから, 炎症性疾患の診断や経過観察に汎用されている²⁾。また, 動脈硬化の進行に慢性的な血管の炎症が関連していることが明らかとなり, 炎症マーカーが動脈硬化の予測マーカーとして注目され, 簡便に測定できるCRPは最も高頻度に測定されている³⁾。現在多くの施設では, CRP濃度の測定に多検体処理が可能な汎用自動分析装置が用いられ, 0.1~0.3 mg/dLの低濃度域が測定できる感度の良好なラテックス免疫比濁法を測定原理とする測定試薬が日常検査に使用されている。近年, 従来試薬以上の測定範囲の拡大を図った, ラテックス免疫比濁法を

測定原理とする新規CRP測定試薬「イムノジェネシス CRP」が開発された。そこで今回我々は, 「イムノジェネシス CRP」の測定範囲を含めた基礎的性能評価を行ったので報告する。

2. 材料および方法

1) 材料

札幌医科大学附属病院においてCRPの検査依頼があった外来および入院患者における血清の残余検体を用いた。なお, 本研究は札幌医科大学附属病院臨床研究審査委員会の承認を得て実施した (承認番号 352-174)。

2) 測定試薬および機器

検試薬にはイムノジェネシス CRP (PHC株式会社) を用い, 自動分析装置 LABOSPECT 008 a (株式会社日立ハイテク) で測定した。対照試薬には, イアトロ CRP-EX (PHC株式会社) を使用した。

Received Aug. 29, 2024; Accepted Apr. 28, 2025

Saki MIURA¹⁾, Ryo KOBAYASHI¹⁾,
Makito TANAKA¹⁾, Ema SUZUKI¹⁾,
Takashi KONDO¹⁾, Akemi ENDOH¹⁾,
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.

Corresponding Author: 三浦早貴

〒060-8543 北海道札幌市中央区南1条西16丁目

TEL: 011-611-2111 (内線36430)

FAX: 011-622-8502

E-mail: miura-sa@sapmed.ac.jp

3) 評価内容

(1) 併行精度

3濃度のプール血清を20回連続測定し、併行精度を調べた。各試料の濃度はCRPの上昇程度をそれぞれ軽度 (0.3 mg/dL), 中等度 (1.0 mg/dL), 高度 (15.0 mg/dL) 相当とし、設定した。

(2) 室内再現精度

-80℃で凍結保存した併行精度と同一の試料を、15日間1日2回測定を行い、室内再現精度を求めた。

(3) 試薬安定性

-80℃で凍結保存した併行精度と同一の試料を、初回キャリブレーション後、オンボード条件にて全30日間のうち15日間測定し、試薬搭載後の安定性を検証した。また、試薬搭載時における転倒混和の有無による安定性への影響についても検討を行った。試薬搭載後、初回の測定値を100%とし、各測定日の測定値における初回測定値に対する相対値を求めた。

(4) 希釈直線性

PHC株式会社より提供されたヒト由来CRP高値試料 (CRP濃度理論値45.0 mg/dL) を、本試薬の添付文書に準拠し、生理食塩水で10段階希釈後、各系列を3重測定した。

(5) プロゾーン現象の有無

PHC株式会社より提供されたヒト由来CRP高値試料 (CRP濃度理論値112.5 mg/dL) を、本試薬の添付文書に準拠し、生理食塩水で10段階希釈後、各系列を2重測定した。

(6) 検出限界 (Limit of detection: LoD)

CRP濃度0.03 mg/dLのプール血清を生理食塩水で6段階希釈後、各系列を10重測定し、主波長と副波長の吸光度の差を用いて、2.6SD法により解析した。

(7) 定量限界 (Limit of quantification: LoQ)

6濃度のプール血清を5日間2重測定し、Precision profileより変動係数 (Coefficient of variation: CV)

が10%となる濃度を求め、定量限界とした。

(8) 共存物資の影響

干渉チェックAプラス、干渉チェックRF (いずれもシスメックス株式会社) および自家調製溶血試料を用い、抱合型ビリルビン、遊離型ビリルビン、乳び、リウマトイド因子 (Rheumatoid factor: RF), 溶血ヘモグロビンの影響を検証した。プール血清に5段階希釈した各共存物質を添加後3重測定し、未添加時の測定値に対する変動を調べた。

