

〈新技術特集〉

光散乱分析を利用したラテックス試薬 (PSA, BNP, PCT) の開発

藤川 利彦

Development of three latex reagents (PSA, BNP, PCT) by nephelometry

Toshihiko Fujikawa

Summary Latex turbidimetric immunoassay (LTIA) reagents (LTIA reagents) are mainly used to perform measurement with an automated chemistry analyzer equipped with an absorptiometer. Because LTIA reagents can be used with the general-purpose automated biochemical analyzers available in most laboratories and measurement does not take much time, they are used by many facilities. However, there are a number of cases in which problems arise with respect to sensitivity. Consequently, chemiluminescent immunoassay reagents are used for measurements requiring a high degree of sensitivity. To address this issue, we have developed three LTIA reagents that detect scattered light with higher sensitivity. Performance evaluation of these reagents showed that the minimum detectable sensitivities for PSA, BNP, and PCT are below 0.1 ng/mL, 10 pg/mL, and 0.1 ng/mL, respectively, and verified that they possess the sensitivity to detect the cutoff values that established in guidelines for each test parameter. Excellent correlation with commercially available chemiluminescent immunoassay reagents was also demonstrated, with a slope of 0.93, 1.01, and 1.02 and a correlation coefficient of 0.996, 0.993, and 0.993 for PSA, BNP, and PCT, respectively. Based on these findings, these new LTIA reagents that measure scattered light are highly promising for use in routine medical care.

Key words: Nephelometry, LTIA, PSA, BNP, PCT

積水メディカル株式会社 研究開発統括部 開発推進部
〒103-0027 東京都中央区日本橋2-1-3
アーバンネット日本橋二丁目ビル
TEL: 03-3272-0677
FAX: 03-3272-0678
E-mail: fujikawa@sekisui.com

Diagnostic Products Development Department
Research & Development
SEKISUI MEDICAL CO., LTD.
1-3, Nihonbashi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027
Japan
Tel +81-3-3272-0677
Fax +81-3-3272-0678

I. 緒言

ラテックス免疫比濁法 (LTIA法) を原理とした試薬 (以下LTIA試薬) は、基本的に吸光光度計を搭載した生化学自動分析装置で測定される。LTIA試薬は一般的な検査施設にある汎用機が使用可能であり、また測定時間も短いことから、多くの施設で採用されているが、感度面で課題を抱えている場合も少なくない。そのため高い感度を要求する項目では、化学発光免疫測定法を原理とした試薬が用いられている。今回我々はLTIA試薬の感度をより高めた試薬開発を目指し、散乱光分析による測定試薬として前立腺特異抗原 (以下PSA)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (以下BNP)、プロカルシトニン (以下PCT) の3製品を開発した。今回それらの基本性能について報告する。

II. 方法と材料

1) 測定原理

本検討試薬の測定原理は、ラテックス粒子を用いたLTIA法である。抗体が結合したラテックス粒子と、血中に存在する標的抗原が抗原抗体反応を起こし、その結果ラテックス粒子が凝集する。凝集の程度を光散乱光度計もしくは吸光光度計で測定し、検量線を元に血中の標的抗原の濃度を算出する。

2) 装置及び試薬

検討試薬はラテックス試薬「ナノピア PSA-N」、「ナノピア BNP」、「ナノピア PCT」(積水メディカル株式会社)、対照試薬には化学発光免疫測定法を原理とする試薬を使用した。自動分析装置として、吸光光度計/光散乱光度計を同時搭載した自動分析装置「日立自動分析装置3500 (以下H3500)」(株式会社日立ハイテク)を用いた。

