



〈企業特集（第31・32回合同年次学術集会より）〉

「リムセイブ MT-7500」を用いた (1→3) -β-D-グルカン測定試薬「β-グルカン シングルM30テストワコー」の基礎的検討

藤井 勉、村上 尚子、角田 恭一

Basic study of a (1→3)-β-D-glucan assay using colorimetric method on LIMUSAVE MT-7500.

Tsutomu Fujii, Naoko Murakami, Kyoichi Sumida

Summary (1→3)-β-D-glucan (β-glucan) is a cell wall component commonly found in fungi. Small quantities are released into the blood during systemic fungal infections, and the measurement of β-glucan in blood is used to diagnose such fungal infections. β-glucan can be easily measured in plasma samples to diagnose fungal infections, whereas traditional blood culture tests often take more than a week and are difficult to perform. β-glucan can be clinically assayed to support the diagnosis of systemic fungal infections, such as candidemia, pulmonary aspergillosis, and pneumocystis pneumonia. The LAL (Limulus amoebocyte lysate) reagent, which is made from a horseshoe crab blood cell extract, is used to measure β-glucan levels. FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation has developed a colorimetric reagent that shortens the measurement time to 20 minutes using the analyzer “LIMUSAVE MT-7500.” The LIMUSAVE MT-7500 system will enable a shortened assay time and the rapid reporting of clinical results, contributing to the early diagnosis and treatment of systemic fungal infections.

Key words: β-glucan, Fungal infections, LAL, Colorimetric assay

I. はじめに

(1→3)-β-D-グルカン（以下、β-グルカン）は真菌に共通する細胞壁構成成分であり、深在性真菌感染の診断補助として、血液中のβ-グルカン測定が利用されている。深在性真菌症の診断において、培養検査は時間を要する場合や培養検査自体が困難である場合が多く、β-グルカン測定は血液を用いて簡便に行うことができる。β-グルカンは、カン

ジダ血症、肺アスペルギルス症、ニューモシスチス肺炎など、深在性真菌感染の診断補助を目的に臨床で測定されており、胸部CTなどの画像所見での鑑別が困難な症例にも活用される¹⁾。

近年、医療の進歩により免疫抑制を伴う造血幹細胞移植や臓器移植が増えており、β-グルカン測定件数も増加している。また、最近では外来でのリウマチ治療の際にも測定されるようになり、迅速測定のニーズは増している。

富士フイルム和光純薬株式会社
臨床検査薬学術開発本部 西日本学術部
〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
Tel : +81-6-6203-2034
Fax: +81-6-6203-1917
E-mail: tsutomu.fujii@fujifilm.com

West Area Technical Service Department, Diagnostics
Technical Service & Development Operations,
FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation
3-1-2 Doshomachi, Chuo-ku, Osaka 540-8605, Japan

