

第27回日本臨床化学会 近畿支部総会 プログラム・抄録集

会 期： 平成 29 年 2 月 26 日（日）

会 場： 天理医療大学

総会長： 池本 正生（天理医療大学）

副会長： 米田 孝司（天理医療大学）

事務局： 岡田 光貴（天理医療大学）

プログラムの内容

一般演題

1. 岡本 朋子（天理よろづ相談所病院 臨床検査部）
2. 木下 真紀（天理よろづ相談所病院 臨床検査部）
3. 川 健司（天理よろづ相談所病院 臨床検査部）
4. 牧 亜矢子（大阪医科大学附属病院中央検査部，神戸大学大学院保健学研究科）
5. 溝越 祐志（神戸常盤大学保健科学部 医療検査学科）
6. 中村 睦美（京都大学医学部附属病院検査部）
7. 明石 晶深（大阪大学医学部附属病院 医療技術部検査部門）
8. 橋本 秀美（大阪大学大学院医学系研究科 保健学専攻生体情報科学講座）

シンポジウム

1. 清瀬 大樹（京都大学大学院医学研究科 人間健康科学系専攻）
2. 林田 雅彦（天理医学研究所）
3. 岡田 光貴（天理医療大学 医療学部 臨床検査学科）

役員会

ランチョンセミナー

- 出口 松夫（大阪大学医学部附属病院 臨床検査部 感染症免疫部門）

総会

企業シンポジウム

1. 安藤 沙智子（栄研化学株式会社）
2. 花井 一馬（和光純薬工業株式会社）
3. 内田 景博（株式会社バイオマーカーサイエンス）
4. 坪井 彩（ロッシュ・ダイアグノスティックス）

特別講演

- 堀田 秋津（京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA) 未来生命科学開拓部門）

プログラム

開会の辞 (9:55～10:00)

一般演題Ⅰ (10:00～11:20) 座長 猪田 猛久 天理よろづ相談所病院 臨床検査部

1. 管理試料の安定性について

岡本 朋子
天理よろづ相談所病院 臨床検査部

2. HbA1c 分析装置「アダムス A1c HA8180V」の使用経験と運用上の注意点

木下 真紀
天理よろづ相談所病院 臨床検査部

3. 一般検査にて異型細胞疑いとした細胞の細胞診結果との比較

川 健司
天理よろづ相談所病院 臨床検査部

4. 炎症性腸疾患における便中カルプロテクチン、便中ラクトフェリンの同時測定

牧 亜矢子^{1), 3)}, 青松 友槻²⁾, 池本 敏行¹⁾, 井上 敬介^{2) 4)}, 余田 篤²⁾
金山 敦子¹⁾, 井地 陽子¹⁾, 河野 江利子¹⁾, 伊藤 光宏³⁾, 岡田 仁克¹⁾
¹⁾大阪医科大学附属病院中央検査部, ²⁾大阪医科大学小児科
³⁾神戸大学大学院保健学研究科, ⁴⁾市立ひらかた病院小児科

5. 細胞株を用いたプレセプシン産生系モデル確立に関する検討

溝越 祐志¹⁾, 澤村 暢¹⁾, 鈴木 高史¹⁾
¹⁾神戸常盤大学保健科学部 医療検査学科

6. シアル化糖鎖抗原 KL-6 測定試薬の基礎的検討

中村 睦美¹⁾, 岡崎 一幸¹⁾, 志賀 修一¹⁾, 一山 智²⁾
¹⁾京都大学医学部附属病院検査部
²⁾京都大学大学院臨床病態検査学

7. パナクリア MMP-3 「ラテックス」試薬の性能評価

明石 晶深¹⁾, 木村 茂樹¹⁾, 前田 育宏¹⁾, 日高 洋²⁾
¹⁾大阪大学医学部附属病院 医療技術部検査部門
²⁾大阪大学医学部附属病院臨床検査部

8. IFNG-54CpG の DNA メチル化率と自己免疫性甲状腺疾患の発症・病態予後との関連

橋本 秀美¹⁾, 渡邊 幹夫¹⁾, 井上 直哉^{1) 2)}, 森田 詠美¹⁾, 日高 洋³⁾, 岩谷 良則¹⁾
¹⁾大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻 生体情報科学講座
²⁾大阪大学医学部附属病院 医療技術部
³⁾大阪大学医学部附属病院 臨床検査部

I. シンポジウム (11:20～12:20)

司会 上裕 俊法 近畿大学医学部附属病院

1. 造血器腫瘍における新規分化誘導因子 DPYSL2 の機能解析

清瀬 大樹 京都大学大学院医学研究科 人間健康科学系専攻

2. 臨床検査におけるフローサイトメトリーの活用と可能性

林田 雅彦 天理医学研究所

3. S100 タンパク質をリガンドとしたマクロファージ CD68 を介する情報伝達経路とその意義について

岡田 光貴 天理医療大学 医療学部

役員会 (12:20～13:15) (演習室 15：大教室 A の向い側演習室)

・ランチョンセミナー (12:20～13:20)

座長 米田孝司 天理医療大学

協賛：株式会社 LSI メディエンス

可溶性 IL-2R の臨床的有用性

出口 松夫 大阪大学医学部附属病院 臨床検査部 感染症免疫部門

総会 大教室 A (13:20～13:40)

II. 企業シンポジウム (13:40～15:00)

司会 日高 洋 大阪大学大学院医学系研究科

1. POCT 対応装置に適応可能な HbA1c 測定系の開発

安藤 沙智子, 吉野 学, 小林 隆, 木村 明 (栄研化学株式会社)

2. ラテックス凝集法を測定原理とする CK-MB 測定試薬「L タイプワコー CK-MB mass」の開発

花井 一馬, 伊達 睦廣, 谷本 和仁 和光純薬工業株式会社

3. CysTTR (システイン化トランスサイレチン)

内田 景博 株式会社バイオマーカーサイエンス

4. プロカルシトニンと敗血症新定義のご紹介

坪井 彩 ロッシュ・ダイアグノスティックス

III. 特別講演 (15:05～16:00)

司会 池本 正生 天理医療大学

テーマ「iPS 細胞を利用した新しい遺伝子治療法の実現に向けて」

堀田 秋津 京都大学 iPS 細胞研究センター

閉会の辞 (16:00～16:05)

支部長 上裕 俊法 近畿大学医学部附属病院

○ 特別講演

iPS 細胞を利用した新しい遺伝子治療法の実現に向けて

堀田 秋津

京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA) 未来生命科学開拓部門

iPS 細胞は多種多様な疾患患者から樹立することができ、旺盛な増殖能力と分化多能性を持つために、細胞レベルでのヒト病態学へと幅広く応用されている。これと並行して、近年の CRISPR-Cas9 に代表されるゲノム編集技術の革新的発展により、ヒト iPS 細胞での精密な遺伝子改変が可能となってきた^{1), 2)}。我々は先天性単一遺伝子疾患の中でも重症を呈する Duchenne 型筋ジストロフィーの原因遺伝子変異修復を試みた。患者の皮膚線維芽細胞からエピソーマル法を用いて iPS 細胞を樹立し、ジストロフィン遺伝子の変異を修復すべく、適切な長さのエクソンを一つ飛ばしてタンパク質の読み枠を元に戻すエクソンスキッピング法や、数塩基の挿入欠損により読み枠を元に戻すフレームシフト法、そして欠損エクソンをノックインで修復する手法などの検討を行った。これらの修復 iPS 細胞を骨格筋細胞へと分化させる³⁾と、期待通り修復ジストロフィンタンパク質の発現が回復していることを確認した。また、修復 iPS 細胞において核型解析、CNV コピー数解析、およびエクソーム配列解析を行い、何れも致命的な変異は検出されなかった⁴⁾。疾患 iPS 細胞での遺伝子修復法は、疾患再現実験や薬剤評価の他、将来的には遺伝子治療にも使える可能性を秘めた技術として、今後の更なる発展が期待される。