III. 基本性能について

1) PSA

(1) 試薬開発の狙い

PSAは前立腺の腺上皮細胞で特異的に産生される分子量約34,000の糖タンパクであり、精液

に主に含まれ精液のゲル化に関与している。前立腺の疾患 (前立腺癌、前立腺炎、前立腺肥大等) により腺上皮細胞が傷害されると血中に逸脱する¹⁾。そのため血中PSAは、前立腺腫瘍の診断や治療経過の把握、早期発見のためのスクリーニング検査として用いられる。PSAカットオフ値は、全年齢で、 ≤ 4.0 ng/mL²⁾、または年齢階層別については、50-64歳が ≤ 3.0 ng/mL、65-69歳で ≤ 3.5 ng/mL、70歳以上で ≤ 4.0 ng/mLとなっている³⁾。また、再検診の時期については、 ≤ 1.0 ng/mLであれば3年後⁴⁾⁻⁵⁾、1.1 ng/mL ~ カットオフの上限であれば、1年後の受診が推奨されている⁶⁾⁻⁷⁾。そのため、臨牀的にPSAは、1 ng/mLの測り分けができることが重要である。今回我々は、LTIA法を原理としながらも、0.1 ng/mLの最小検出感度を目指し、「ナノピア PSA-N」を開発した。また本試薬は、低濃度域のPSA検出には、散乱光を、高濃度域は、透過光を測定することでより高感度で広い測定範囲を目指した。

(2) 同時再現性

PSA濃度が0.1 ng/mL、5.3 ng/mL及び19.2 ng/mLの3種類のコントロール血清を用い、上記H3500を使用してそれぞれ10回連続測定し平均値、標準偏差 (SD) を元に変動係数 (C.V.) を算出した。その結果、変動係数は低濃度コントロールでは3.9 %、中濃度コントロールでは0.5 %、高濃度コントロールでは、0.8 %であった (Table 1)。

(3) 検出下限

検出下限は、PSA濃度約0.35 ng/mLの血清を、本製品用のキャリブレーター①を使用して多段階希釈後、10回連続測定し評価した。評価は2.6SD法を用い、各濃度の測定値-2.6 SDがブランク値+2.6 SDを上回る最小の濃度を検出下限とした。その結果、検出下限は、0.08 ng/mLであった (Fig. 1A)。

(4) 希釈直線性

希釈直線性に関しては、6.2 ng/mL (低濃度)、20.8 ng/mL (中濃度) 及び103.3 ng/mL (高濃度) の3種類のPSA血清を生理食塩液を用いて多段階希釈して測定したところ、低濃度の試料に対

Table 1 PSA、BNPおよびPCTの同時再現性

PSA				BNP			PCT			
試料	検体A	検体B	検体C	試料	検体A	検体B	試料	検体A	検体B	検体C
既知濃度	0.1 ng/mL	5.3 ng/mL	19.2ng/mL	既知濃度	85.6 pg/mL	614.9 pg/mL	既知濃度	0.5 ng/mL	2.0 ng/mL	20.0 ng/mL
1	0.11	5.19	19.69	1	85.1	624.3	1	0.46	1.94	19.75
2	0.11	5.25	19.61	2	84.1	616.4	2	0.43	1.98	20.00
3	0.11	5.25	19.52	3	83.7	619.3	3	0.44	1.92	19.48
4	0.11	5.19	19.72	4	85.5	611.5	4	0.44	1.89	19.29
5	0.11	5.24	19.64	5	84.0	622.8	5	0.47	1.94	19.80
6	0.10	5.20	19.89	6	84.8	620.5	6	0.56	1.99	19.93
7	0.11	5.21	19.46	7	86.5	624.7	7	0.43	1.94	19.63
8	0.10	5.21	19.46	8	84.4	621.8	8	0.44	1.96	19.34
9	0.11	5.20	19.43	9	84.8	623.4	9	0.48	1.94	19.61
10	0.11	5.19	19.38	10	81.1	608.0	10	0.46	1.99	19.84
S.D	0.00	0.02	0.16	S.D	1.42	5.66	S.D	0.04	0.03	0.24
Mean.	0.11	5.21	19.58	Mean.	84.4	619.3	Mean.	0.5	1.9	19.7
C.V.	3.9	0.5	0.8	C.V.	1.7	0.9	C.V.	8.4	1.6	1.2
Max.	0.11	5.25	19.89	Max.	86.5	624.7	Max.	0.6	2.0	20.0
Min.	0.10	5.19	19.38	Min.	81.1	608.0	Min.	0.4	1.9	19.3
Range	0.01	0.06	0.51	Range	5.4	16.7	Range	0.1	0.1	0.7