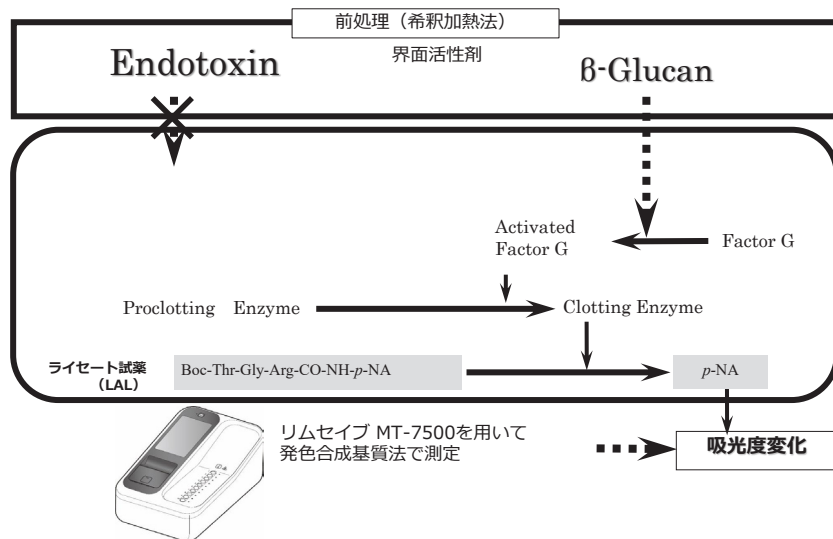


Fig. 1 LAL試薬を用いたβ-グルカン測定原理

β-グルカンの測定には、LAL (Limulus amoebocyte lysate) 試薬が用いられている²⁻⁴⁾。LAL試薬とは、カプトガニから採血して集めた血球細胞より抽出した原料を元に調製された試薬である。元来LAL試薬はエンドトキシンの高感度検出試薬として開発され、注射用医薬品や人工透析液、医療器具等のエンドトキシン試験に広く用いられている⁵⁾。

この度、我々はLAL試薬を用いて測定時間を20分と短縮した発色合成基質法試薬「β-グルカン シングルM30テストワコー」を開発したので、富士フイルム(株)の開発した測定用装置「リムセイブ MT-7500」と合わせて、その測定原理および基礎的性能について報告する。

II. リムセイブ MT-7500 を用いた測定の概要

1) 発色合成基質法の測定原理

Fig. 1に示すように、本試薬はLAL中の成分であるFactor Gが血漿検体中のβ-グルカンにより活性化され、カスケード反応が開始する²⁻⁴⁾。Clotting Enzymeの基質として発色合成基質 (Boc-Thr-Gly-Arg-CO-NH-p-NA) を用いることでβ-グルカン量に応じて発色合成基質から黄色色素が遊離し、発色する。この黄色発色した反応液の吸光度を測定し、色素量を単位時間当たりの吸光度変化率として分析する (Fig. 2)。測定された単位時間当たりの

吸光度変化率から予め作成された添付検量線を用いてβ-グルカン濃度を算出する。血漿検体をLAL試薬にそのまま添加すると、検体に含まれている様々な干渉成分によって偽陽性や偽陰性を呈することがある。また検体中にエンドトキシンが存在する場合にはLAL試薬にエンドトキシンと反応する別のカスケードが存在するため、その影響を受ける。「β-グルカン シングルM30テストワコー」では、界面活性剤を含む検体前処理液に検体を加え、70℃、10分間加熱し、エンドトキシンプロッカーを含有するLAL試薬で反応させることにより、検体やエンドトキシンの影響を受けることなく、β-グルカンと特異的に反応する。

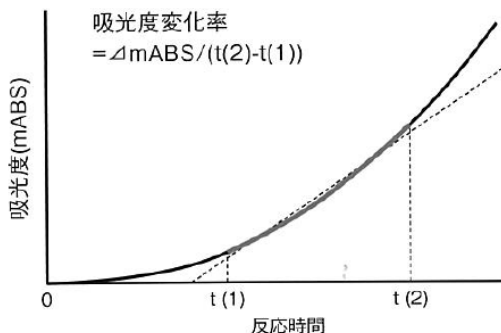


Fig. 2 発色合成基質法の反応タイムコース



Fig. 3 リムセイブ MT-7500関連製品

2) リムセイブ MT-7500 の特徴

発色合成基質法での黄色色素を検出できるよう 390 ~ 400 nm (主波長)、495 ~ 510 nm (副波長)、従来の比濁時間分析法での濁りを検出できるよう 660 ± 10 nmの3種類のLEDを搭載した「リムセイブ MT-7500」が富士フイルム(株)により開発された。

Fig. 3に関連製品一覧を掲載する。リムセイブ MT-7500の本体にはバーコードリーダーを標準装備しており、検体数に応じて追加接続可能な拡張モジュール、検体前処理用のサーモステーションTS-70/20、前処理済み検体冷却用のクーリングステーションを用意した。本体はA3サイズよりも一回り小さく、コンパクト設計で、デスク上で邪魔にならずスペースの有効活用に貢献できる。シンプルで使いやすい操作画面を採用し、本体のみで測定依頼、結果出力・印字、保存が可能である。また、拡張モジュール接続により多検体の同時処理にも対応できる仕様とした。LAL試薬の反応時間20分を実現したβ-グルカン シングルM30テストワークに対応し、国内唯一の血漿中エンドトキシン測定用体外診断用医薬品、エンドトキシン-シングルテストワークの使用も可能である。



