

〈特集：検査技術の新たな展望（2）〉

エクルーシス試薬高感度トロポニンTの紹介

桜井 みどり

Introduction of EcLusys high-sensitivity Troponin T

Midori Sakurai

Summary The European Society of Cardiology (ESC), the American College of Cardiology Foundation (ACCF), the American Heart Association (AHA), and the World Heart Federation, made up a Task Force that published the Universal Definition of MI expert consensus document in 2007. This document contains Troponin optimal precision, as described by the coefficient of variation [CV] at the 99th percentile URL and should be defined as $\leq 10\%$. The EcLusys high-sensitivity Troponin T was released in 2010 in Japan, and this high-sensitivity assay meets the Universal Definition of the MI requirement. The high-sensitivity troponin T assay has been expected to build up new clinical utility; not only for early diagnosis of the acute myocardial infarction patient but detection of small myocardial damage as a prognosis indicator for Heart Failure patients.

Key words: High-sensitivity troponin T, Myocardial infarction, EcLusys Troponin T, Cardiac marker

I. 心筋トロポニンTについて

心筋トロポニンTは分子量37 kDの心筋収縮調整蛋白の1つで、トロポニンT、トロポニンI、トロポニンCとトロポニン複合体を形成し筋収縮の調整を行っている（図1）。心筋トロポニンTは、心筋細胞内で約94%は心筋細胞の構造フィラメント上に、残りの6%は細胞質に可溶性分画として存在している（図2）。なんらかの原因により心筋傷害が発生すると、まず、細胞質中の心筋トロポニンTが血中に流出しはじ

め、傷害が継続すると筋原線維からの心筋トロポニンTが血中に流出する。この心筋トロポニンTは心筋特異性が高いため、心筋梗塞をはじめとする虚血性心疾患の診断に積極的に活用されている。

II. 心筋マーカーの歴史とトロポニン測定系の高感度化

心筋梗塞診断のためのバイオマーカーとして1950年以降にCK（クレアチニンキナーゼ）が

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
IVD事業本部・LCM部門、免疫・生化学検査部
循環器・新規マーカーグループ
〒105-0014 東京都港区芝2-6-1

Roche Diagnostics K.K.,
Cardio-Renal & New Markers IM & CC,
In Vitro Diagnostics, Life Cycle Management,
2-6-1 Shiba, Minato-ku, Tokyo 105-0014, Japan