(ng/mL) (pg/mL) (ng/mL)

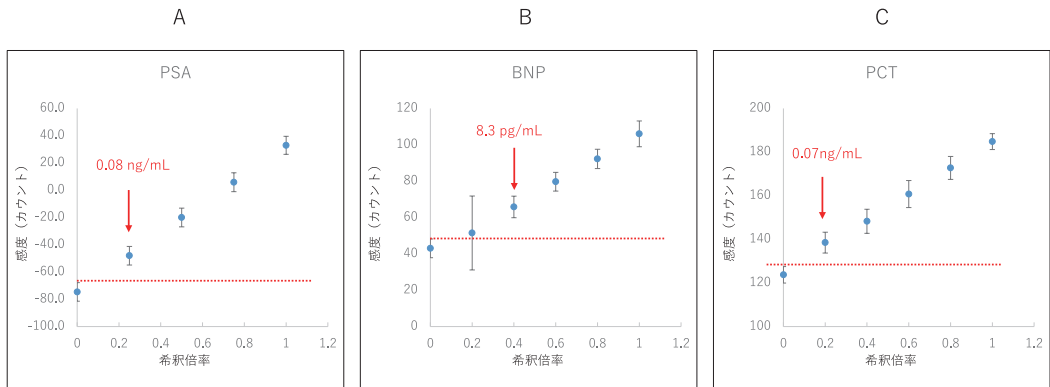


Fig. 1 検出下限

A : ナノピア PSA-N B : ナノピア BNP C : ナノピア PCT

しては、回収率が、87.7 %-101.5%、相関係数 $r=0.999$ を示し、中濃度試料に対しては、回収率99.4 %-106.4%、相関係数 $r=0.999$ を示し、高濃度試料については、回収率96.3-103.9、相関係数 $r=0.999$ と、本製品の持つ測定範囲において良好な希釈直線性を確認した (Fig. 2)。

(5) 共存物質の影響

干渉チェック・Aプラス (シスメックス株式会社) 及び干渉チェック・RFプラス (シスメックス株式会社) を2濃度の血清に添加し、それぞれ0濃度試料に対する相対比が85-115 %となる添加濃度を、各共存物質による影響を受けない濃度として評価した。遊離型ビリルビン、抱合型ビリルビンはそれぞれ20 mg/dL、溶血へ

モグロビンは500mg/dL、乳ビはホルマジン濁度2000度、RFは500 IU/mLまでは測定値に影響を認めなかった (Fig. 4)。

(6) 対照法との相関性

化学発光免疫測定法と本法との相関性を検討した。その結果、まず、0-100 ng/mLの測定全範囲における相関 (n=96) は、回帰直線の傾きが0.93、相関係数 $r=0.996$ 、0-20 ng/mLの低濃度域における相関 (n=70) は、回帰直線の傾きが1.03、相関係数 $r=0.994$ と全範囲、低濃度域ともに、対照試薬と良好な相関関係を認めた (Fig. 7A and B)。

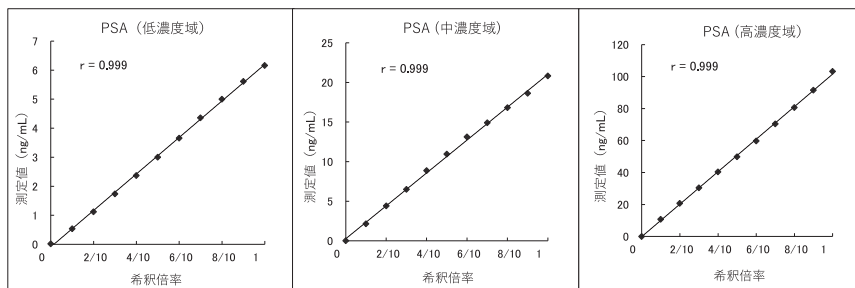


Fig. 2 希釈直線性 (PSA)