Fig. 4 検体の前処理 (希釈加熱法)

Ⅲ. 測定操作法

1) 検体の前処理

検体前処理液0.9 mL にヘパリン加血漿0.05 mL を加え、攪拌後、70 °C で10 分間加熱し、水冷後 (クーリングステーションによる冷却を推奨) 前処理検体 (試料) とする。(Fig. 4)

2) 測定

前処理済み検体0.2 mL をライセート試薬に加え、試薬が十分溶けたことを確認してから、泡が立たないようにボルテックスミキサーで数秒間攪拌した後、リムセイブ MT-7500 にセットすると自動的に測定を開始する。37 °C で20 分間反応させ、その間の吸光度 (主波長390 ~ 400 nm、副波長495 ~ 510 nm) を測定し、吸光度の変化を1 分間当たりの吸光度変化率 (mABS/min) として算出する。(Fig. 5) 測定結果は、添付の吸光度変化率とβ-グルカン濃度の関係表から作成した検量線 (Fig. 6) に当てはめ、試料中のβ-グルカン濃度を算出する。



Fig. 5 β-グルカン濃度の測定

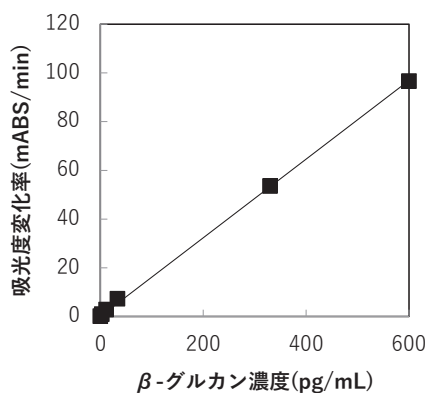


Fig. 6 β -グルカンシングルM30テストワークの検量線

IV. 基礎性能

1) 同時再現性

β -グルカン濃度8.9 pg/mL、16.1 pg/mL、105.6 pg/mLの3濃度の血漿検体を21回測定したときの同時再現性のCVはそれぞれ2.0%、2.8%、3.0%と良好であった。(Table 1)

2) 日差再現性

β -グルカン7.7 pg/mLと68.4 pg/mLの2濃度の血漿検体を15日間測定したときの日差再現性のCVはそれぞれ3.2%、2.0%と良好であった。(Table 2)

3) 最小検出感度

検討では各試料測定値(n = 4)の平均値-2 SDと、

Table 1 同時再現性

	試料1 (pg/mL)	試料2 (pg/mL)	試料3 (pg/mL)
1	8.9	16.6	100.4
2	8.9	16.1	102.3
3	8.7	16.3	101.3
4	8.9	16.0	105.3
5	9.3	16.0	103.1
6	9.2	15.4	104.0
7	8.8	15.7	108.4
8	8.6	16.6	113.8
9	8.6	16.5	108.4
10	9.0	16.9	102.5
11	9.1	16.5	103.1
12	9.1	16.4	106.1
13	8.9	15.8	106.5
14	9.0	15.5	105.7
15	8.7	16.4	104.5
16	8.9	15.8	105.3
17	9.1	16.6	108.6
18	8.8	15.6	105.5
19	8.9	16.1	105.2
20	8.9	15.6	109.2
21	8.9	15.5	109.1
Mean	8.9	16.1	105.6
Max	9.3	16.9	113.8
Min	8.6	15.4	100.4
Range	0.7	1.5	13.4
SD	0.18	0.45	3.17
CV	2.0%	2.8%	3.0%

