

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04760

研究課題名(和文) 科学的臨床検査を目指した、標準化未踏である免疫学的検査データの標準化への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to the standardization and harmonization of immunoassay results, toward the scientific laboratory medicine

研究代表者

前川 真人 (MAEKAWA, MASATO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20190291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：免疫学的測定法は測定値が標準化されず測定値がばらばらなものが多い。そこで、標準化を目指した実態調査を行った。

可溶性IL-2受容体、PIVKA-IIは、それぞれ多くの試薬があり使用抗体も異なるため、患者試料を測定したところ、比較的良好な相関性を示し、調査試薬全体の平均値との乖離も大きくなかった。また、プロカルシトニンはイムノクロマトグラフィ法も広く使用されているため、高感度測定法との関係を調べたところ、概ね良好な相関が得られた。従って、乖離する測定法を平均値に合わせるAPTM法を使用するのではなく、学術的に極端な試薬の改良を促すなど産官学共同での活動が必要と考える。

研究成果の概要(英文)：It is required that clinical laboratory measurement results be comparable between laboratories and methods for different methods. This has been achieved only for a much smaller number of analytes especially in immunoassay. Although there are any reagents and analyzers for measurement of soluble IL-2 receptor and PIVKA-II, adequate correlations among the measurement methods and not so big differences between the average of the methods and each method were observed by use of patients' sera. Immunochromatography is widely used to analyze procalcitonin levels due to its simple and easy procedure. Therefore, the correlations of the measurement results analyzed by between immunochromatography and highly sensitive immunoassay were investigated to be revealed acceptable.

In conclusion, for harmonization of laboratory results, all procedure trimmed mean (APT) is recommended, however, cooperation of industry, government and academia is much more important.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：臨床検査 標準化 ハーモナイゼーション コミュニタビリティ APTM 可溶性IL-2受容体 PIVKA-II
プロカルシトニン

1. 研究開始当初の背景

近年、臨床検査は Evidence Based Medicine における客観的な指標として、その重要性がますます高まってきている。国際臨床化学連合 (IFCC) のホームページにも、診療カルテにおける客観的な指標の 94% を占め、臨床判断を行う上で 60-70% の影響力を持ち、診療ガイドラインの 37% に関与すると記載されている。また、内閣官房の健康・医療戦略室を中心として、医療情報の標準化を推進すべく活動が始まっており、どの医療機関にかかっても他の医療機関での医療情報がそのまま利用できるようにしたいという意図が伺える。しかしながら、臨床検査、特に検体検査は全て標準化されているわけではない。

検体検査の多くは客観的な指標としてデジタルで表されるため、標準化されていないと測定値に違いを生じ、診療上大きな誤判断を起こすなどの医療安全上の問題となる。従って、どこでもいつでも測定法にかかわらず同じ検査結果を得ることができるシステム構築が必要である。すなわち、検査データの標準化ができれば、同じ基準で、同じガイドラインで判断ができ、科学的根拠に基づいた医療を展開することができる。世界的にも臨床検査の標準化とハーモナイゼーション (整合化) の重要性が叫ばれているのはそのためである。これまでの日本臨床化学会での活動で、一般的な生化学検査項目の標準化はほぼ完成している。しかしながら、標準測定法がなく各社が個別の測定体系で試薬を作製・市販しているホルモン、腫瘍マーカー、バイオマーカーなどの免疫学的検査項目は、ほとんどまだ手が付けられていない。

2. 研究の目的

上記の実情をふまえ、免疫学的測定法の標準化、ハーモナイゼーションを目指した取組を行う。すなわち、どこでも同じ検査結果が得られるようにするための最適の手法を考察・構築し、モデル例として先鞭をつけることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 情報収集

どの項目を優先して扱うか、世界情勢など情報収集を行い、各検査項目でどれくらいの試薬が市販されているか、市場調査、それぞれの測定系で用いられている標準物質の種類、測定系の種類などについて調べた。その結果を鑑み、検討項目を選択した。

2) 患者試料の収集および測定

本検討では個々のヒト血清を使用することが大きなポイントであるため、臨床検査の依頼のあった患者血清の残余検体を保存する。この場合、対象とする検査項目の測定値の分布に偏りがなく、さらに残余量が多いものを対象とした。収集した血清検体は-70

で保管した。使用済みの患者残余検体を使用するため、倫理委員会で承認を得て、ルールに則ってホームページで情報公開して施行した。

4. 研究成果

1) 可溶性 IL-2 受容体 (IL-2R)