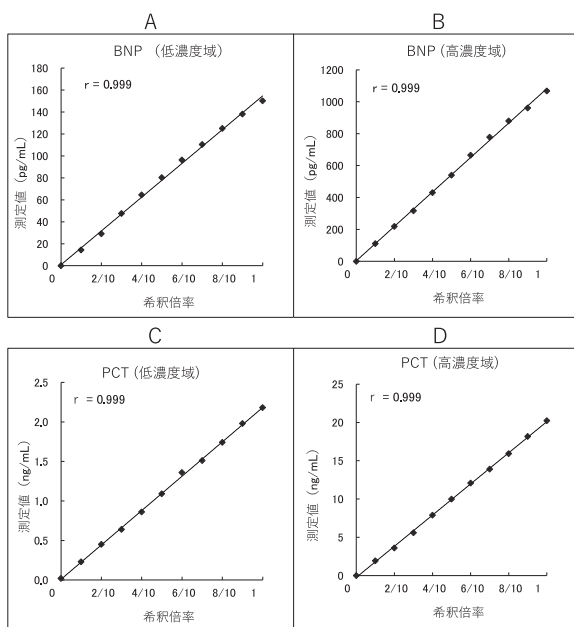


Fig. 3 希釈直線性

- A : BNP (低濃度域)
- B : BNP (高濃度域)
- C : PCT (低濃度域)
- D : PCT (高濃度域)

2) BNP

(1) 試薬開発の狙い

BNPは32個のアミノ酸残基から構成される環状構造を持つペプチドであり、主に心室で産生、分泌されるホルモンである。健康人のBNPは非常に低いレベルに保たれているが、心室負荷や心筋肥大、心筋虚血などにより高値となり、心不全患者では重症度に応じて増加する。そのため心不全の診断に有用なマーカーとして広く用いられている^{8) - 10)}。BNPの正常値は ≤ 18.4 pg/mLであり、臨床的には40 pg/mL以下であれば直ちに治療が必要となる心不全の可能性は低く、100 pg/mL以上で治療対象となる心不全の可能性があるとされている¹¹⁾。そのため、血中BNPの測定は十数pg/mLレベルの測定感度が必要であり、検出感度の面からLTIA法は課題を

有していた。しかし、散乱光分析に最適化した処方により10 pg/mLの最小検出感度を目指し、「ナノピア BNP」を開発した。

(2) 同時再現性

BNP濃度が85.6 pg/mL及び614.9 pg/mLの2種類のコントロール血漿を用い、上記H3500を使用してそれぞれ10回連続測定し平均値、標準偏差 (SD) を元に変動係数 (C.V.) を算出した。その結果、変動係数は低濃度コントロールでは1.7%、高濃度コントロールでは0.9%であった (Table 1)。