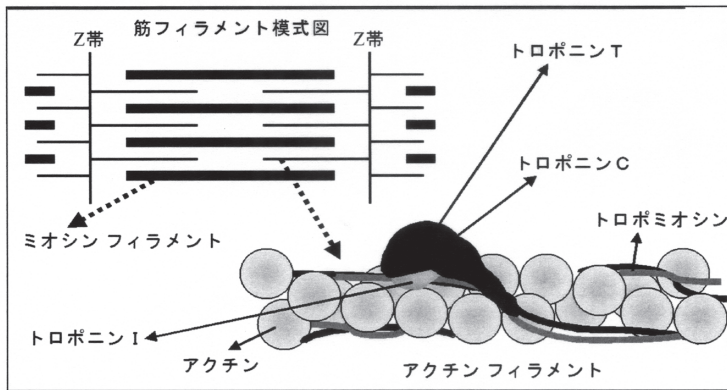


図1 心筋トロポニンの構造

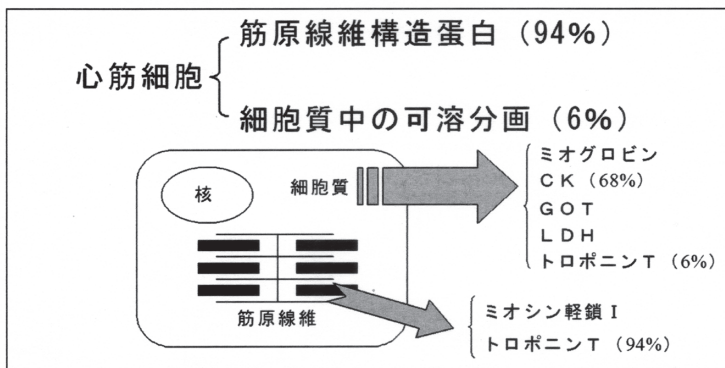


図2 心筋細胞内のバイオマーカーの局在

測定され始め、その後CK-MB活性、CK-MB蛋白定量が主流の時代が続いた。1990年前後にさらに心筋特異性の高い心筋トロポニンが発見され、心筋梗塞診断のためのバイオマーカーとしてトロポニンが測定され始めた。2000年9月にESC（ヨーロッパ心臓病学会）/ACC（アメリカ心臓病学会）から発表された急性心筋梗塞診断改定¹⁾により、生化学診断は、従来のCKに変わりトロポニンが第一選択に選定された。その後2007年、ACC（米国心臓病学会）/AHA（アメリカ心臓協会）/ESC（欧州心臓病学会）/WHF（世界心臓財団）の共同タスクフォースから、心筋梗塞の診断基準が全面改訂された「心筋梗塞のUniversal Definition（ユニバーサルディフィニション）」²⁾が発表され、その中で、心筋に特異性のあるバイオマーカーはトロポニンであり、診

断のための基準は健常人の99%tile値以下でのCVが10%未満を示すトロポニン測定が推奨された。ロシュ・ダイアグノスティックスではこの基準に合わせ、健常人の99%tile値0.014 ng/mL（14 ng/L）でCV10%未満の精度を持つ高感度試薬の開発が行われ、日本でも2010年に「高感度トロポニンT」を発売。Universal Definition以外にも、欧米で2007年に報告された「国立臨床生化学検査アカデミーによる心不全のバイオマーカーガイドライン」では、「心不全のリスク評価」に関して初めて心筋トロポニン測定が紹介され、心不全においてBNPに次ぐバイオマーカーとして認識されるようになり³⁾、トロポニン測定での「高感度化」の重要性が広まってきている。

表1 エクルーシス試薬トロポニンTの歴史

世代	第一世代	第二世代	第三世代	高感度
製品名	エンチムンテストトロポニンT	エンチムンテストトロポニンT II エクルーシス トロポニンT II	エクルーシス トロポニンT III	エクルーシス トロポニンT-hs
使用抗体	心筋TnT特異モノクローナル抗体 +抗TnTモノクローナル抗体	2種類の心筋特異抗体の使用 心筋TnT特異モノクローナル抗体 +心筋TnT特異モノクローナル抗体		心筋TnT特異モノクローナルキメラ抗体 +心筋TnT特異モノクローナル抗体
標準品 キャリア	ウシ心筋由来TnT		ヒトリコンビナント心筋TnT	
問題点と 改良点	交差反応性の報告があり、腎障 害、筋ジストロフィーなどで高値報 告あり	交差反応性の問題が解消され、腎障 害、骨格筋傷害での偽陽性が解消。 希釈直線性の不良が報告される。	直線性の改善、再現性の向上	キメラ抗体によりHAMAの影響を回避 ヒトIgG/Fabポリマーにより抗ヒト抗体の影響回避 Bovine Fab-Rhodumにより抗ルテニウム抗体の 影響を回避

表2 同時再現性

単位: ng/ml

サンプル	HS 1	HS 2	HS 3	Control 1	Control 2
1	0.022	0.326	2.852	0.028	1.888
2	0.023	0.324	2.826	0.026	1.898
3	0.022	0.325	2.831	0.026	1.886
4	0.023	0.325	2.852	0.026	1.896
5	0.021	0.324	2.839	0.025	1.888
6	0.022	0.324	2.813	0.025	1.904
7	0.022	0.323	2.824	0.026	1.898
8	0.021	0.327	2.842	0.025	1.904
9	0.022	0.330	2.851	0.027	1.895
10	0.022	0.326	2.828	0.026	1.900
11	0.022	0.322	2.849	0.026	1.895
12	0.022	0.323	2.840	0.026	1.926
13	0.022	0.327	2.829	0.025	1.898
14	0.023	0.323	2.849	0.026	1.903
15	0.023	0.322	2.843	0.026	1.884
16	0.022	0.323	2.849	0.027	1.887
17	0.022	0.322	2.874	0.026	1.917
18	0.022	0.324	2.842	0.026	1.903
19	0.023	0.325	2.876	0.026	1.921
20	0.021	0.328	2.845	0.028	1.880
21	0.021	0.325	2.847	0.026	1.930
平均	0.022	0.325	2.843	0.026	1.900
SD	0.0006	0.0021	0.0151	0.0007	0.0137
CV	2.5%	0.6%	0.5%	2.6%	0.7%