Duchenne 型筋ジストロフィーに対する生体外 (*ex vivo*) 遺伝子治療としては、遺伝子修復 iPS 細胞から移植可能な骨格筋細胞または骨格筋幹細胞への分化誘導方法の確立が今後の鍵である。同時に、患者の体内で直接ゲノム編集を行う生体内 (*in vivo*) 遺伝子治療も現実味を帯びつつあり、世界中で開発競争が進んでいる。今後の新しい遺伝子治療のあり方について、皆様と議論出来れば幸いである。

1) Li HL et al., *Methods*, 101: 27–35, 2016

2) Hotta A and Yamanaka S, *Annu Rev Genet*, 49: 4.1–4.24, 2015

3) Tanaka A et al., *PLoS ONE*, 8: e61540, 2013.

4) Li HL et al., *Stem Cell Reports*, 4: 143–154, 2015

○ シンポジウム

1. 造血器腫瘍における新規分化誘導因子 DPYSL2 の機能解析

清瀬 大樹

京都大学大学院医学研究科 人間健康科学系専攻

Kruppel-like factor4 (KLF4) is a member of the KLF family transcription factors, well known for its reprogramming capacities to promote iPS cell transformation. In the context of hematopoietic cells, the major role of KLF4 has attributed to its myeloid to monocyte differentiation capacity and considered to work as a tumor suppressor in acute myeloid leukemia (AML) or myeloid dysplastic syndrome (MDS)-derived cells. Ras-Raf-MEK-ERK pathway is consistently up-regulated in these tumor cells and we have previously reported the role of KLF4 as a major differentiation inducer in this setting, however, how does KLF4 induce monocytic differentiation under MEK-ERK pathway activation has remained unknown. We thus addressed this issue and found a novel key mediator of monocytic differentiation in myeloid leukemia cells.

To identify essential downstream factors of KLF4 in myeloid leukemia cells, we first analyzed 3 independent gene expression microarray data sets of AML patients (GSE45194, GSE38810 and GSE22845). AML patients were divided into two groups according to their KLF4 expressions and top 1000 up-regulated genes in KLF4 high-expressing AML patients were extracted. Venn diagram was used to identify the overlapping genes in these data sets and we identified 26 candidate genes possibly involved in KLF4 mediated differentiation in hematologic malignancies. We then performed comprehensive quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis to examine the expression of all of these candidate genes upon additive KLF4 expression in leukemia cell lines of MOLM-13 and THP-1 cells. Among these genes, KLF4 exceptionally up-regulated the expression of Dihydropyrimidinase like 2 (DPYSL2) over 200-folds. DPYSL2 consists DPYSL gene family. Since previous reports suggest their multiple roles in neuronal differentiation and polarity, as well as in axon growth and guidance, we hereafter focused on this DPYSL2 gene to reveal its veiled function in leukemia cells. Intriguingly, qRT-PCR assay demonstrated that KLF4 uniquely up-regulated the gene expression of DPYSL2 isoform1 among DPYSL family members. We confirmed the specific expression of DPYSL2 isoform1 upon additive KLF4 expression by immunoblotting in AML cells. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay proved that KLF4 bound directly to the gene promoter region of DPYSL2 isoform1. We next induced the endogenous expression of KLF4 in myeloid leukemia cells using phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) which leads to a rapid and sustained activation of MEK and ERK, ultimately inducing a substantial monocytic differentiation in these cells. PMA treatment induced concomitant expressions of KLF4 and DPYSL2 isoform1 both at mRNA and protein levels in these cells. To assess the function of DPYSL2 isoform1 in myeloid leukemia cells, we generated tetracycline-inducible DPYSL2 isoform1-overexpressing human leukemia cell lines. Upon doxycycline treatment, these leukemia cells differentiated into monocytic lineage with marked CD11b and CD14 cell surface expressions. We next knocked out DPYSL2 isoform1 in KLF4 overexpressing leukemia cells using CRISPR/Cas9 gene modification system and found that the genetically modified cells maintained the undifferentiated state upon KLF4 overexpression. We also demonstrated that shRNA-mediated partial down-regulation of DPYSL2 isoform1 in leukemia cells with enforced KLF4 expressions resulted in mild inhibition of KLF4-induced monocyte differentiation. Taken together, these results underpin the importance of DPYSL2 isoform1 in monocytic differentiation of myeloid leukemia cells.

Our findings offer insight into a novel role of DPYSL2 as a differentiation inducer in hematologic malignancies and may provide a new therapeutic approach for hematologic malignancies.

2. 臨床検査におけるフローサイトメトリーの活用と可能性

林田 雅彦
天理医学研究所

臨床検査におけるフローサイトメトリー (FCM) として最も知られている造血器腫瘍表面抗原検査では、系統特異抗原による帰属の決定と、接着分子・サイトカイン・細胞質内抗原など種々のマーカーを用いた分化段階や生理機能が検索されているが、マイクロビーズを用いることでサイトカインなどの液性因子や遺伝子 PCR 産物のマルチプレックス解析が可能であり、デジタル PCR にも応用されている。今回、FCM の利用として自己抗体の検出、サイトカインの定量、細胞内リン酸化シグナル伝達、好塩基球のアレルギー反応 (BAT) について紹介する。

1. 全身性非結核性抗酸菌症における抗 IFN γ 自己抗体の解析

非結核性抗酸菌症の中で最も頻度の高い *Mycobacterium avium complex* (MAC) 症は、気管支を中心病変とする肺感染症 (PMAC) と全身播種型 (DMAC) に大別され、DMAC は非常に稀で AIDS 末期や血液疾患といった細胞性免疫が低下した病態で見られることが多い。近年、基礎疾患のない DMAC に抗 IFN γ 抗体が関与していることが報告され、当院においても抗 IFN γ 自己抗体を認めている。

本疾患の解析には、IFN γ 産生能、IFN γ レセプターの機能、抗 IFN γ 自己抗体の検出、抗 IFN γ 自己抗体による JAK-STAT 経路シグナル伝達阻害を検索する必要がある。通常、ELISA 法やイムノブロット法を用いるが、迅速性と簡便性から FCM による検索が有用である。

2. 視神経脊髄炎における抗アクアポリン 4 抗体の検出

視神経脊髄炎 (NMO) は視神経炎と 3 椎体以上の長い脊髄炎を特徴とする中枢神経の自己免疫疾患で、かつては多発性硬化症の一亜型と考えられていたが、2004 年に NMO の患者血清に抗アクアポリン 4 抗体が検出され、多発性硬化症と鑑別されるようになった。

当施設における抗アクアポリン 4 抗体の検出は、一般的な ELISA 法が持つ平面的な固相化による立体障害を回避するために、HEK293 細胞にアクアポリン 4 を強制発現させ、それを基質として被験者血清中の自己抗体を蛍光顕微鏡にて検出する cell-based assay (CBA) を実施している。この CBA 法における免疫染色と蛍光顕微鏡による観察を、FCM を用いることにより迅速で客観的な評価が可能となる。

3. 末梢血好塩基球を用いたアレルギー検査

好塩基球は IgE と抗原 (アレルゲン) による IgE 受容体の架橋で活性化し、ヒスタミンなどの特殊顆粒の放出や細胞表面抗原における CD63 や CD203c の迅速な発現上昇を認める。