(3) 検出下限

検出下限は、BNP濃度23.6 pg/mLの血漿を、BNP除去血漿である本製品用のキャリブレータ

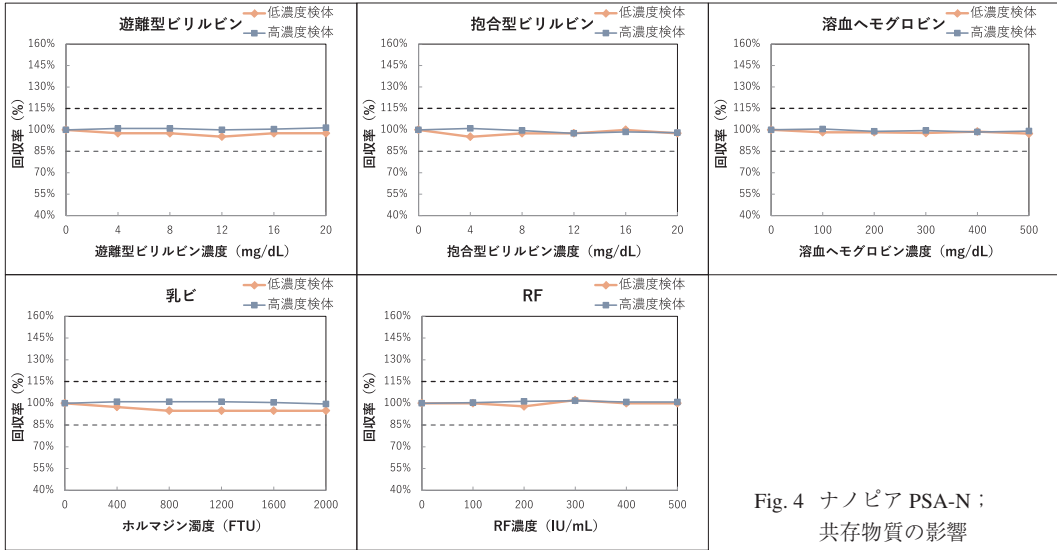


Fig. 4 ナノピア PSA-N ; 共存物質の影響

ー①を使用して多段階希釈後、10回連続測定し評価した。評価は2.6SD法を用い、各濃度の測定値-2.6 SDがブランク値+2.6 SDを上回る最小の濃度を検出下限とした。その結果、検出下限は、8.3 pg/mLであった (Fig. 1B)。

(4) 希釈直線性

希釈直線性に関しては、150.2 pg/mL (低濃度) 及び1068 pg/mL (高濃度) の濃度のBNP血漿を生理食塩液を用いて多段階希釈して測定したところ、150.2 pg/mL の試料に対しては、回収率が、95.9%-107.4%、相関係数 $r=0.999$ を示し、1068 pg/mLの試料に対しては、回収率が、98.7%-104.4%、相関係数 $r=0.999$ を示し、本製品の持つ測定範囲において良好な希釈直線性を確認した (Fig. 3A and B)。

(5) 共存物質の影響

干渉チェック・Aプラス及び干渉チェック・RFプラスを2濃度の血漿に添加し、それぞれ0濃度試料に対する相対比が85 ~ 115 %となる添加濃度を、各共存物質による影響を受けない濃度として評価した。遊離型ビリルビン、抱合型ビリルビンはそれぞれ20 mg/dL、乳ビはホルマジン濁度2000度、RFは500 IU/mLまでは測定値に影響を認めなかった (Fig. 5)。

(6) 対照法との相関性

化学発光免疫測定法を原理とする製品Aおよび製品Bと本法との相関性を34例で検討した。その結果、製品Aと「ナノピア BNP」の回帰直線の傾きは1.01、相関係数は $r=0.993$ 、また、製品Bと「ナノピア BNP」の回帰直線の傾きは0.96、相関係数は $r=0.997$ であり、「ナノピア BNP」と2種の対照試薬との間に、良好な相関関係を認めた (Fig. 7C and D)。

3) PCT

(1) 試薬開発の狙い

PCTは、甲状腺で産生されるカルシトニンの前駆体で健常人ではほとんど血中に含まれない。細菌感染により甲状腺以外からも産生され、血中のPCTが上昇することが知られている。膠原病やウイルス感染などの疾患ではPCTは産生されず、細菌性敗血症鑑別診断の補助として用いられている。またPCT値による抗菌薬中止判断についてもガイドラインで(弱く)推奨されている¹²⁾。カットオフは診断では0.5 ng/mL、重症度判定で2.0 ng/mLが用いられており¹²⁾⁻¹⁵⁾、臨床的には低濃度域の精度が重要となる。そのため国内では検出感度の面からこれまでラテックス免疫比濁法を原理とした試薬は実用化されていなかったが、今回散乱光分析により0.1ng/mLの感度を目指し、「ナノピア PCT」を開発した。