(9) 対照試薬との相関性

200件の患者血清 (CRP濃度0.3 mg/dL未満: 62件, 0.3~1.0 mg/dL: 37件, 1.0~15.0 mg/dL: 53件, 15.0 mg/dL以上: 48件) を本試薬および対照試薬で測定し、標準主軸回帰式および相関係数を求め、測定値の相関性を解析した。

(10) 結果の解析

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-V61を用いた⁴⁾。

3. 成績

1) 併行精度

CVは0.46~1.42%であった (Table 1)。

2) 室内再現精度

CVは0.61~1.23%であった (Table 2)。

3) 試薬安定性

試薬搭載時に転倒混和を行った場合、試薬搭載後30日目まで測定値は安定していた (Fig. 1a)。転倒混和を行わず搭載した場合、試薬搭載後24日目より、初日の測定値と比較し5%を超える測定値の上昇を認めた (Fig. 1b)。

4) 希釈直線性

42.8 mg/dLまで良好な直線性が認められた (Fig. 2)。

5) プロゾーンの影響

112.5 mg/dLまで測定値の低下はなく (Fig. 3),

Table 1 Repeatability.

	Low	Medium	High
Mean (mg/dL)	0.30	1.09	14.99
SD (mg/dL)	0.004	0.011	0.069
CV (%)	1.42	1.03	0.46

Table 2 Intermediate precision.

	Low	Medium	High
Mean (mg/dL)	0.29	1.07	14.75
SD (mg/dL)	0.004	0.010	0.090
CV (%)	1.23	0.89	0.61

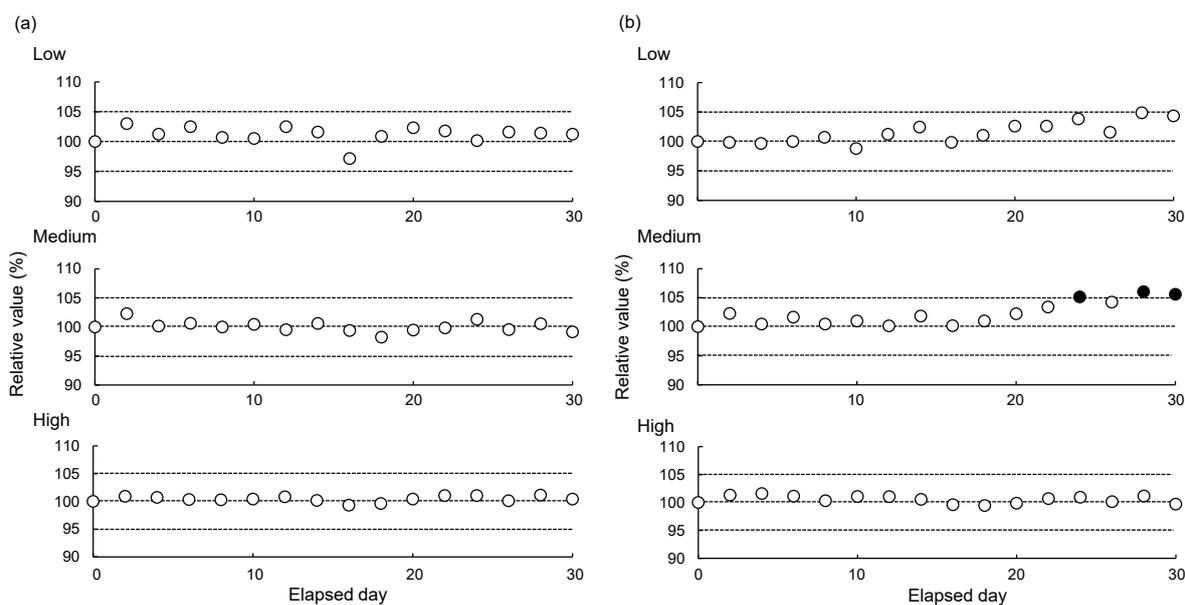


Fig. 1 On-board stability of the reagent: with initial mixing (a), without mixing (b).
Closed circles (●) are values exceeding $\pm 5\%$ of the initial measurement.