好塩基球活性化試験 (Allergenicity Kit ; BC 社) では、好塩基球の活性化の指標として CD203c を用いている。特徴は全血を用いた試験のため安全で生理条件に近く、アレルゲンが水溶性ならばいずれの物質も評価可能であり、感度・特異性は抗原特異的 IgE 測定やヒスタミン遊離試験に比べ高いとされ、臨床症状と高い相関性を示す。好塩基球の特異的解析は、散乱光サイトグラムにおけるリンパ球と単球を含む領域で CD3 陰性 CD294 陽性分画を対象とし、抗原無添加を対照にアレルゲン添加と CD203c の発現量を比較する。

FCM は、新たな抗体と蛍光色素の開発により、その応用範囲はますます拡大している。最新の FCM は 10 色を越えるマルチカラー解析、ハイスループット (20,000 イベント/秒以上)、完全デジタル化 (20 ビット/40MHz 以上の波形処理) による高分解能と広い直線性の向上、100 万細胞以上のデータ取得による高精度化など機能が向上している。広いダイナミックレンジと定量的な評価は、CBA 法のサイトカイン測定において信頼性を向上させている。

3. S100 タンパク質をリガンドとしたマクロファージ CD68 を介する情報伝達経路とその意義について

岡田 光貴

天理医療大学 医療学部 臨床検査学科

S100A8, S100A9 and S100A8/A9 (S100 proteins), which are calcium-binding proteins belonging to the S100 family, are abundantly expressed in immune cells of myeloid origin, such as macrophages and neutrophils, during acute inflammation. S100 proteins are heavily involved in many inflammatory conditions, such as chronic rheumatoid arthritis [1], inflammatory bowel disease, and acute hepatitis, and probably play pivotal roles inside and/or outside of immune cells because they account for more than 40% of the total intracellular protein content of such cells, particularly neutrophils. Macrophages are reportedly activated after they recognize bacteria or their components through receptors such as Toll-like receptor 4 (TLR4) and the receptor for advanced glycation end-products (RAGE), and this process helps to maintain homeostasis by negatively regulating excessive immune responses evoked by commensal bacteria. Generally, macrophages are activated by S100 proteins through the abovementioned two receptors, which leads to the secretion of cytokines from the cells. Previous analyses of the activation pathways in operation in immune cells have demonstrated that S100 proteins are immunologically important. For example, it was reported that in large intestinal epithelial cells the signal transduction and activator transcription 3 (STAT3) pathway is stimulated by interleukin-6 (IL-6), leading to excessive secretion of S100A9 [15], and in a study of colon cancer onset involving RAGE knockout mice S100A8/A9 was found to play an extremely important role in the progression from chronic inflammation to carcinogenesis via its activation of the RAGE-nuclear factor-kappa B (NF- κ B) pathway. Therefore, S100 proteins might act as important mediators inside/outside of activated immune cells and help such cells to self-catalytically modulate their immunological functions through known and/or undefined receptors.

Cluster of differentiation 68 (CD68) is a glycoprotein belonging to the lysosome associated membrane protein (LAMP) family and is widely considered to be a specific biomarker of macrophages/monocytes. CD68 overexpression is indicative of macrophage/monocyte dysfunction and hyperproliferation. Furthermore, CD68 is recognized to be a useful biomarker of rheumatoid arthritis and Hodgkin's lymphoma. Thus, CD68 has been utilized as a macrophage biomarker during flow cytometry or immunological staining in many previous studies, but its immunological functions remain unclear. It has been reported that CD68 influences macrophage functions, and macrophages that exhibited strong CD68 and human leukocyte antigen-DR expression enhanced the motility of human hepatocellular carcinoma cells via the NF- κ B/focal adhesion kinase pathway. Therefore, we examined the interactions between CD68 and S100 proteins in macrophages, and hypothesized that CD68 binds to S100A8 and/or S100A9 to form complexes, and that these complexes subsequently help to regulate the cells' immune functions. In the present study, we investigated whether CD68 binds to S100A8 and/or S100A9 to form complexes in macrophages, and whether CD68 serves as a functional binding protein or a receptor-like protein for these S100 proteins. We finally discussed the functional role of S100 proteins as ligands involved in the signal transduction pathways triggered by CD68 on macrophages.

S100A8 and S100A9 (S100 proteins) are regulators of immune cells of myeloid origin. Whilst S100 proteins are found at high concentrations in such cells, their immunological roles remain unclear. We focused on cluster of differentiation 68 (CD68). The aim of this study is to investigate whether CD68 binds to extracellular S100A8 and/or S100A9 and subsequently participates in the regulation of the cells' immune functions. ELISA and affinity chromatography showed that both recombinant rat S100A8 (r-S100A8) and r-S100A9 bound to r-CD68, but not to r-CD14. Flow cytometry clearly showed evidences supporting above the two results. As analyzed by flow cytometry, a less amount of r-S100A8 or r-S100A9 bound to the macrophages treated with some deglycosylation enzymes. In an in vitro assay, the expression levels of S100A8 and S100A9 were significantly suppressed after the macrophages had been treated with an anti-CD68 antibody (ED1). As stimulated macrophages with r-S100A9, the expression of IL-1 β mRNA in macrophages, which were treated with anti-TLR4 or -RAGE antibodies, was significantly suppressed. r-S100A8 up-regulated IL-6 and IL-10 mRNAs, while r-S100A9 did TNF- α and IL-6 mRNAs, although these regulations were not statistically significant. siCD68 also significantly suppressed activation of macrophages through autocrine pathway by r-S100A8 or r-S100A9. In macrophages stimulated with lipopolysaccharide, fluorescent immunological staining showed that most CD68 co-localized with S100A8 or S100A9, and that the levels of all three molecules were markedly increased.

In conclusion, CD68 on macrophages binds to S100A8 and S100A9, and thereby, plays a role in the regulation of the cells' immune functions.

○ ランチョンセミナー

協賛：株式会社 LSI メディエンス

可溶性 IL-2R の臨床的有用性

出口 松夫

大阪大学医学部付属病院 臨床検査部 感染症免疫部門

インターロイキン2受容体 (IL-2R) は α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の3つの細胞膜表面タンパク質から構成されている。このうち一部の膜型 α 鎖がプロテアーゼの作用により切断され、血中に遊離したものが可溶性 IL-2R (sIL-2R) である。通常 α 鎖は休止期のリンパ球には認められず、抗原刺激により活性化されたリンパ球の細胞膜表面に初めて見出されるため、sIL-2R 濃度の測定は免疫機構活性化の指標になると考えられている。

血中の sIL-2R 濃度は、成人 T 細胞性白血病 (ATL) や非ホジキンリンパ腫 (NHL) といった造血器腫瘍や自己免疫疾患など、さまざまな疾患で上昇することが知られている。特に、ATL や NHL の経過観察や寛解後のフォローにおいて、有用な指標として用いられている。また、sIL-2R 濃度は免疫機構の指標になると考えられていることから、骨髄移植後の患者における骨髄の生着や急性 GVHD の診断、治療効果のモニタリングにも有用とされ、臨床の場で利用されている。また、sIL-2R の測定は、入院患者のみならず外来患者での依頼も多く、近年では検査の迅速性も求められるようになった。