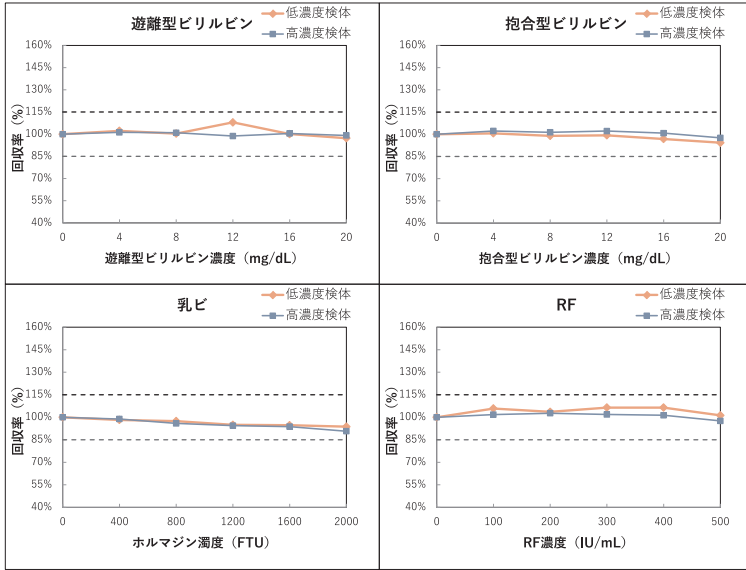


Fig. 5 ナノピア BNP ; 共存物質の影響

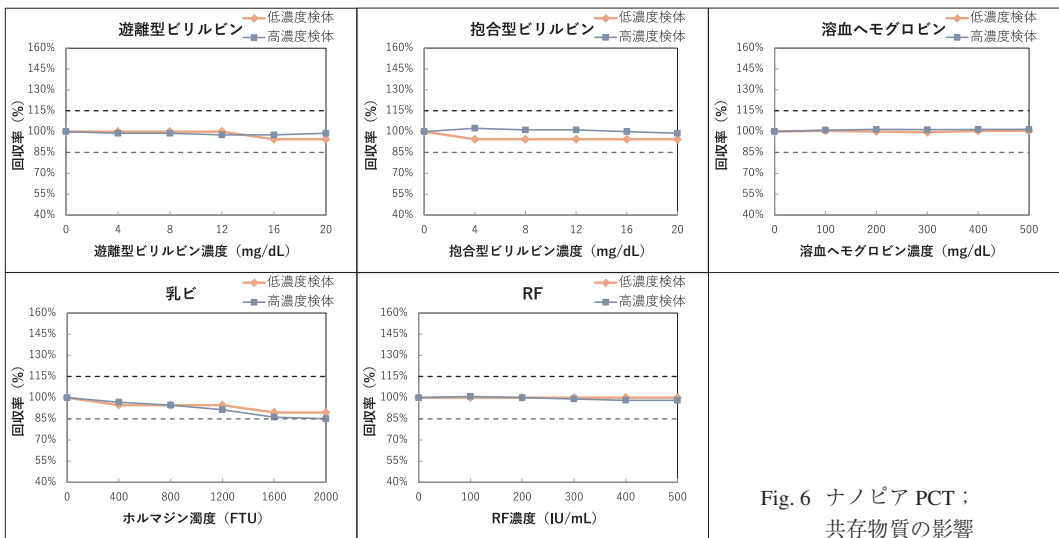


Fig. 6 ナノピア PCT ; 共存物質の影響

(2) 同時再現性

PCT濃度が0.5 ng/mL、2.0 ng/mL及び20.0 ng/mLの3種類のコントロール血清を用い、上記H3500を使用してそれぞれ10回連続測定し平均値、標準偏差 (SD) を元に変動係数 (C.V.) を算出した。その結果、変動係数は低濃度コントロールでは8.4%、中濃度コントロールでは1.6%、高濃度コントロールでは、1.2%であった (Table1)。

(3) 検出下限

検出下限は、PCT濃度約0.4 ng/mLの血清を、本製品用のキャリブレーター①を使用して多段階希釈後、10回連続測定し評価した。評価は2.6SD法を用い、各濃度の測定値-2.6 SDがブランク値+2.6 SDを上回る最小の濃度を検出下限とした。その結果、検出下限は、0.07 ng/mLであった (Fig. 1C)。