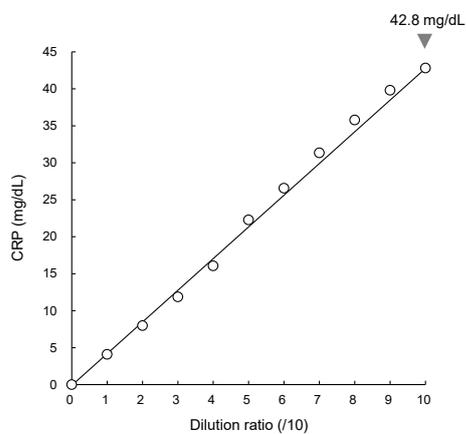


Fig. 2 Dilution linearity.

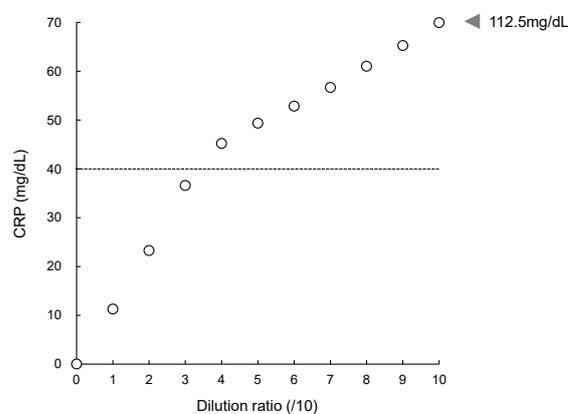


Fig. 3 Prozone phenomenon analysis.

プロゾーン現象を認めなかった。

6) LoDおよびLoQ

LoDは0.015 mg/dL, LoQは0.027 mg/dLであった (Fig. 4, 5)。

7) 共存物質の影響

いずれの共存物質の添加においても、濃度依存性の変動はなく、測定値への影響は認められなかった (Fig. 6)。

8) 対照試薬との相関性

対照試薬との相関性を解析した結果、相関係数は0.997, 標準主軸回帰式は

$$y = 1.174x - 0.364 \text{ であった (Fig. 7).}$$

4. 考察

今回、測定範囲の拡大を図ったCRP測定試薬「イムノジェネシス CRP」の基礎的性能について評価を行った。併行精度および室内再現精度は、いずれもCV2%以下であり、良好な結果が得られた。本試薬は、容器内のラテックス粒子を均一にするため、試薬搭載時に試薬容器の転倒混和を行うことが推奨されているが、試薬の転倒混和は試薬に気泡が混入する場合がある。そこで、オンボード条件にて転倒混和の有無における試薬安定性を検証した。その結果、転倒混和を行わなかった場合は20日目より測

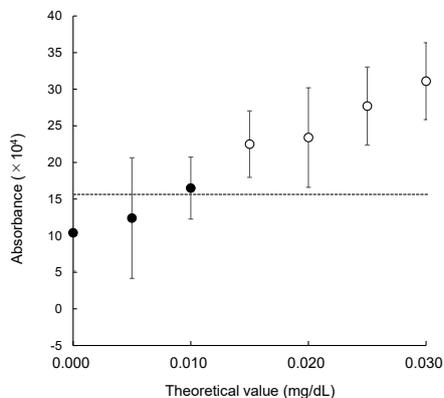


Fig. 4 Limit of detection.

Closed circles (●) represent values that do not meet the limit of detection criteria based on the 2.6SD method.

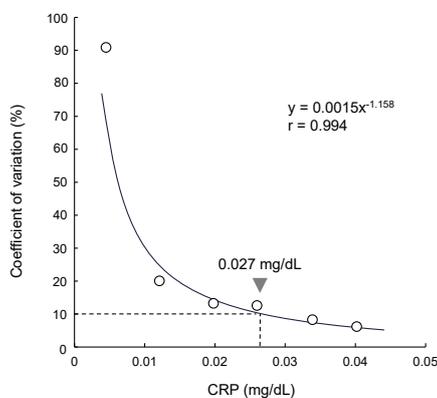


Fig. 5 Limit of quantification.