今回、(株)LSI メディエンスにより新しく開発された sIL-2R 測定用試薬「ステイシア CLEIA IL-2R」は、CLEIA (化学発光酵素免疫測定法) を原理とし、全自動臨床検査システム ステイシアにより測定を行う。本システムの特徴は、① 1 テスト当たり 19 分と短時間で測定可能、② 50~100,000 U/mL までの広い測定範囲、③ 血清及び EDTA またはヘパリン血漿での測定が可能などである。

本セミナーでは、sIL-2R の基礎的事項、当院における sIL-2R 検査の状況、ステイシア CLEIA IL-2R の基本性能などについて紹介する。

○ 企業シンポジウム

1. POCT 対応装置に適応可能な HbA1c 測定系の開発

安藤 沙智子, 吉野 学, 小林 隆, 木村 明
栄研化学株式会社

【はじめに】

ヘモグロビン A1c (以下、HbA1c) は、ヘモグロビンの β 鎖 N 末端が非酵素反応的に糖化された物質であり、その血中濃度は日内変動がなく、過去 1～2 か月間の平均的な血糖値を反映する。HbA1c は糖尿病の診断基準に用いられており、治療の経過観察マーカーとしても有用である。現在、弊社では POCT (Point of Care Testing) 対応装置に適応可能な新規免疫法による測定試薬の開発を行っている。本試薬は、2 種類の抗体を結合させた金コロイド粒子と抗原との抗原抗体反応によって形成される凝集塊を、専用測定装置を用いて光学的に検出する。すなわち、表面プラズモン共鳴 (PSR) に由来する金コロイド粒子の抗原濃度依存的な吸収スペクトル変化を指標として測定値を算出する。今回、開発検討中である HbA1c 測定用試薬の基本的な性能評価を行ったので報告する。

【検討内容】

基本的な試薬性能評価として、正確性、同時再現性、相関性、安定性について検討した。正確性試験は常用参照標準物質 JCCRM411-3 (JDS Lot 5) 5 濃度を三重測定した。同時再現性試験は市販コントロール (Bio-Rad 社) 4 濃度を十重測定した。相関試験は社内ボランティア検体 40 例、異常ヘモグロビン (以下、Hb) 検体 20 例 (HbF 5 例、HbS 11 例、HbC 4 例) を測定した。比較対照機器には、HLC-723GX (HPLC 法、東ソー) を用いた。安定性試験は反応容器を冷蔵 (10℃) にて保存し、市販コントロール (Bio-Rad 社) 3 濃度の測定値の経時変化を観察した。

【結果】

正確性は HbA1c 値が 5.10～9.60% の範囲では測定値と認証値の差が $\pm 0.2\%$ 以内であったが、高値域では正誤差が見られた。同時再現性は CV 値 1.2～2.2% と良好であった。社内ボランティア検体での相関は回帰式 $y = 0.908x + 0.423$ 、相関係数 $r = 0.965$ であった。一方、異常 Hb 検体での相関は、回帰式 $y = 1.123x - 0.501$ 、相関係数 $r = 0.957$ であった。相関試験に用いた異常 Hb 検体は HbF、HbS、HbC の 3 種類であるが、全体的にばらついており、各異常 Hb 特有の傾向は見られなかった。不安定化 Hb および修飾 Hb の測定値への影響は認められなかったが継続して検討中である。冷蔵 (10℃) にて 1 年経過した試薬による測定結果は初期測定値 $\pm 3\%$ 以内を維持しており、冷蔵条件で長期間の安定性を確保していることを確認した。

【考察および結語】

我々が現在開発中の試薬は良好な正確性、同時再現性、安定性を有しているが、相関性は改善の余地があり、実用化にはさらなる検討が必要であると考えている。本試薬は検体量が微量であること、検体採取および前処理時間を含め 10 分以内に測定結果が得られることから、現在市販されている POCT 対応の HbA1c 測定システムと同等の操作性および迅速性を有しており、有用であると考えられる。また、抗体を結合させた金コロイド粒子と抗原との抗原抗体反応によって形成される凝集塊を光学的に検出する本原理は、HbA1c の測定以外にも汎用性があると考えられ、他項目への応用により POCT 対応装置の利用の拡大が見込まれる。

2. ラテックス凝集法を測定原理とする CK-MB 測定試薬「L タイプワコー CK-MB mass」の開発

花井 一馬¹⁾, 伊達 睦廣¹⁾, 谷本 和仁²⁾

¹⁾ 和光純薬工業（株）臨床検査薬事業部 臨床検査薬開発本部 臨床検査薬研究所

²⁾ 和光純薬工業（株）臨床検査薬事業部 臨床検査薬営業本部学術部

1. はじめに

クレアチンキナーゼ（CK）-MB は心筋梗塞などの心筋傷害のバイオマーカーとして使用されており、急性心筋梗塞診療ガイドラインでもトロポニンと並んで有用性が認められている。CK-MB の測定は免疫阻害法・蛋白質質量測定法・電気泳動法などによって行われている。わが国では汎用自動分析装置が広く普及していることから、CK-MB 測定は迅速・簡便に測定が可能な免疫阻害法が最も多く用いられてきた。一方で免疫阻害法は測定原理上 CK-BB やマクロ CK によって大きく正誤差の影響を受けるため、CK-MB に対する特異性が低いという問題点がある。蛋白質質量測定法・電気泳動法は、CK-MB に対する特異性において免疫阻害法よりも遙かに勝るが、測定には専用の分析装置が必要なことや測定時間が掛かることから、免疫阻害法の約 1 割程度の測定件数に留まっている。

2. 新規ラテックス試薬の開発

我々は、汎用自動分析装置にて迅速・簡便に CK-MB 蛋白質質量を測定することを目指してラテックス凝集法を測定原理とした試薬「L タイプワコー CK-MB mass」の開発を行った。L タイプワコー CK-MB mass の開発においては以下に示す 2 点について工夫を必要とした。

1 点目は、ラテックス凝集反応系における高感度化の実現である。健常者における CK-MB 蛋白質質量の血中濃度上限 99 パーセンタイル値は 3~8 $\mu\text{g/L}$ 程度であると報告されているが、凝集促進剤として第 1 試薬（R1）に PEG 6000 を使用した従来の試薬組成では 99 パーセンタイル値の定量測定は困難であった。そこで我々は種々の構造の化学合成ポリマーを生成し、重量平均分子量が 20 万以上の強い凝集促進作用を示す物質を選抜した。この独自に開発した凝集促進剤を使用することによって L タイプワコー CK-MB mass では試薬の高感度化に成功している。

2 点目は CK-MB に対する高い特異性の実現である。本試薬の開発においては、免疫阻害法では実現できない CK-MB に対する高い特異性を目指す必要があった。しかし、用いる抗 CK-MB 抗体は極僅かに CK-BB とも交差反応を示すことが判明しており、CK-BB の交差反応を完全に排除し CK-MB のみを正確に測り分ける事が困難であることが推察された。実際に CK-MM、CK-MB、CK-BB やマクロ CK タイプ 1（多くは IgG と CK-BB が結合）を含む検体を用いて交差反応性を確認したところ、CK-MM とは交差反応は示さなかったものの CK-BB やマクロ CK タイプ 1 を含む検体において、測定値がやや高値化し、交差反応があることが示唆された。この問題への対応として R1 への抗 CK-B 抗体の添加を検討した。その結果、抗 CK-MB 抗体と CK-BB やマクロ CK タイプ 1 との交差反応が抑制されることを見出した。今回開発した L タイプワコー CK-MB mass は汎用自動分析装置の測定系において CK-BB やマクロ CK を含む検体でも電気化学発光法や化学発光法と良好な相関性を示し、特異性の高い CK-MB 測定を提供することが可能となった。