Table 2 日差再現性

	試料1			試料2		
	測定値1 (pg/mL)	測定値2 (pg/mL)	平均 (pg/mL)	測定値1 (pg/mL)	測定値2 (pg/mL)	平均 (pg/mL)
1	7.7	7.6	7.7	65.9	66.2	66.1
2	8.1	8.3	8.2	67.0	68.0	67.5
3	8.1	8.1	8.1	67.9	67.8	67.9
4	7.5	7.7	7.6	69.2	70.0	69.6
5	7.5	7.9	7.7	70.0	69.3	69.7
6	7.9	7.7	7.8	69.7	70.3	70.0
7	7.3	7.5	7.4	68.7	69.0	68.9
8	7.8	7.8	7.8	66.3	64.9	65.6
9	7.5	7.6	7.6	69.3	70.5	69.9
10	7.7	7.6	7.7	68.4	68.6	68.5
11	7.9	8.0	8.0	67.9	68.3	68.1
12	7.6	7.8	7.7	68.8	69.9	69.4
13	7.4	7.2	7.3	68.7	68.3	68.5
14	7.7	8.1	7.9	70.1	68.8	69.5
15	7.4	7.4	7.4	65.8	68.3	67.1
Mean			7.7			68.4
SD			0.25			1.37
CV			3.2%			2.0%

ブランク測定値 (n = 4) の平均値+2 SDが重ならない最小の濃度は0.6 pg/mLであった。試薬性能としては1 pg/mLを最小検出感度とした。(Fig. 7)

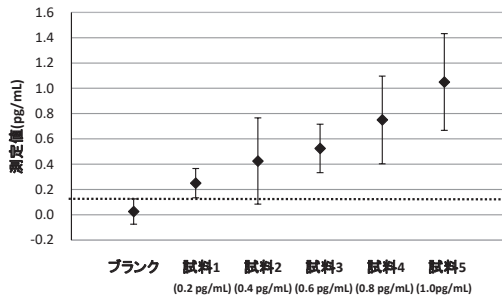


Fig. 7 最小検出感度 (2SD法)

4) 直線性

高濃度β-グルカン含有血漿を前処理後、検体前処理液で希釈調製した試料を測定した検討で、600 pg/mLまでの直線性が確認された。(Fig. 8)

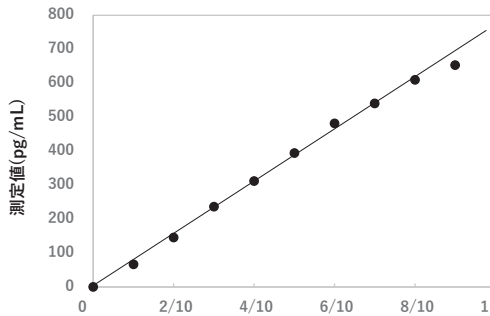


Fig. 8 希釈直線性

5) 共存物質の影響

溶血、ビリルビン、乳びの測定値への影響を検討した結果、溶血ヘモグロビンは500 mg/dL、ジタウロビリルビンは50 mg/dL、乳び (イントラリポス) は5.0%まで測定値にほとんど影響は認められなかった。(Fig. 9)

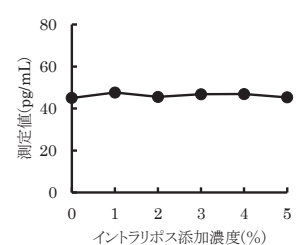
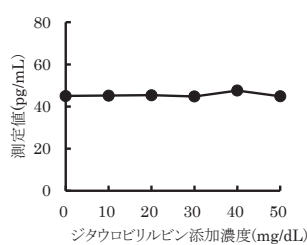
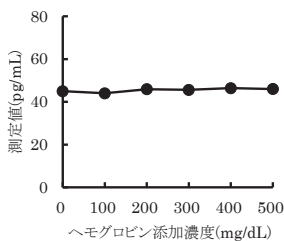


Fig. 9 共存物質の影響

6) 薬剤の影響

抗真菌剤の測定値への影響を検討した結果、ミカファンギンナトリウムは225 μg/mL、フルコナゾールは30 μg/mL、イトラコナゾールは0.3 μg/mL、アムホテリシンBは0.5 μg/mL、ミコナゾールは0.5 μg/mLまで測定値にほとんど影響を与えなかった。