(4) 希釈直線性

希釈直線性に関しては、約2.0 ng/mL及び約

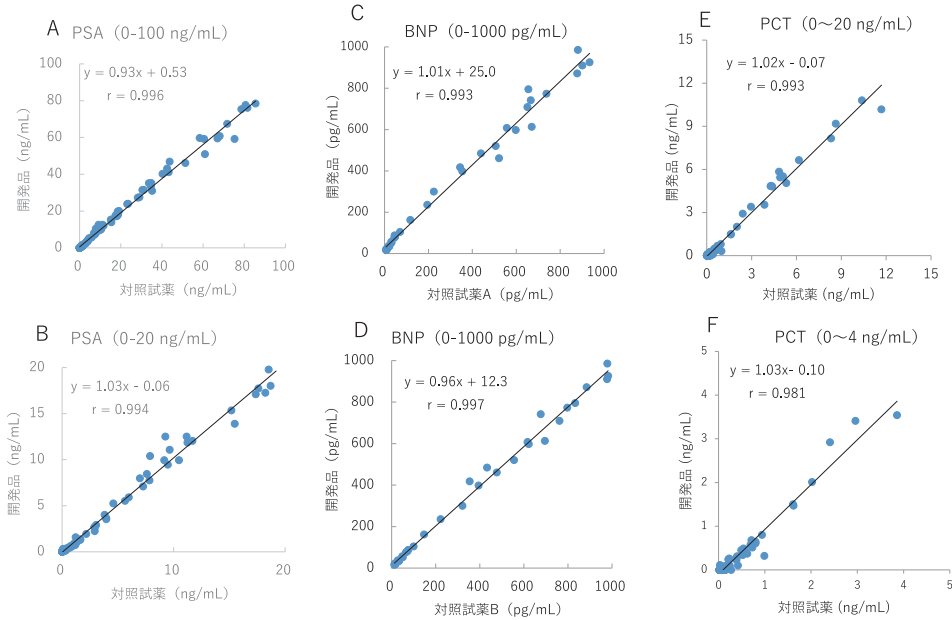


Fig. 7 相関性

A : PSA (0-100 ng/mL) B : PSA (0-20 ng/mL) C : BNP (試薬A : 0-1000 pg/mL)
 D : BNP (試薬B : 0-1000 pg/mL) E : PCT (0-20 ng/mL) F : PCT (0-4 ng/mL)

20.0 ng/mLの濃度のPCT血清を生理食塩液を用いて多段階希釈して測定したところ、約2.0 ng/mLの試料に対しては、回収率が、97.9%-105.5%、相関係数 $r=0.999$ を示し、約20.0 ng/mLの試料に対しては、回収率が、89.3%-100.0%、相関係数 $r=0.999$ を示し、本製品の持つ測定範囲において良好な希釈直線性を確認した (Fig. 3C and D)。

(5) 共存物質の影響

干渉チェック・Aプラス及び干渉チェック・RFプラスを2濃度の血清に添加し、それぞれ0濃度試料に対する相対比が85-115%となる添加濃度を、各共存物質による影響を受けない濃度として評価した。遊離型ビリルビン、抱合型ビリルビンはそれぞれ20 mg/dL、溶血ヘモグロビンは500 mg/dL、乳ビはホルマジン濁度2000度、RFは500 IU/mLまでは測定値に影響を認めなかった (Fig. 6)。

(6) 対照法との相関性

化学発光免疫測定法と本法との相関性を検討した。その結果、0-20 ng/mLの測定全範囲にお

ける相関 (n=82) は、回帰直線の傾きが1.02、相関係数 $r=0.993$ 、0-4 ngの低濃度域における相関 (n=75) は、回帰直線の傾きが1.03、相関係数 $r=0.981$ と全範囲、低濃度域ともに、対照試薬と良好な相関関係を認めた (Fig. 7E and F)。

IV. まとめ

散乱光分析を利用したラテックス試薬3製品について基本性能について評価した結果、最小検出感度がPSA, BNPおよびPCTそれぞれ0.1 ng/mL、10 pg/mL、0.1 ng/mL以下となり、各項目のガイドラインに基づいたカットオフを判別できる感度を有していることを確認した。また希釈直線性については、低濃度域から高濃度域にわたり良好な直線性を有していた。共存物質の影響に関しては、すべての試薬で、遊離型ビリルビンおよび抱合型ビリルビンはそれぞれ20 mg/dL、乳ビはホルマジン濁度2000度、RFは500 IU/mLまでは測定値に影響を認めなかった。すでに市場で使用されている化学発光免疫法を原理とした対照試薬との相関性については、PSA, BNPおよびPCTは、それぞれ、傾き0.93、