3. まとめ

L タイプワコー CK-MB mass は汎用自動分析装置における世界初の CK-MB 蛋白質質量測定試薬である。本試薬は免疫阻害法の利点である汎用性と、蛋白質質量測定法の利点である高い CK-MB 特異性を持ち合わせている点が大きな特徴である。L タイプワコー CK-MB mass は、CK-MB 蛋白質質量測定の普及に貢献できると考えている。

3. CysTTR (システイン化トランスサイレチン)

内田 景博
株式会社バイオマーカーサイエンス

【背景】

日本の糖尿病有病者数は 1,080 万人を数え、いわゆる「糖尿病予備軍」を含めると 2,800 万人に¹⁾達するとするとされる。この 10 年間に優れた新薬が複数上市され、糖尿病治療の進歩は著しいが、患者の減少にはつながっていない。また、糖尿病ががんや認知症のリスクを有意に高めていることが、疫学試験のみならず基礎医学研究からも次第に明らかになってきている。体内で糖尿病のリスクが高まっていることを知らせるバイオマーカーを有効に用いれば、糖尿病や関連する疾患の有病者の増加に歯止めをかけることができるのではないかとの思いから、我々の研究はスタートした。

トランスサイレチンはプレアルブミンとも呼ばれ栄養指標として用いられる血中たんぱく質の一種である。その修飾体のシステイン化トランスサイレチン（以下 CysTTR）はトランスサイレチンの N 末端から 10 番目のシステイン残基がジスルフィド結合によって遊離システインと結合した修飾たんぱく質である。

(株)バイオマーカーサイエンスと京都府立医科大学との共同研究により、Ⅱ型糖尿病を自然発症する OLETF ラットを用いたプロテオーム解析から、CysTTR が糖尿病のリスクの高まりを知らせる有力なバイオマーカーの候補であることを見出した¹⁾。

【方法】

Cys-TTR 比の測定の概略を以下に示す。血清検体をフェノール沈殿により分画し、画分をトリプシン消化した。消化後に内部標準物質として安定同位体標識ペプチドを添加混合し、LC-MS/MS 装置 Xevo[®] TQ-S micro ACQUITY UPLC[®] System (Waters) を用いて MRM モードで測定した。得られた Cys-TTR 由来ペプチド及び総 TTR 由来ペプチドの定量結果から Cys-TTR 比を算出した。

【考察】

Cys-TTR はジスルフィド結合を伴うその修飾構造から、フリーラジカル等の酸化ストレスが原因で生成するとされている²⁾。酸化ストレスと肥満やインスリン抵抗性には強い相関のあることが知られており、酸化ストレスの増大がインスリン感受性を抑制するという多くの報告がある。このため酸化ストレスで増加する血中 Cys-TTR 比は、健常状態から耐糖能異常等の糖尿病前段階を経て糖尿病に進展するまでのリスクの上昇を把握するバイオマーカーとして有用である。今回の研究はプロテオーム解析により得られた血中タンパク質修飾体の定量に LC/MS/MS が応用できることを示すもので、臨床検査の場において、予防マーカーの測定に用いられることを目指している。

¹⁾ Naito Y, et al, *J Clin Biochem Nutr*, 58(1)23-33,2016

²⁾ Pereila CD, et al, *Anal Chem*, 87 (21), pp 10785–91,2015

4. プロカルシトニンと敗血症新定義のご紹介

坪井 彩

ロッシュ・ダイアグノスティックス株式会社

サイエンティフィックソリューション部門

免疫生化学部 大阪グループ

敗血症は肺炎や腎盂腎炎などで感染症を起こしている箇所から血液中に病原体が入り込み、重篤な全身症状を引き起こす症候群です。1992年に米国集中医療学会(SCCM)/米国胸部医学会(ACCP)より発表された概念に基づき、感染症によって誘引されたSIRS（全身性炎症反応症候群）と定義されていました。敗血症は病態の進展が早く、重症な患者さんでは死亡率が非常に高いことが特徴として挙げられます。従って敗血症の診療には早期に鑑別診断することと、重症化する前に抗菌薬の治療を開始することが患者さんの命を守るために非常に重要です。

敗血症の検査には代表的な炎症マーカーであるCRPやWBC、そして菌種の特定のための血液培養が主流とされる時代が続いてきました。そんな中、1993年に敗血症に関連するタンパク質として初めてプロカルシトニンが報告されました。その後に敗血症診断における有用性が示されてから世界的に認知されるようになり、日本でも2006年に保険収載されました。

プロカルシトニンは正常な代謝状態ではカルシトニンの前駆物質として甲状腺C細胞内で産生されています。細菌性の敗血症になると体内で産生されるIL-1 β 、TNF- α 、IL-6といった炎症性サイトカインの刺激により全身の細胞内でプロカルシトニンが産生されることにより血中濃度が上昇します。一方、ウイルス感染による敗血症ではプロカルシトニンはほとんど産生されないことから、プロカルシトニンは細菌感染による敗血症に特異的なバイオマーカーとして位置づけられています。また、感染後の血中濃度の上昇がCRPより早いことも特徴のひとつです。さらに敗血症の重症度に応じてプロカルシトニン値は上昇し、相関関係にあるため早期重症度把握にも有用であることが示されています。このような背景から、現在プロカルシトニンは2012年に発刊された日本版敗血症ガイドラインをはじめとした国内6つのガイドラインに掲載されています。さらに、2016年2月にアメリカ集中治療医学会とヨーロッパ集中治療学会の2つの学会が中心となり約15年ぶりに提唱された敗血症の新たな定義においても、プロカルシトニンが敗血症の診断補助となり得ることが示唆されています。

最近ではICUやERだけでなく、多岐にわたる診療科にてプロカルシトニン検査が用いられています。敗血症の診断や重症度判定のみならず、治療効果判定や抗菌薬中止指標としての役割等、今後も様々な臨床の現場での活躍が期待されているバイオマーカーです。

○ 一般演題

1. 管理試料の安定性について

岡本 朋子, 猪田 猛久, 嶋田 昌司, 松尾 収二
天理よろづ相談所病院 臨床検査部

【はじめに】

管理試料を用いた精度管理法では、測定値が許容範囲に入っているかを確認するが、その管理試料には開封後からの保証期間があるものの実際には各施設が独自のルールで使用しているのが現状である。今回、当院で使用している管理試料が開封からどの程度の期間安定した値を示すのか、またどの項目が変動を示すか調査した。

【方法】

管理血清は日水製薬株式会社製の L-スイトロール II を用いた。メーカー提示の保証期間は開封後当日のみであるが、開封してから 6 日間連日で 1 日 2 回測定し、それぞれ当日開封した管理血清との値を比較した。測定項目は 25 項目(LD, ALT, AST, ALP, γ GT, CHO, T-Bil, D-Bil, UA, ChE, TP, ALB, BUN, CRP, Ca, CRE, LDL-C, Glc, TG, HDL, P, Na, K, Cl, CO_2)とし、測定機器は、日立の Labospect008 を用いた。開封後の管理血清の保存方法については冷暗所にて保存した。

【結果】

調査した項目中、当日開封した値との差が顕著であったものは AST, ALP, Na, T-Bil, CO_2 であり、開封後 6 日目の時点で測定値の変化率は AST が 7.7%, ALP が 4.0%, Na は 3.3% と開封してから経時的に高値を示し、T-Bil は -17.65%, CO_2 は -32.9% と低値となった。逆に変化率が最も小さかったのは LD であり、0.4%であった。