抗生物質の測定値への影響を検討した結果、ペニシリンGカリウムは10 U/mL、セフォペラゾンナトリウムは250 μg/mL、セフトアジジムは70 μg/mL、フロモキシセフナトリウムは1.5 mg/mL、イミペネム・シラスタチンナトリウムは100 μg/mL、ゲンタマイシン硫酸塩は10 μg/mL、アミカシン硫酸塩は30 μg/mL、バンコマイシン塩酸塩は60 μg/mL、タゾバクタム・ピペラシリンは200 μg/mLまで測定値にほとんど影響を与えなかった。

化学療法剤のスルファメトキサゾール (単独) は300 μg/mL、トリメトプリム (単独) は1.6 mg/mLまで測定値にほとんど影響を与えなかった。

抗リウマチ剤のエンブレルは200 μg/mLまで測定値にほとんど影響を与えなかった。

7) 相関性

我々の既存体外診断用医薬品である比濁時間分析法「β-グルカンテストワコー」との血漿検体での相関は相関係数が0.990、回帰式 $y=1.014x + 1.5$ と良好な結果であった。(Fig. 10)

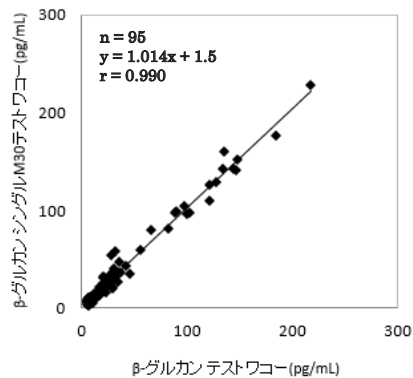


Fig. 10 相関性

V. まとめ

我々が1997年に発売した既存体外診断用医薬品である比濁時間分析法「 β -グルカン テストワコー」は、院内測定に適したモノテスト試薬で、長年多数のご施設でお使いいただいている。反応時間の短縮を実現した「 β -グルカン シングルM30テストワコー」による測定は、臨床への迅速な結果報告を可能にし、感染症の早期診断・早期治療、抗真菌薬の適正使用に貢献すると考えられる⁶⁾。本試薬の基本性能は「IV. 基礎性能」に示すように良好な結果が得られており、従来より販売している比濁時間分析法「 β -グルカン テストワコー」とも良好な相関を示していることから、カットオフ値も同じ11 pg/mLとしている。

また、コンパクト設計で、スペースの有効活用に貢献しシンプルで使いやすい操作画面を実現させたリムセイブ MT-7500は、「 β -グルカン シングルM30テストワコー」および「 β -グルカン テストワコー」に適用できるとともに、従来装置と同様、国内唯一の血漿中エンドトキシン測定用体外診断用医薬品「エンドトキシン-シングルテストワコー」にも適用しており、市場の様々なニーズに貢献すると考えられる。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

文献

- 1) 深在性真菌症のガイドライン作成委員会：深在性真菌症の診断・治療ガイドライン2014, 協和企画, 東京 (2014)
- 2) Kakinuma A, Asano T, Torii H, and Sugino Y: Gelation of *Limulus* amoebocyte lysate by an antitumor (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan. *Biochem Biophys Res Commun*, 101: 434-439, 1981.
- 3) Morita T, Tanaka S, Nakamura T, and Iwanaga, S: A new (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan-mediated coagulation pathway found in *Limulus* amoebocytes. *FEBS Lett*, 129: 318-321, 1981.
- 4) 中村隆範, 森田隆司, 平永万寿代, 宮田敏行, 岩永貞昭：細菌内毒素によるカプトガニ血球細胞の活性化とその分子機構. *日本細菌学雑誌*, 38: 781-803, 1983.
- 5) 第十八改正日本薬局方 一般試験法 4.01エンドトキシン試験法
- 6) 抗菌薬適正使用支援プログラム実践のためのガイダンス：感染症学雑誌, 91: 709-746, 2017.