IL-2R は、現在 4 つの試薬で測定可能である。化学発光酵素免疫測定法が 2 法 (イムライズ、デタミナーCL)、酵素免疫測定法が 1 法 (IL-2R テスト)、ラテックス凝集免疫測定法 (ナノピア) が 1 法である。いずれの方法も基準値とされる 130-580 U/mL の範囲から多くの患者が示す 50000 U/mL くらいまでは希釈も入れて可能であった。これらの患者試料での相関性を確認したところ、10000 U/mL 以下の 159 例でいずれも相関係数が 0.97 以上と高かった (図 1)。

図1. 可溶性IL-2受容体 (IL-2R) の2法間の相関

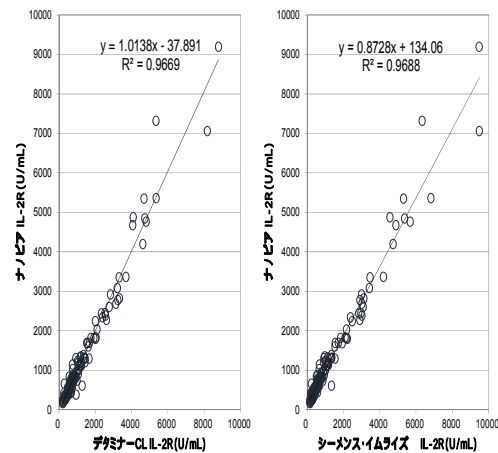


図1. 可溶性IL-2受容体 (IL-2R) の2法間の相関 (つづき)

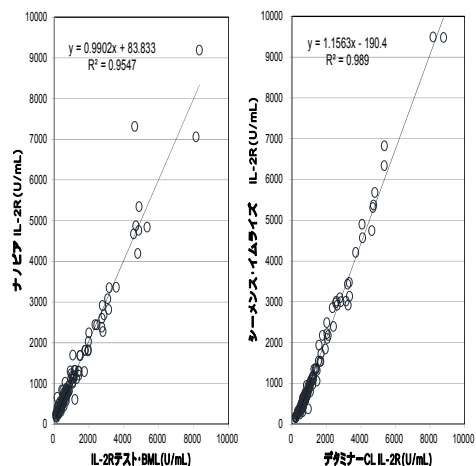


図2には4法の測定値から求めた平均値と4法の実測値との関係を示したが、概ね良好な関係が保たれていることが判明した。なお、ナノピア試薬はさらなる改良を行っているとのことで、付記しておく。今回用いた患者試料では若干乖離している検体もあったが、現時点でAll Method Trimmed Mean(APTM)を使用せずとも概ね互換性のある測定系が作製されているものと考えられた。

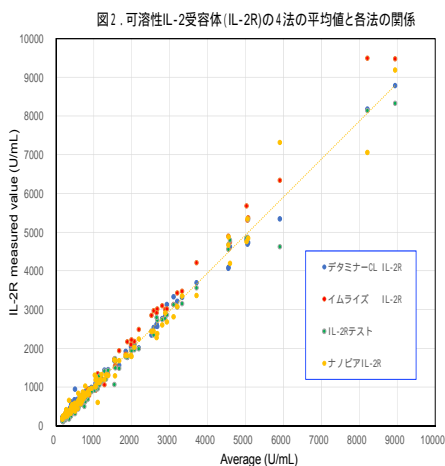


図2. 可溶性IL-2受容体(IL-2R)の4法の平均値と各法の関係

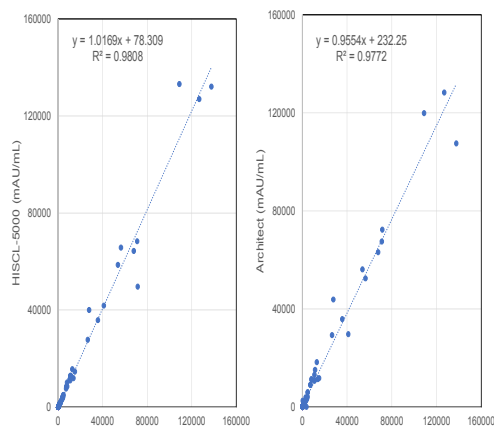
2) PIVKA-II

PIVKA- IIは、現在少なくとも10種類の試薬が販売されている。化学発光酵素免疫測定法が6種(ルミパルス、HISCL、AIAパック、ステイシア、データナー)、(電気)化学発光免疫測定法が2種(積水メディカル、アーキテクト)、酵素免疫測定法が1種(Eテスト)、その他が1種(μTAS)である。このうち、7種の試薬では一次抗体にMU-3抗体が用いられ、二次抗体は20B8抗体が6種の試薬で使用されている。従って、表1に示す抗体の異なる3社の機器試薬で同患者試料216検体を測定したところ、μTAS(和光純薬)とHISCL(シスメックス)の相関係数は0.990、μTAS(和光純薬)とArchitect(アボット)は0.988、HISCLとArchitectでは0.989と、予想外に良好な相関が得られた(図3)。