【考察】

当日と開封後 6 日目を比較すると、AST は 7.7% と高値変化した項目中では最も大きく変化が見られ、また Na も 3.3% と高値となった。一因として濃縮が考えられた。ALP は変化率が 4.0% と高値を示し、 CO_2 は -32.9% と低値を示した。これは CO_2 が大気中へ流出したために試料がアルカリ性に変化したことが原因と考えられた。T-Bil は光と大気に触れることで酸化され低値を示したと考えられる。管理試料はメーカーの保証する使用期限を厳守することが原則である。しかし管理試料は開封日から濃縮や変性が始まっていることを念頭に置入れておくことが必要であり、仮に保証期間内であったとしても、保存状態によっては管理試料の濃縮や変性の可能性はあり、変化しやすい項目を把握しておくべきであると考ええる。

【結語】

当院で用いている管理試料の開封からの安定性を確認した。管理試料は開封日から濃縮や変性が始まっており、その特徴を把握して使用すべきである。

2. HPLC を用いた HbA1c 分離における異常ヘモグロビン検出状況と問題点について

木下 真紀, 嶋田 昌司, 松尾 収二
天理よろづ相談所病院 臨床検査部

当院では、2015 年 5 月より、2 種類の測定モードに切り替え可能で、頻度の高い変異ヘモグロビンを検出する機能を付加した HbA1c 分析装置「アダムス A1cHA-8180V」を導入した。今回、8180V に使用経験と運用上の注意点について報告する。

【使用機器および方法】

HbA1c 測定は、アークレイ社製の「アダムス A1c HA-8180V」を用いた。8180V は、従来の測定器と同様の性能を有する Fast モード (F モード) と異常ピークの分離能が高い Variant モード (V モード) を選択できる。検出可能な異常ピークは、F モードでは HbE および HbD の 2 種類で、検出した場合は実測値を約 1.1 倍に補正する。一方、V モードでは HbE、HbD に加え HbS および HbC が検出可能である。HbE および HbD の補正は F モードと同様であるが、HbS および HbC を検出した場合はその面積を補正して HbA1c を算出する。V モードは異常ピークの検出能に優れるが、専用試薬が必要なためコスト高であり、測定時間も F モードに比べ 2 倍要する。

8180V にて異常ピークを認めた症例は、8180V よりもさらに分離能の高い 8180T を用いた解析をアークレイ社に依頼した。8180T は 8180V よりも溶出時間が長く分離能が高い。そのため、変異ヘモグロビンが原因の異常ピークをより詳細に解析でき、変異ヘモグロビンの可能性を示唆することができる。

今回、異常ピークを示した症例について、2 種類のモードの HbA1c 値を比較し、8180V の問題点を明らかにするとともに運用方法を考察した。

【結果および考察】

8180V を導入した 2015 年 5 月から 2016 年 12 月までの 20 か月間で V モードにて異常ピークを検出したのは 18 例であった。その 18 例中 F モードでも異常ピークを検出したのは 15 例で、残りの 3 例は F モードでは異常ピークを検出しなかった。前者 15 例の内訳は、HbE 疑い 12 例、重複ピーク (HbE と同様の位置に異常ピークを認めるが HbE よりもピークが小さい場合に検出) 2 例、HbF 高値 1 例であり、モードによる異常ピークの種類に差は認めなかった。後者 3 例は、HbS 疑い 2 例と HbD 疑い 1 例であった。HbS は V モードでのみ検出可能であるが、検出した場合にはその面積を補正して HbA1c を演算するため、使用するモードにより HbA1c に差を生じる。

また、HbE を疑うピークを検出した 12 例中 8 例は、8180T の解析結果から HbE の可能性が低い症例であった。HbE を疑うピークを検出した場合、8180V では実測値を 1.1 倍に補正するが、異常ピークが HbE でない場合、補正により HbA1c 値は偽高値となる。そのため、HbE および HbD を疑うピークを検出した場合には 8180V の測定値を報告すべきではない。

現在、当検査室では全検体を V モードで測定しているが、F モードに比べ測定時間が 2 倍であり専用試薬が必要でコスト高となっている。今後は初回検査時のみ V モードで測定し、異常ピークの見られなかった症例の 2 回目以降は F モードで測定するなどの使い分について検討している。

【まとめ】

8180V 導入後、異常ピークの検出率は増加した。また、8180V の V モードは F モードに比べ異常ピークの分離能は優れているが、検出した異常ピークの原因が変異ヘモグロビンと確定することはできない。そのため異常ピークを検出した場合の測定値は報告すべきではない。また、使用するモードにより測定値に差を生じる場合があるため、運用方法の工夫と異常ピーク検出時の対応を統一する必要がある。

3. 一般検査にて異型細胞疑いとった所見の後ろ向き調査

川 健司

天理よろづ相談所病院 臨床検査部

【はじめに】

当院の尿一般検査数は1日に約400検体の依頼で、そのうち尿沈渣の依頼があり、フローサイトメトリーによる分類で異常と判断し、顕微鏡にて検査を行っているのは約100検体である。鏡検は1人の技師が担当している。沈渣の所見のうち、「異型細胞疑い」は1日約1検体の頻度で報告している。今回、尿細胞診検査結果と尿一般検査における「異型細胞疑い」との一致率を調査したので報告する。

【対象と方法】

2014年1月から2016年10月までに尿細胞診検査結果で陽性（クラス3～5）で同時に尿一般検査が実施されていた検体合計355検体について一致率等を調査した。

【結果および考察】

尿細胞診検査の結果、クラス3となった検体は152検体、クラス4は114検体、クラス5は89検体あった。そのうち、尿一般検査で異型細胞疑い陽性と報告した検体は、クラス3は126検体で82.9%、クラス4は104検体で91.2%、クラス5は84検体で94.4%で悪性度が高いほど一致率も高くなった。尿細胞診ではクラス5であったが尿一般検査にて異型細胞疑いと報告できなかった5例に注目し検査成績を調査すると白血球、赤血球が多数の症例が多く見られ見落としの原因と考えられた(表)。なお、5例の鏡検の担当者は、入力しているが6か月間の保存期間がないため検索できなかった。今度のシステムでは検査成績同様の期間保存される予定である。

クラス5で、尿一般検査でも異型細胞疑い陽性と報告した48症例（84検体）のうち、調査期間内で初回検査症例は9例あり、尿細胞診検査の依頼目的の内訳は3例は他院からの紹介精査、4例は肉眼的血尿を認めたことから尿細胞診検査が依頼され、1例は8年前の膀胱がんが再発した症例であった。残る1例は尿一般検査で異型細胞疑いを報告したのち、尿細胞診検査が追加され、膀胱がんが診断された症例であった。尿異型細胞疑いを積極的に報告することで、膀胱がんが診断された症例がある。このことから異型細胞を見落とさないためには今後も鏡検の技術を保ち、向上させる必要がある。

【結語】

今回、過去2年10か月間の尿細胞診検査結果と尿一般検査結果の比較を実施した。悪性度が高いほど一致率は高かった。クラス5で異型細胞疑いを報告していない5例は赤血球、白血球等の細胞成分が多数出現しており、見落とししている可能性があると思われた。鏡検時はこれらのことに注意して異型細胞疑いを見落とさないようにすることと、今後も鏡検の技術を保ち、向上させる必要がある。

症例 No	赤血球	白血球
1	50-99/HPF	5-9/HPF
2	50-99/HPF	≥100/HPF
3	50-99/HPF	50-99/HPF
4	≥100/JPF	50-99/HPF
5	5-9/HPF	50-99/HPF