Ⅲ. エクルーシス試薬トロポニンTの歴史

1990年、エクルーシス試薬のトロポニンTの前製品となるエンチムンテストトロポニンTが発売され、心筋トロポニンT試薬の販売が開始された。この第1世代の測定系は心筋トロポニンT以外にも骨格筋トロポニンTと一部交差反応性が認められていたがその後、第1世代から第2世代への改良で腎障害・筋ジストロフィーなどによる骨格筋トロポニンTとの交差反応が改善された。第2世代から第3世代への改良では

希釈直線性の改善・再現性の向上など、試薬の改良による特異性の向上を図り、現在は使用している一部の抗体をキメラ抗体とし高感度化を実現した高感度トロポニンTとなった。高感度トロポニンTはこの抗体のキメラ化により、高感度化に伴う非特異的反応、とりわけHAMAの影響をさらに受けにくくしたなどの改善を行っている(表1)。

Ⅳ. エクルーシス試薬高感度トロポニンTの性能

表3 日差再現性

単位:ng/ml

サンプル	HS 1	HS 4	HS 6	Control 1	Control 2
1	0.023	0.321	2.813	0.027	1.903
2	0.022	0.322	2.839	0.024	1.885
3	0.021	0.314	2.769	0.025	1.884
4	0.023	0.324	2.838	0.025	1.903
5	0.022	0.320	2.787	0.026	1.874
6	0.021	0.315	2.725	0.024	1.825
7	0.020	0.305	2.724	0.025	1.826
8	0.021	0.315	2.695	0.025	1.872
9	0.022	0.320	2.743	0.025	1.874
10	0.021	0.316	2.699	0.025	1.826
平均	0.021	0.317	2.763	0.025	1.867
SD	0.0010	0.0055	0.0544	0.001	0.031
CV	4.6%	1.7%	2.0%	3.4%	1.6%

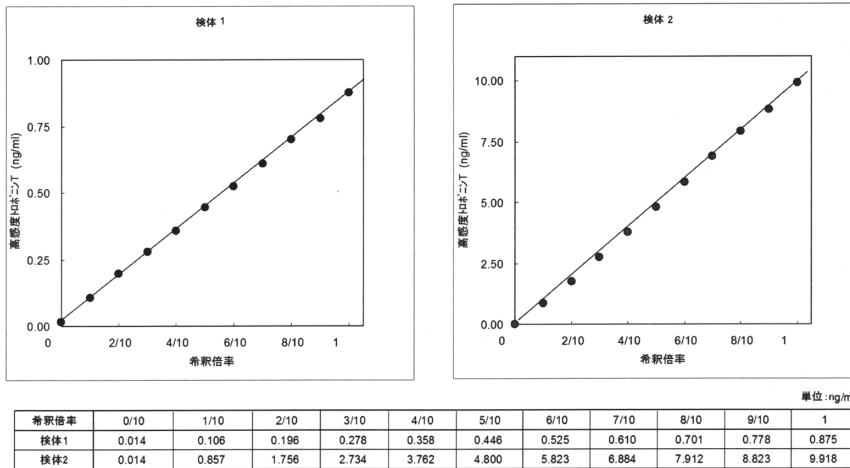


図3 希釈直線性

社内検討にて、高感度トロポニンTの基礎検討を行った。分析装置はModular Analytics Eを使用した。また、既存法としては「エクルーシス試薬トロポニンTⅢ」を用いて比較検討を行った。結果は以下に示すが、同時・日差再現性、希釈直線性は良好な結果であった。共存物質の影響を確認したところ、ビリルビン、乳びは影響を与えなかった。ヘモグロビン濃度：100 mg/dL、ビオチン：20 ng/mLまでは測定値への影響が-10%以内であることが確認された。実

効感度 (CV10%値)は0.013 ng/mL (13 ng/L)を示し、健常人の99パーセンタイル値である0.014 ng/mL (14 ng/L)以下であることから、本試薬はESC/ACC/AHA/WHFが推奨する高感度測定試薬であることが確認された。