表1. PIVKA-II測定系

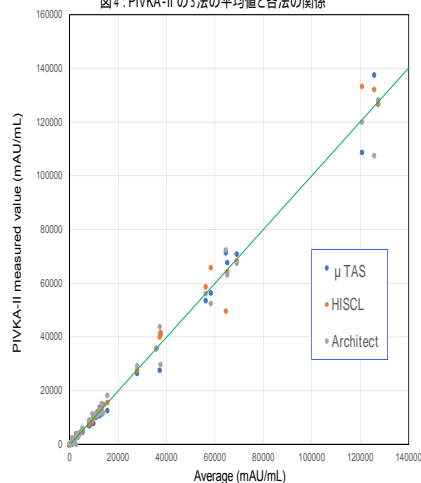
	HISCL PIVKA-II	アーキテクト PIVKA-II アボット	ミュータスワーク PIVKA-II
測定機器	HISCL-5000 HISCL-2000i	アーキテクトi1000SR アーキテクトi2000SR	ミュータスi30
機器製造販売元	シスメックス	アボットジャパン	和光純薬工業
試薬製造販売元	積水メディカル	アボットジャパン	和光純薬工業
測定原理	CLEIA法	CLIA法	LBA-IAEA法
一次抗体	MU-3抗体 (抗PIVKA-II マウスモノクローナル抗体)	3C10抗体 (抗PIVKA-II マウスモノクローナル抗体)	名称は未公開 (抗PIVKA-II マウスモノクローナル抗体)
二次抗体	20B8 (抗プロトンピンマウスモノクローナル抗体)	MCA1-8 (抗プロトンピンマウスモノクローナル抗体)	名称は未公開 (抗プロトンピンマウスモノクローナル抗体)

図3. PIVKA-IIの2法間の相関



3社の平均値と各社の測定値の関係を図4に示したが、概ねY=Xの直線の両側に分布していることが判明した。従って、使用している抗体が異なるためもっとデータがバラバラであることを予測していたが、比較的互換性のある結果が得られた。ただ、乖離例も見出されたため、乖離の原因については、改めて調べていく必要がある。

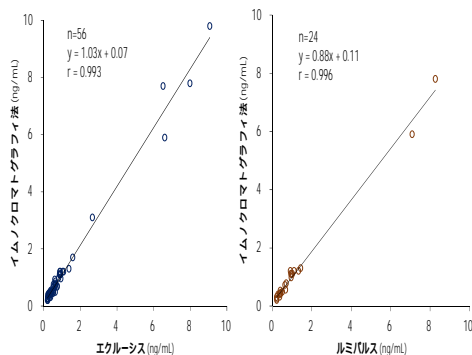
図4. PIVKA-IIの3法の平均値と各法の関係



3) プロカルシトニン

プロカルシトニンは簡易測定試薬(イムノクロマトグラフィ法)を含めると多種の試薬が開発・販売されているため、高感度測定法として電気化学発光免疫測定法(エクルーシス、ロシュ)と化学発光酵素免疫測定法(ルミパルス、富士レピオ)、イムノクロマトグラフィ法で機械読取りの定量試薬(積水メディカル)を検討した。その結果、イムノクロマトグラフィ法と高感度測定法との相関係数は0.996、0.998と良好な相関を示した(図5)。

図5. プロカルシトニンの2法間の相関



また、全血と血漿と異なった測定試料でも良好な相関を示した。ただし、高感度測定法同士の相関は悪くはないものの、全体的にエクルーシス試薬で低めの測定値であった。高感度測定法2種は同じ抗体を用いた測定系で、イムノクロマトグラフィ法は別の抗体であるにもかかわらず良好な相関が得られたことは、臨床検査のハーモナイゼーションの観点からは好ましい結果であった。

考察と結論

今回、大規模な外部精度管理調査で検討されたことのない項目を選択して、各種試薬キットで測定して相関性を調べた。その結果、測定試薬のキモとなる抗体、分析機器、測定法などが異なっても、ほとんどの検体で互換性のある結果が得られ、測定値は比較的ハーモナイズされていたことが判明した。さらに、ProGRPについても同様に抗体が異なっても、測定値はあまり変わらない結果も出ている。イムノアッセイでも最近開発されている試薬は従来の試薬と測定値に大きな違いがないものがある（開発されている）ことも認識しておくべきであると考えられた。また、ハーモナイズできていない項目は、APTM法などによって平均値に合わせるだけではなく、学術的に極端な試薬の改良を促すなど産官学共同での活動が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