4. 炎症性腸疾患における便中カルプロテクチン、便中ラクトフェリンの同時測定

牧 亜矢子^{1), 3)}, 青松 友槻²⁾, 池本 敏行¹⁾, 井上 敬介^{2), 4)}, 余田 篤²⁾
金山 敦子¹⁾, 井地 陽子¹⁾, 河野 江利子¹⁾, 伊藤 光宏³⁾, 岡田 仁克¹⁾

¹⁾ 大阪医科大学附属病院中央検査部, ²⁾ 大阪医科大学小児科

³⁾ 神戸大学大学院保健学研究科, ⁴⁾ 市立ひらかた病院小児科

【目的】

カルプロテクチンは好中球の細胞質に多く含まれるカルシウム結合蛋白で、S100A8 と S100A9 の二つの蛋白からなる複合体である。ラクトフェリンも好中球の特殊顆粒に多く含まれる糖蛋白である。炎症性腸疾患(IBD)においてカルプロテクチンおよびラクトフェリンは、炎症刺激により好中球より放出され、便中に逸脱することから便中カルプロテクチン(F-Cp)および便中ラクトフェリン(F-Lf)が内視鏡検査の代替マーカーとして有用であることが報告されている。今回、IBD 患者検体において F-Cp と F-Lf を同時に測定し、両者の関連性について検討したので報告する。

【対象および方法】

対象は、本学附属病院に入院あるいは通院中の小児科患者検体で、潰瘍性大腸炎 49 例 626 検体、クローン病 38 例 462 検体の計 1088 検体。

方法は、アルフレッサファーマ社製のヘモテクト NS-Prime を使用し、専用容器で採取した便は金コロイド凝集法を原理とした専用試薬を用い測定した。

【結果および考察】

健常者 16 名における F-Cp および F-Lf の参考値 (mean±SD) は、F-Cp:57.1±46.5 μg/g、F-Lf:9.6±5.4 ng/mL であった。潰瘍性大腸炎患者検体 (n=626) における F-Cp と F-Lf の相関は $r=0.707$, $y=0.597x+145.9$ 、F-Cp と便中ヘモグロビン (F-Hb) の相関は、 $r=0.3416$, $y=5.365x-2266.4$ であった。クローン病患者検体 (n=462) における F-Cp と F-Lf の相関は、 $r=0.572$, $y=0.3219x+204.9$ 、F-Cp と F-Hb の相関は $r=0.071$, $y=0.2074x+91.0$ であった。

症例別の経過観察では、潰瘍性大腸炎、クローン病ともに F-Cp と F-Lf の変動はよく連動しており、多くは F-Cp > F-Lf の関係にあったが、潰瘍性大腸炎の一部の症例では F-Lf が F-Cp より高値傾向を示していた。クローン病においては、F-Hb が大腸がん検診におけるカットオフ値 100 ng/mL 以下 (陰性) の症例であっても F-Cp や F-Lf は高値であり、F-Cp や F-Lf が F-Hb 陰性のクローン病の診断や疾患活動性の指標として有用であることが確認された。

好中球細胞外トラップ (NETs) の過剰産生や NETs がうまく分解されない様々な炎症性疾患や自己免疫疾患につながるとされている。またラクトフェリンが NETs の放出を抑制すると報告されていることから、今後、炎症性腸疾患の重症度や治療反応性などと F-Cp と F-Lf の変動について解析を進めたいと考えている。

【結語】

炎症性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎患者において、F-Cp と F-Lf はよく相関しており、共に炎症性腸疾患のモニタリングに内視鏡検査の代替マーカーとして有用であることが強く示唆された。

5. 細胞株を用いたプレセプシン産生系モデル確立に関する検討

溝越 祐志、澤村 暢、鈴木 高史
神戸常盤大学保健科学部 医療検査学科

【目的】

プレセプシンは敗血症時に血中濃度が上昇するバイオマーカーであり、単球および好中球が細菌を貪食することで産生される。また、単球や好中球の細胞膜上に発現している CD14 が貪食により分解された N 末端フラグメントがプレセプシンであることが報告されている。今まで初代培養細胞を用いて産生系が検討されてきたプレセプシンだが、今回我々は細胞株でのプレセプシン産生モデル系の構築を目指し、HL-60 を用いたプレセプシン産生を評価したので報告する。

【材料および方法】

同意を得た健常人末梢血から分離した単核球及び HL-60 を使用した。HL-60 に活性型ビタミン D である $1\alpha,25\text{-Dihydroxyvitamin D}$ を 100 nM 添加し、単球系に分化させた後、大腸菌刺激によるプレセプシン産生を検討した。また、貪食の評価として GFP 発現大腸菌刺激後、フローサイトメトリーにより細胞中の蛍光大腸菌の定量を行った。プレセプシンの測定には自動免疫発光測定装置パスファーストを用いた。

【結果】

1. HL-60 に活性型ビタミン D を添加すると細胞膜上の CD14 の発現が促進された。2. GFP 発現大腸菌を添加することで、HL-60 細胞の蛍光強度が上昇し、菌が貪食されていることが示唆された。3. HL-60 に大腸菌を添加することで培養上清中のプレセプシン濃度は有意に上昇した。

【結語及び考察】

HL-60 を単球系に分化させることで、初代培養細胞と同様にプレセプシンが産生された。in vitro における HL-60 を用いたプレセプシン産生系は、プレセプシンの産生機序を解明するモデルとして有用であると考えられる。

6. シアル化糖鎖抗原 KL-6 測定試薬の基礎的検討

中村 睦美¹⁾, 岡崎 一幸¹⁾, 志賀 修一¹⁾, 一山 智²⁾

¹⁾ 京都大学医学部附属病院検査部

²⁾ 京都大学大学院臨床病態検査学

【はじめに】

シアル化糖鎖抗原（以下 KL-6）はⅡ型肺胞上皮細胞由来の MUC-1（ムチン）である。KL-6 は間質性肺炎のモニタリングや治療効果判定に有用な優れたバイオマーカーであり、院内測定は大いに診療支援となる。現在、本院における KL-6 測定は委託検査で STACIA (LSI メディエンス) の「ステイシア CLEIA KL-6 エーザイ」にて測定しているが、今回、臨床側からの要望を受け KL-6 を院内導入することになり、3 社の試薬の比較検討を行ったので報告する。

【対象および方法】

対象検体は 2016 年 10 月 6 日から 10 月 21 日までに KL-6 の測定依頼があった 352 名のべ 359 検体で、男性 150 名（155 検体）、平均 66 歳（24～88 歳）、女性 202 名（204 検体）、平均 63 歳（6～89 歳）を対象とした。検討機器、試薬および測定方法は、ルミパルス G1200（富士レビオ社）「ルミパルス KL-6 エーザイ」（CLEIA 法）、TBA2000FR（東芝）「ナノピア KL-6 エーザイ」（ラテックス凝集法）と「LZ テスト‘栄研’KL-6」（ラテックス凝集法）を検討した。検討内容は、①同時再現性、②日差再現性、③希釈直線性、④検出限界、⑤共存物質の影響、⑥現行法との相関を実施した。

【結果】

①同時再現性の CV は「ルミパルス」1.7～2.3%、「ナノピア」0.6～4.6%、「栄研」0.8～1.8%であった。②日差再現性の CV は「ルミパルス」1.6～2.6%、「ナノピア」0.5～5.0%、「栄研」1.0～7.3%であった。③「ルミパルス」は 4000 U/mL、「ナノピア」は 5000 U/mL、「栄研」6000 U/mL まで希釈直線性が得られた。④検出限界は「ルミパルス」11 U/mL、「ナノピア」30 U/mL、「栄研」15 U/mL であった。⑤は概ね良好な結果が得られた。⑥現行法との相関では、ルミパルスが $y=0.94x-16.43$ $R^2=0.96$ 、ナノピアが $y=0.86x+14.78$ $R^2=0.92$ 、栄研が $y=0.92x-34.13$ $R^2=0.71$ であった。また、栄研での乖離例と思われる 4 例を除いて再検討した結果、 $y=0.73x+48.05$ $R^2=0.86$ となった。