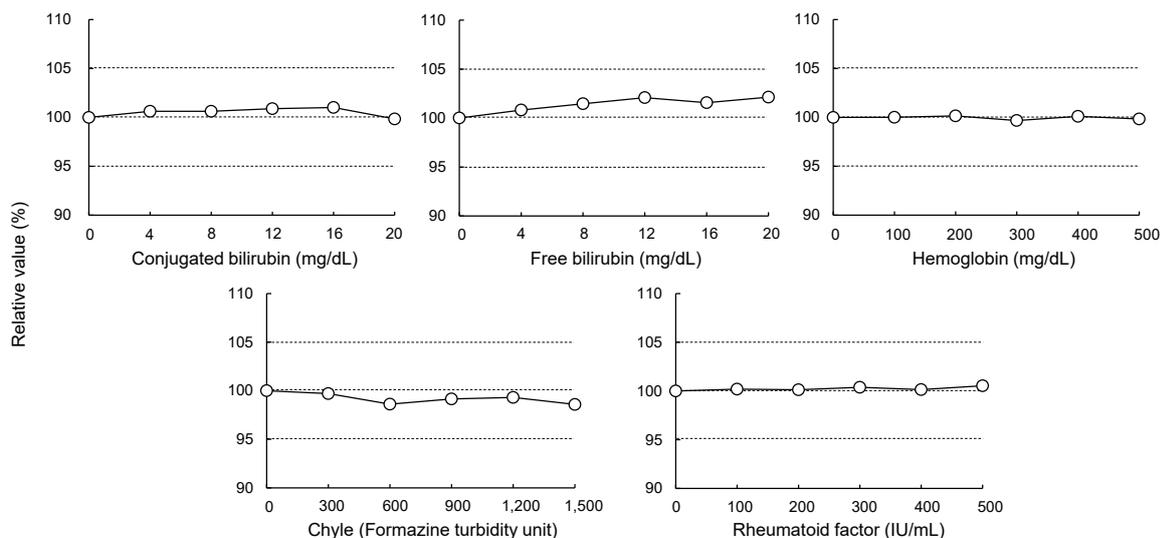


Fig. 6 Effects of interfering substances.

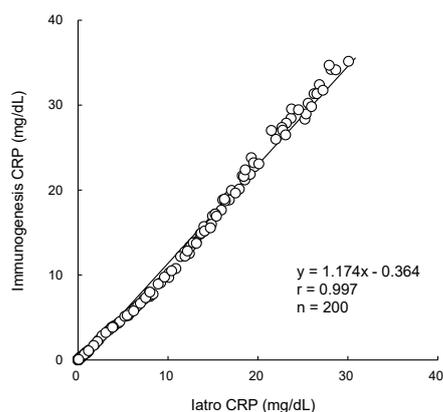


Fig. 7 Correlation between “Immunogenesis CRP” and control reagent.

定値の漸増を認め、24日経過時点で初日と比較し1.0 mg/dL付近で5%を超える上昇を認めた。試薬ボトル内でラテックス試薬の濃度勾配が生じたことにより、試薬搭載直後と比較し、日数経過後の測定では検体と反応する試薬中のラテックス濃度が高くなったことが一因と考えられ、本来より多くのラテックス粒子が検体と反応することで測定値の高値傾向を呈したと推察される。本検討結果は30日間における検証によるものであるが、試薬ボトル内で濃度勾配が生じている場合、同日内の測定値に同様の変動がみられる可能性があり、搭載時の転倒混和が重要である。また、希釈直線性を検証した結果、本試薬の希釈直線性は42.8 mg/dLであり、対照試薬の測定上限である30.0 mg/dLと比較し10.0 mg/dL以上の測定範囲の拡大を確認した。本試薬使用以前の2023年1月～2023年12月までの期間において、当院でCRPの検査依頼があった検体129,263件のうち、対照試薬で希釈再検の対象となるCRP濃度30.0 mg/dL以上の検体は191件であった。この191件中、本試薬を用いることで希釈再検が不要となる30.0 mg/dL以上42.8 mg/dL未満の検体が159件、本試薬で希釈再検が必要となる42.8 mg/dLを超えた検体は32件であった。したがって、本試薬の導入により日常検査におけるほぼ全ての検体で希釈再検が不要となるため、迅速な結果報告が可能になると考えられる。このような測定上限の拡大に加え、検出限界および定量限界は、対照試薬の検出限界（CRP濃度0.0093 mg/dL）および定量限界（CRP濃度0.0188 mg/dL）と比較して軽微な低下であり、米国食品医薬品局が認証した、いわゆる高感度CRPと同様に「検出限界0.02 mg/dL未満」を満たして