1.01および1.02、相関係数 $r=0.996$ 、 0.993 および 0.993 となり、非常に良好な相関性を示した。以上より今回我々が開発した散乱光分析を利用したLTIA試薬は、日常診療において十分対応できる試薬であると考えられる。また、高い感度を有する本製品群の開発が、LTIA法の新たな可能性を切り開く一助となったと考える。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

文 献

- 1) 小川祐司, 森川惇二, 大沢劉三郎, 町田豊平, 三木 誠, 柳沢宗利: 前立腺特異抗原 (Prostate Specific Antigen) の精製とその測定法. RADIOISOTOPES, 33: 273-278, 1984.
- 2) Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr : Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level $< \text{or} = 4.0$ ng per milliliter. *N Engl J Med*, 350: 2239-46, 2004.
- 3) Ito K, Yamamoto T, Kubota Y, Suzuki K, Fukabori Y, Kurokawa K, Yamanaka H: Usefulness of age-specific reference range of prostate specific antigen for Japanese men older than 60 years in mass screening for prostate cancer. *Urology*, 56: 278-82, 2000.
- 4) Ito K, Yamamoto T, Ohi M, Takechi H, Kurokawa K, Suzuki K, Yamanaka H: Possibility of re-screening intervals of more than one year in men with PSA levels of 4.0 ng/ml or less. *Prostate*, 57: 8-13, 2003.
- 5) Randazzo M, Beatrice J, Huber A, Grobholz R, Manka L, Chun FK, Kluth LA, Wyler SF, Recker F, Kwiatkowski M: Is further screening of men with baseline PSA < 1 ng ml (-1) worthwhile? The discussion continues-Results of the Swiss ERSPC (Aarau) . *Int J Cancer*, 137: 553-9, 2015.
- 6) 小林 恭, 後藤 励, 樋之津史郎, 小川 修: ベースラインPSA値による検診間隔の個別設定は前立腺癌スクリーニングの効率を改善する: 数理モデルを用いた社会経済学的考察. 泌尿器科紀要, 59: 159-66, 2013.
- 7) 日本泌尿器科学会 編: 前立腺癌診療ガイドライン2016年版, メディカルレビュー社, 東京 (2016)
- 8) 薦本尚慶, 斎藤能彦 編: 新BNPと日常臨床, p6, 南江堂, 東京 (2005)
- 9) 薦本尚慶: BNP, NT - proBNPの有用性. 医学のあゆみ, 232: 459-65, 2010.
- 10) 桑原宏一郎: 心不全バイオマーカーとしてのBNPの臨床的意義. 診断と治療, 105: 1603-07, 2017.
- 11) 日本循環器学会/日本心不全学会合同ガイドライン 編集: 急性・慢性心不全診療ガイドライン, p.16-21, 2017.
- 12) 日本版敗血症診療ガイドライン2016 日救急医学会誌. 28, 2017.
- 13) Aikawa N, Fujishima S, Endo S, Sekine I, Kogawa K, Yamamoto Y, Kushimoto S, Yukioka H, Kato N, Tot-suka K, Kikuchi K, Ikeda T, Ikeda K, Harada K, Sato-mura S: Multicenter prospective study of procalcitonin as an indicator of sepsis. *J Infect Chemother*, 11: 152-159, 2005
- 14) 吉川晃司: 肺炎 (2) 院内肺炎. 臨床透析, 24: 1679-1680, 2008.
- 15) de Jong E, van Oers JA, Beishuizen A, Vos P, Vermeijden WJ, Haas LE, Loef BG, Dormans T, van Melsen GC, Kluiters YC, Kemperman H, van den Elsen MJ, Schouten JA, Streefkerk JO, Krabbe HG, Kieft H, Kluge GH, van Dam VC, van Pelt J, Bormans L, Otten MB, Reidinga AC, Endeman H, Twisk JW, van de Garde EMW, de Smet AMGA, Kesecioglu J, Girbes AR, Nijsten MW, de Lange DW: Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, openlabel trial. *Lancet Infect Dis*, 16: 819-27. 2016.