【考察】

今回、KL-6 の院内導入に伴い、3 社の試薬の比較検討を行った。その基礎性能は、3 社とも概ね良好な結果が得られた。相関に関しては、現行法と測定方法および標識抗体が同じ「ルミパルス」が最も良かった。測定法が異なり、標識抗体が同じ「ナノピア」、測定法が異なり標識抗体も自社開発である「栄研」においても概ね良好な結果であった。また現行法と「栄研」との乖離例については、「栄研」は肺がん患者の KL-6 を高値傾向に捉えるという報告があり、今回の乖離例 4 例も肺癌症例であった。今回比較した 3 社は分析方法や測定時間、試薬の反応性、またキャリブレーターや精度管理物質の調整など様々な点で違いはあるものの試薬性能に大きな問題はなかった。今後、自施設の運用にあった試薬を選定する予定である。

7. パナクリア MMP-3「ラテックス」試薬の性能評価

明石 晶深¹⁾, 木村 茂樹¹⁾, 前田 育宏¹⁾, 日高 洋²⁾

¹⁾ 大阪大学医学部附属病院 医療技術部検査部門

²⁾ 大阪大学医学部附属病院臨床検査部

【目的】

マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 (MMP-3) は関節軟骨の分解に関わる蛋白分解酵素の一種であり、主に関節リウマチの診断や活動性指標として重要である。今回、パナクリア MMP-3「ラテックス」試薬について、以前当施設で問題が指摘されていたプロゾーン検出についてのパラメータが改善されたため再度性能評価を行った。

【材料および方法】

- 測定装置および試薬：自動分析装置 JCA-BM6070 (日本電子 (株)), パナクリア MMP-3「ラテックス」(積水メディカル (株)), MMP-3 キャリブレーター (積水メディカル (株)), MMP-3 コントロール L,H (積水メディカル (株)), プロゾーンチェック (積水メディカル (株)), LZ テスト‘栄研’MMP-3 (栄研化学 (株)), 干渉チェック (シスメックス (株))
- 対象検体：当院検査部にて MMP-3 の測定依頼があった 150 症例の血清検体
- 測定原理：ラテックス免疫比濁法 (Latex turbidimetric immunoassay: LTIA 法)

【結果】

1.再現性：H、L 両レベルのコントロール試料を用いて同時再現性および日差再現性を検討したところ変動係数(CV)はそれぞれ H:0.6 %, L:1.0 % (平均値 425.6 ng/mL, 112.1 ng/mL), H:1.1 %, L:1.5 % (平均値 428.1 ng/mL, 115.4 ng/mL) であった。2.希釈直線性：キャリブレーターおよび患者プール血清いずれも 1000 ng/mL まで原点を通る直線性を認めた。3.定量限界下限：低濃度試料を多重測定して Precision profile を作成したところ CV10%定量限界は 20 ng/mL, CV20%定量限界は 9 ng/mL であった。4. プロゾーン現象：プロゾーンチェック試料を用いて 15000 ng/mL までの高値試料を測定したところ、2700 ng/mL より測定値の低下を認めたが、偽低値試料はエラーフラグを表示することを確認した。5.相関性：LZ テスト‘栄研’を対照試薬とし患者血清 150 検体について測定を行ったところ、相関係数 (r) は 0.929, 回帰式は $y=1.121x-1.400$ であり、1 例で乖離を認めた。乖離検体 1 例と、両試薬の測定範囲外である高値検体 2 例を除いた 147 例における相関係数および回帰式は $r=0.990$, $y=1.124x+1.145$ であった。6.共存物質：干渉チェックを用いて共存物質の影響を検討したところ、乳び、溶血ヘモグロビン、ビリルビン、RF の影響は認めなかった。

【結語および考察】

本試薬は再現性、希釈直線性、定量限界下限、プロゾーン現象および共存物質の影響においていずれも良好な結果であった。特に改良前パラメータにおいてプロゾーン現象が検出できなかった問題が改善されていた。相関性については、Bland-Altman 解析で 400 ng/mL 以上で高値になるほど高値傾向を示した。これは対照試薬の測定上限が 1200 ng/mL と本試薬と比較して低値であり、高濃度域において対照試薬の測定値の低下がみられることが原因であると考えられた。

8. *IFNG*-54CpG の DNA メチル化率と自己免疫性甲状腺疾患の発症・病態予後との関連

橋本 秀美¹⁾、渡邊 幹夫¹⁾、井上 直哉^{1),2)}、森田 詠美¹⁾、日高 洋³⁾、岩谷 良則¹⁾

¹⁾ 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻 生体情報科学講座

²⁾ 大阪大学医学部附属病院 医療技術部

³⁾ 大阪大学医学部附属病院 臨床検査部

【背景・目的】

自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) にはバセドウ病 (GD) と橋本病 (HD) が存在し、その疾患感受性および病態には遺伝因子と環境因子が関与している。これまで我々は遺伝因子として様々な遺伝子多型が AITD の疾患感受性や病態に関与することを明らかにし病態予後予測検査への応用を試みてきた。本研究では、環境因子が AITD の疾患感受性や病態に及ぼす影響を調べるため、後天的な遺伝子発現制御機構のひとつである DNA のメチル化に着目した。IFN- γ は、Th1 細胞や細胞傷害性 T 細胞等により産生される炎症性サイトカインであり、細胞傷害性 T 細胞の活性化を促進する。我々はすでに Th1 細胞比率および IFN- γ 産生が遺伝的に高い個体で HD が重症化することを明らかにした。一方、*IFNG* 遺伝子のプロモーター領域に存在する -54CpG 部位のメチル化は IFN- γ 産生を制御する重要なエピゲノム要因であることが報告されており、*IFNG* 遺伝子のメチル化パターンは AITD の発症・病態予後に影響する可能性があるため、この部位の DNA メチル化率を解析し AITD の病態ごとに比較した。また、メチル化率の生理的変動を明らかにするため、健常群における *IFNG*-54CpG のメチル化率の日内変動および日差変動を調べた。

【対象】

GD 57 名 (難治群 24 名、寛解群 15 名)、HD 59 名 (重症群 23 名、軽症群 20 名)、健常群 26 名を対象とした。また、健常群 13 名を対象としてメチル化率の日内変動および日差変動について調べた。

【方法】

末梢血よりゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト変換後、パイロシークエンス法を用いて *IFNG* 遺伝子の -54CpG における DNA メチル化率を解析した。

【結果】

1. GD と HD のメチル化率は健常群との間で有意な差を認めなかった。
2. GD 寛解群に比べて、GD 難治群のメチル化率は増加していた ($p=0.0203$)。
3. HD 全体および HD 重症群において、-54CpG のメチル化率は年齢と負の相関を示した ($r=-0.36$ $p=0.0067$ および $r=-0.45$ $p=0.0306$)。
4. *IFNG*-54CpG のメチル化率に日内変動を認めなかったが、個体内の日差変動 ($6.2\pm 2.8\%$) を認めた。

【結語】

IFNG-54CpG のメチル化率は GD の難治化に関連していた。また、*IFNG*-54CpG のメチル化率は個体内の日差変動を認めた。