おり、十分な測定性能を有していると考えられる⁵⁻⁷⁾。プロゾーン現象の有無を検証した結果、対照試薬と同様に検討範囲内においてプロゾーン現象の発生は認められなかった⁸⁾。CRP濃度100.0 mg/dLを超える高濃度の検体であっても、本試薬の測定範囲内の偽低値として出力されることは無く、測定上限を超える高値検体として希釈再検を行うことになるため、抗原過剰による誤った測定値が報告される可能性は極めて低いと考えられた。共存物質の影響は、検討範囲内において認められず、対照試薬同様、いずれの共存物質の添加においても測定値への影響は認められなかった⁸⁾。対照試薬との相関について検証した結果、相関係数は0.997と良好な相関性が得られた。一方、回帰式は $y = 1.174x - 0.364$ であり、特にCRP濃度約20.0 mg/dL以上の高濃度域において本試薬の高値傾向を認めた。本試薬は測定範囲拡大のため、検量線作成に用いる標準液の最高濃度が40.0 mg/dLと、対照試薬の約30.0 mg/dLと比較し高く設定されている。これにより、両者で測定に用いる検量線に差異が生じる⁹⁾。また、両試薬の抗体産生に用いられる免疫動物が異なり、対照試薬ではウサギ、検討試薬ではヤギが用いられているため、CRPに対する反応性が異なる可能性がある。相関性試験にて認められた高濃度域における本試薬の高値傾向は、これらの要因により複合的に引き起こされている可能性が示唆された。急性腭炎診療ガイドライン2021では、急性腭炎における予後因子の一つとしてCRP濃度15.0 mg/dL以上であることが含まれており、また、壊死性筋膜炎の補助的診断指標であるLRINEC scoreにおいてもCRP濃度15.0 mg/dL以上が基準の一つに用いられている^{10,11)}。したがって、本検討結果で認められたCRP濃度20.0 mg/dL以上の高濃度域におけるわずかな高値傾向は、臨床的評価に影響を与える可能性は低く、日常検査へ問題なく導入可能と考えられる。

5. 結論

新たに開発されたCRP測定試薬「イムノジェネシス CRP」の基本性能は良好であり、測定範囲が拡大したことで希釈再検数の減少が期待できることから、日常検査に有用であると考えられた。

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) Tillett WS, Francis T Jr. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 1930;52:561-571.
- 2) Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454.
- 3) Liuzzo G, Buffon A, Biasucci LM, et al. Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. *Circulation* 1998;98:2370-2376.
- 4) 日本臨床化学会クオリティマネジメント委員会, Validation-Support-V63, http://jscc-jp.gr.jp/?page_id=1145.
- 5) 丸木倫太郎, 中原フミ子, 杉浦秀子ほか. CRP測定試薬の日常検査導入のための基礎的検討. *医療と検査機器・試薬* 2008;31:429-433.
- 6) Rifai N, Tracy RP, Ridker PM. et al. Clinical efficacy of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay. *Clin Chem* 1999;45:2136-2141.
- 7) Roberts WL, Sedrick R, Moulton L, et al. Evaluation of four automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. *Clin Chem* 2000;46:461-468.
- 8) 村上聡, 新田忠善, 田原義孝ほか. HITACHI7070全自動分析装置を用いた免疫比濁法によるCRPの測定. *医学と薬学* 1994;32:581-589.
- 9) 立川将也, 石田秀和, 加藤洋平ほか. ERM-DA474/IFCCに準拠したCRP測定試薬の検査室内検証. *医学検査* 2024;73:741-748.
- 10) 福村直樹, 厚生労働省急性膵炎重症度判定基準, 高田忠敬編, 急性膵炎診療ガイドライン, 第5版, 金原出版;東京, 2021;56-57.
- 11) Wong CH, Khin LW, Heng KS, et al. The LRINEC (Laboratory Risk Indicator for Necrotizing Fasciitis) score: a tool for distinguishing necrotizing fasciitis from other soft tissue infections. *Crit Care Med* 2004;32:1535-1541.