1) 同時再現性

5濃度の試料をN=21にて測定を行い、各濃度共にCV 2.6%以下の良好な結果を得た(表2)。

2) 日差再現性

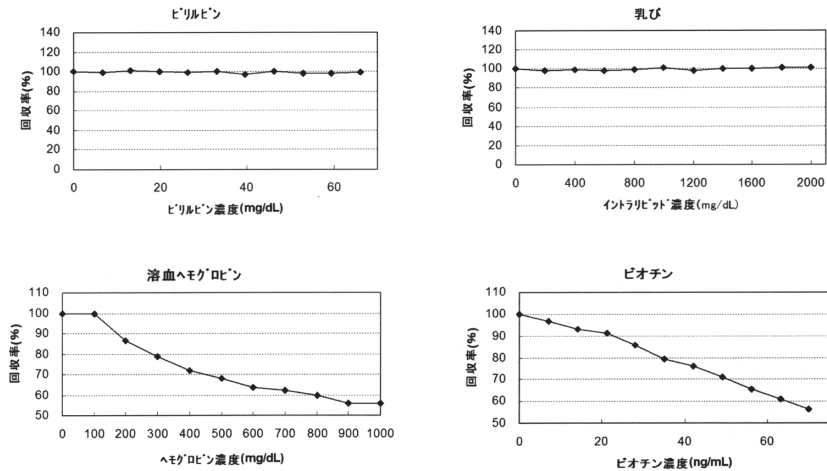


図4 共存物質の影響

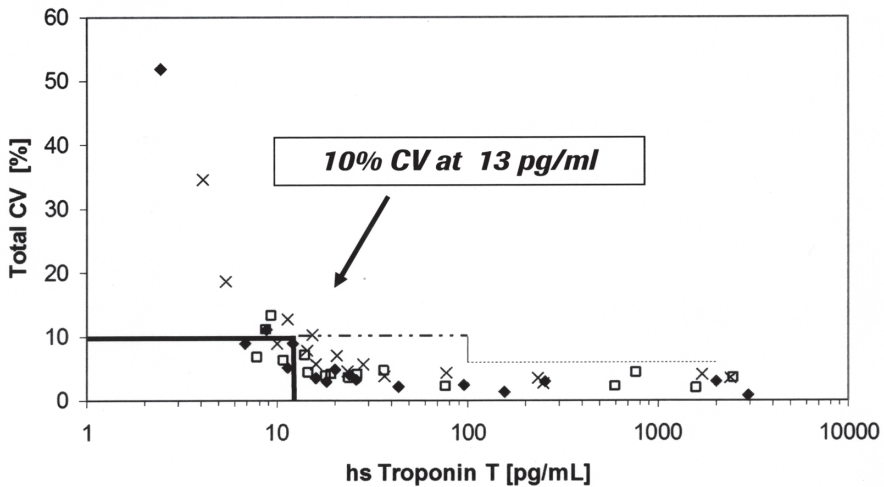


図5 実効感度の検討

10日間にわたり5濃度の試料の測定を行い、各濃度共にCV 4.6%以下の良好な結果を得た(表3)。

3) 希釈直線性の検討

2種類の試料をエクルーシス検体希釈液MAで調製した希釈系列を用いて希釈直線性を測定したところ、各試料共に原点を通る良好な直線性が確認された(図3)。

4) 共存物質の影響

共存物質の影響を確認したところ、ビリルビ

ン、乳びは影響を与えませんでした。ヘモグロビン濃度：100 mg/dL、ビオチン：20 ng/mL以上では測定値への影響が-10%を超えることが確認された(図4)。

5) 実効感度の検討

低濃度血清を各濃度N=1で10日間測定し、CV%からPrecision Profileを作成し、CV10%の濃度を実効検出感度としたところ、13 pg/mL = 0.013 ng/mLの値が得られた(図5)。