1. 濱田悦子、河野景吾、家治翔平、前川真人：全血および血漿中のプロカルシトニン(PCT)迅速定量試薬「ラビットチップ

®PCT」の基礎的検討。

医学と薬学 75(6) 661-668, 2018. 査読有 (impress)

2. Yamanama K, Fujisawa T, Kusagaya H, Mori K, Niwa M, Furuhashi K, Kono M, Hamada H, Suda T, Maekawa M : IL-13 regulates IL-17C expression by suppressing NF- κ B-mediated transcriptional activation in airway epithelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 495 1534-1540, 2018. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.11.207 査読有
3. Nishio T, Kurabe N, Goto-Inoue N, Nakamura T, Sugiura H, Setou M, Maekawa M : Immunohistochemical expression analysis of leucine-rich PPR-motif-containing protein (LRPPRC), a candidate colorectal cancer biomarker identified by shotgun proteomics using iTRAQ Clinica Chimica Acta 471, 276-282, 2017. DOI:10.1016/j.cca.2017.06.011 査読有
4. Payne DA, Baluchova K, Peoc'h KH, van Schaik RHN, Chan KCA, Maekawa M, Mamotte C, Russomando G, Rousseau F, Ahmad-Nejad P; IFCC Committee for Molecular Diagnostics (C-MD). Pre-examination factors affecting molecular diagnostic test results and interpretation: A case-based approach. Clin Chim Acta 467,59-69, 2017. DOI: 10.1016/j.cca.2016.06.018. 査読有
5. Oishi T, Iino K, Okawa Y, Kakizawa K, Matsunari S, Yamashita M, Taniguchi T, Maekawa M, Suda T, Oki Y : DNA methylation analysis in malignant pheochromocytoma and paraganglioma. Journal of Clinical & Translational Endocrinology 7, 12-20, 2017. DOI:10.1016/j.jcte.2016.12.004 査読有
6. 前川真人 : IFCC と JSCC の活動とハーモナイゼーション 臨床病理 65(5) 564-565, 2017
7. Zhan F, Watanabe Y, Shimoda A, Hamada E, Kobayashi Y, Maekawa M: Evaluation of serum bone alkaline phosphatase activity in patients with liver disease: Comparison between electrophoresis and chemiluminescent enzyme immunoassay. Clin Chim Acta. 460, 40-45, 2016. DOI: 10.1016/j.cca.2016.06.008. 査読有
8. Kono M, Nakamura Y, Yoshimura K, Enomoto