6) 既存法(トロポニンTⅢ)との比較

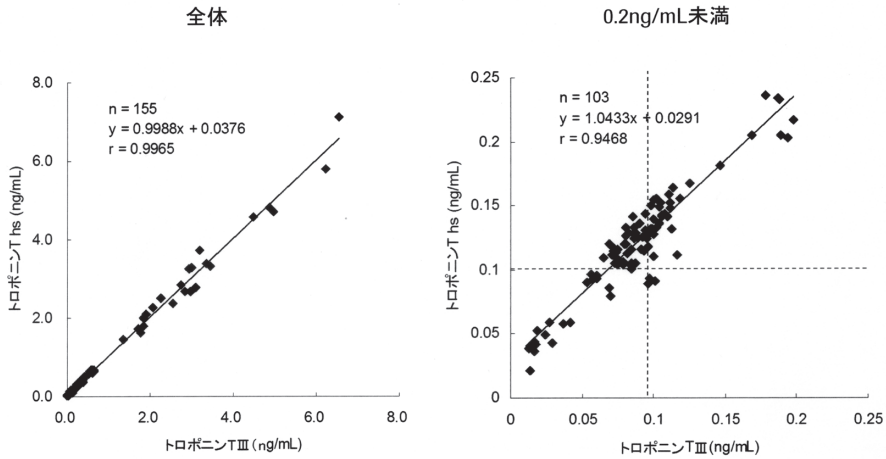


図6 相関データ（従来品トロポニンTⅢ vs. トロポニンhs）

155名の患者血清を用いて従来品エクルーシス試薬トロポニンTⅢとの相関において評価した結果、相関係数 $r=0.99965$ 、回帰式 $y=0.9988x+0.0376$ と非常に良好な相関性が確認された（図6）。

V. 急性心筋梗塞診断における高感度トロポニンTの有用性

大半は筋原線維の構造蛋白である心筋トロポニンTは、従来、心筋梗塞発症後3～4時間前後より上昇し始め、超急性期の診断には課題があると考えられていたが、高感度トロポニンTでの測定により、超急性期の心筋梗塞の検出感度が上昇することが期待されている。実際に日本で行われた高感度トロポニンT多施設研究により、発症から24時間以内に来院した急性心筋梗塞疑いの患者で、来院時の従来トロポニンTが0.1 ng/mL (100 ng/L) 未満の85例を対象に、各種心筋マーカーの急性心筋梗塞早期診断能が分析され、高感度トロポニンTは胸痛発現から2時間で感度と陰性的中率 (NPV) が100%という報告であった⁹⁾。一方、特異度は発症から2～4時間で86%と急性心筋梗塞以外の要因でも陽性となることが認められている。高感度化により微細な心筋傷害を検出してしまうことから起こる特異度の問題ではあるが、海外ガイドラインなどに記載されている心筋梗塞診断フロー

チャートには初回トロポニンT測定から3時間後までの変化値を併用し、2ポイント測定を行うことで特異度の問題を克服できると考えられている。

VI. 心不全患者における高感度トロポニンT測定の意義

高感度トロポニンT測定で最も重要な使用方法は急性心筋梗塞の早期診断であると考えられるが、この高感度化による測定感度の高さから、心不全においても微小心筋傷害を検出できることが報告されている。実際に、慢性心不全の多施設研究であるVal-HeFT試験のサブ解析において、4,053例の慢性心不全患者を対象に高感度トロポニン値と慢性心不全の予後予測の検討が行われた。結果、従来の測定系であるcTnT（検出限界0.01 ng/ml (10 ng/L)）は10%の患者で検出されたが、hs-TnT〔検出限界0.001 ng/ml (1 ng/L)〕は92%の患者で検出され、中央値は0.012 ng/ml (12 ng/L) と非常に低値であった。また、わずかなhs-TnTの数値の差が予後の差に反映することが示されている⁹⁾。The Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) データベースから、観察開始時のトロポニンT値が高値であるほど院内予後が不良であったとの報告があり、急性心不全の予後予測管理についても今後高感度トロポニンTが使用される可能性も

示唆された⁶⁾。

Ⅶ. 健常者を測定する意義、健康診断への応用について

トロポニン測定の高感度化により心血管イベントの予後予測が可能となると、健常者を対象とした健康診断への応用も期待される。ARIC試験やCardiovascular Health Studyの結果より、0.014 ng/ml前後の一見、心筋梗塞で検出される基準値から考えると正常と思われる前後の数値であっても、約10年後の予後予測因子であることが判明してきた^{7), 8), 9)}。また、観察開始時の数値が高値であるほど予後不良であり、経過中のhs-TnT値の上昇も予後不良であることが報告されている¹⁰⁾。

Ⅷ. 腎疾患患者とトロポニンT測定

心筋トロポニンは腎臓で排泄されるため、腎不全患者では値が高値になることが知られており、腎不全患者では偽陽性となっているのではないかと考えられることがある。しかしながら腎不全患者でのトロポニン陽性も心筋になんらかの傷害があり血中にトロポニンTが流出していることを表すと考えられ、心筋トロポニンTが高値であった場合には将来の心血管イベントの強い予測指標となり得ると考えられる。胸痛を伴う虚血性心疾患疑いのある透析患者を除くCKD患者7,033例を対象に来院時トロポニンT測定値と観察期間30日における予後との関連性を評価した論文では、トロポニンT高値群は低値群と比較し死亡・心筋梗塞の発症率が高かったとの結果が出ており、トロポニンTの上昇が微小心筋梗塞または潜在性心筋傷害を反映していたとの報告であった¹¹⁾。また、透析患者143例を対象とし、観察開始時トロポニンTと予後との関係を3.5年間観察した論文では、従来のトロポニンT、高感度トロポニンT低値群は共に予後良好であり、特に高感度TnT低値(0.024 ng/mL未満)ではNPV100%の結果が得られたとの報告がある¹²⁾。アメリカのKDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiatives) のclinical practice guidelines for cardiovascular disease in dialysis patientsにも“無症候性心筋傷害、とりわけ臨床

所見が認められない、あるいは他のACSマーカーが陰性の場合、トロポニンT測定は透析患者のリスク層別化に有用である”といった内容でトロポニンT測定について記載されており、透析患者の死亡の予測因子として非常に有用であると言及されている¹³⁾。

Ⅸ. まとめ

エクルーシス試薬トロポニンTはESC/ACC/AHA/WHFが推奨する高感度測定試薬の基準を満たした高感度試薬であり、日本国内の検討でも胸痛発現後2時間以上であれば感度・陰性的中率共に100%という結果がでたことから、高感度化により急性心筋梗塞の急性期診断の有用性が増したと考えられる。また、高感度化により低値のトロポニンT測定値の信頼性が増し、微小心筋傷害が検出可能となり、急性冠症候群(ACS)以外の疾患(心不全など)の予後予測などで活用されることも期待される。腎疾患患者における、トロポニンT上昇は、単なる腎機能障害によるクリアランスの低下の影響ではなく、心血管リスクを反映したものであり、とりわけ透析患者は心筋梗塞のハイリスク群であり、トロポニンT測定はリスク管理において期待される。

引用文献

- 1) Alpert J, et al.: The Joint ESC/ACC committee, EHJ, 21: 1502-1513, 2000.
- 2) Thygesen K, et al.: Universal Definition of Myocardial Infarction. EHJ, 28: 2525-2538, 2007.
- 3) Tang WH, et al.: National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. Circulation, 116: e99-e109, 2007.
- 4) Kitamura M, et al.: High-sensitivity cardiac troponin T for earlier diagnosis of acute myocardial infarction in patients with initially negative troponin T test-Comparison between cardiac markers. J Cardiol, 62(6): 336-342, 2013.
- 5) Latini R, et al.: Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure. Circulation, 116(11): 1242-1249, 2007.
- 6) Peacock WF 4th, et al.: Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. N Engl J Med, 358(20): 2117-

- 2126, 2008.
- 7) Saunders JT, et al.: Cardiac troponin T measured by a highly sensitive assay predicts coronary heart disease, heart failure, and mortality in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation*, 123(13): 1367-1376, 2011.
 - 8) Defilippi CR, et al.: Association of serial measures of cardiac troponin T using a sensitive assay with incident heart failure and cardiovascular mortality in older adults. *JAMA*, 304(22): 2494-2502, 2010.
 - 9) Otsuka T, et al.: Association between high-sensitivity cardiac troponin T levels and the predicted cardiovascular risk in middle-aged men without overt cardiovascular disease. *Am Heart J*, 159(6): 972-978, 2010.
 - 10) Saunders JT et al.: Cardiac troponin T measured by a highly sensitive assay predicts coronary heart disease, heart failure, and mortality in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circ*, 23(13): 1367-1376, 2011.
 - 11) Aviles RJ, et al.: Troponin T levels in patients with acute coronary syndromes, with or without renal dysfunction. *N Engl J Med*, 346(26): 2047-2052, 2002.
 - 12) McGill D, et al.: Over time, high-sensitivity TnT replaces NT-proBNP as the most powerful predictor of death in patients with dialysis-dependent chronic renal failure. *Clin Chim Acta*, 411(13-14): 936-939, 2010.
 - 13) K/DOQI work group: K/DOQI clinical practice guidelines for cardiovascular disease in dialysis patient. *Am J Kidney Dis*, 45: S1-S153, 2005.