- Y, Oyama Y, Hozumi H, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Hamada E, Colby TV, Maekawa M, Suda T: Nonspecific interstitial pneumonia preceding diagnosis of collagen vascular disease. *Respir Med.* 117, 40-47, 2016. DOI: 10.1016/j.rmed.2016.05.030. 査読有
9. Kono M, Nakamura Y, Oyama Y, Mori K, Hozumi H, Karayama M, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Yamada M, Hamada E, Colby TV, Maekawa M, Suda T: Increased levels of serum Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 115, 46-52, 2016. DOI: 10.1016/j.rmed.2016.04.013. 査読有
10. 金山尚裕、前川真人: 癌胎児性フィブロネクチン迅速定性試薬「ラビットチップ RfFN」の基礎的検討。産科と婦人科 83(5) 103-106, 2016. 査読有
11. 釣谷大輔、前川真人: CGM を活かした血糖管理の有用性と今後の展望 臨床病理 64(10) 1171-1177, 2016. 査読有
12. Sato R, Tsuchiya KJ, Matsuzaki H, Takei N, Itoh H, Kanayama N, Suda T, Watanabe H, Ohashi T, Tanaka M, Nishimura S, Maekawa M, HBC study group: Fetal Environment and Glycosylation Status in Neonatal Cord Blood: A Comprehensive Mass Spectrometry-based Glycosylation Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 95(14), e3219, 2016. DOI:10.1097/MD.0000000000003219 査読有
13. Sato R, Shirai K, Maekawa M, Genma R, Ohki S, Morita H, Suda T, Watanabe H: Glycaemia and autistic traits in very low birth weight infants in adulthood. *Diabetes Metab.* 42(4), 285-286, 2016. DOI: 10.1016/j.diabet.2016.02.005. 査読有
14. 竹岡啓子、日高 洋、菱沼 昭、池田勝義、大久保滋夫、土屋達行、橋口照人、古田 耕、堀田多恵子、松下一之、松本祐之、村上正巳、前川真人: 甲状腺刺激ホルモン(TSH)のハーモナイゼーション 臨床病理 64(4) 375-379, 2016. 査読有
15. Kotani K, Tashiro J, Yamazaki K, Nakamura Y, Miyazaki A, Bujo H, Saito Y, Kanno T, Maekawa M: Investigation of MDA-LDL (malondialdehyde-modified low-density lipoprotein) as a prognostic marker for coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 450:145-50, 2015. DOI: 10.1016/j.cca.2015.08.003. 査読有
16. Ito T, Aoshima M, Sugiura K, Fujiyama T, Ito N, Sakabe JI, Akiyama M, Maekawa M, Tokura Y: Pustular psoriasis-like lesions associated with hereditary lactate dehydrogenase M subunit deficiency without interleukin-36 receptor antagonist mutation: long-term follow-up of two cases. *Br J Dermatol.* 172(6): 1674-1676, 2015 DOI: 10.1111/bjd.13590. 査読有
17. Mori K, Fujisawa T, Kusagaya H, Yamanaka K, Hashimoto D, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Maekawa M, Suda T: Synergistic Proinflammatory Responses by IL-17A and Toll-Like Receptor 3 in Human Airway Epithelial Cells. *PLoS One.* 10(9):e0139491, 2015 DOI:10.1371/journal.pone.0139491. 査読有
18. 山影 望、名倉理教、石川仁子、泉 敦、伊藤尚美、上村桂一、上村のり子、釋 悦子、鈴木裕子、高須光世、山本理恵、前川真人: 静岡県西部地域における *Haemophilus influenzae* の疫学解析 日本臨床微生物学雑誌25(4): 33-38, 2015. 査読有
19. Ikeda K, Ichikawa K, Hashiguchi T, Hidaka Y, Kang D, Maekawa M, Matsumoto H, Matsushita K, Okubo S, Tsuchiya T, Furuta K: Evaluation of the short-term stability of specimens for clinical laboratory testing. *Biopreserv Biobank* 13(2): 135-143, 2015. DOI: 10.1089/bio.2014.0072. 査読有
- [学会発表](計 12 件)
1. Hamada E, Maekawa M: Fundamental evaluation of a novel reagent for Interleukin 2 receptor measurement using general clinical chemistry analyzers. 69th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo July 30- August 3, 2017, San Diego USA
2. Hamada E, Maekawa M: Analytical evaluation of a novel lipase activity measurement reagent from Shino-Test Co. using DGGMR as substrate. IFCC

- EuroMedLab Athens 2017, June 11-15, 2017, Athens Greece
3. 前川真人：一般社団法人日本臨床化学会代表理事の立場から。
第27回日本臨床検査専門医会春季大会、2017, 2月25日 熱海
 4. 前川真人：臨床化学の国際標準化、特に血清酵素活性測定を中心として。
日衛協臨床検査精度管理調査結果検討会
2017, 6月5日 東京
2017, 7月3日 大阪
 5. Hamada E, Kondo T, Maekawa M: Trend of Turnaround Time in Our Laboratory.
14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress
November 27 2016, Taipei
 6. Hamada E, Maekawa M: Basic Evaluation of a novel Glycohemoglobin Analyzer RC20 for POCT.
68th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo August 3, 2016, Philadelphia
 7. Yamadate S, Yamazaki H, Matsusita M, Hoshino T, Ueda S, Maekawa M, Nakayama T : Study of reference materials suitable for the IFCC method of ALP measurement.
68th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo August 3, 2016, Philadelphia
 8. 前川真人：IFCC と JSCC の活動とハーモナイゼーション
63 回日本臨床検査医学会学術集会、平成2016, 9月3日 神戸
 9. 前川真人：がん患者数の推移と新規診断システム導入の臨床的意義
第14回医療機器フォーラム
2016, 9月5日 東京
 10. Kono M, Nakamura Y, Oyama Y, Hironao H, Karayama M, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Yamada M, Hamada E, Colby TV, Suda M, Maekawa M: Increased levels of serum Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.
第13回慶北 - 浜松合同シンポジウム
2015年10月 韓国
 11. Hamada E, Maekawa M. Evaluation of "HISCL-TARC", a Biomarker for Atopic Dermatitis, by Automated Immunoassay System "HISCL 5000". 2015 IFCC. June, 2015, France (Paris)
 12. Kono M, Nakamura Y, Oyama Y, Hironao H,

Karayama M, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Maekawa M, Suda T: Mac-2 binding protein glycosylation isomer (M2BPGi) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). American Thoracic Society International Conference. May, 2015, US (Denver)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 真人 (MAEKAWA MASATO)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：20190291