



NO.15 免疫血清検査の自動化と問題点



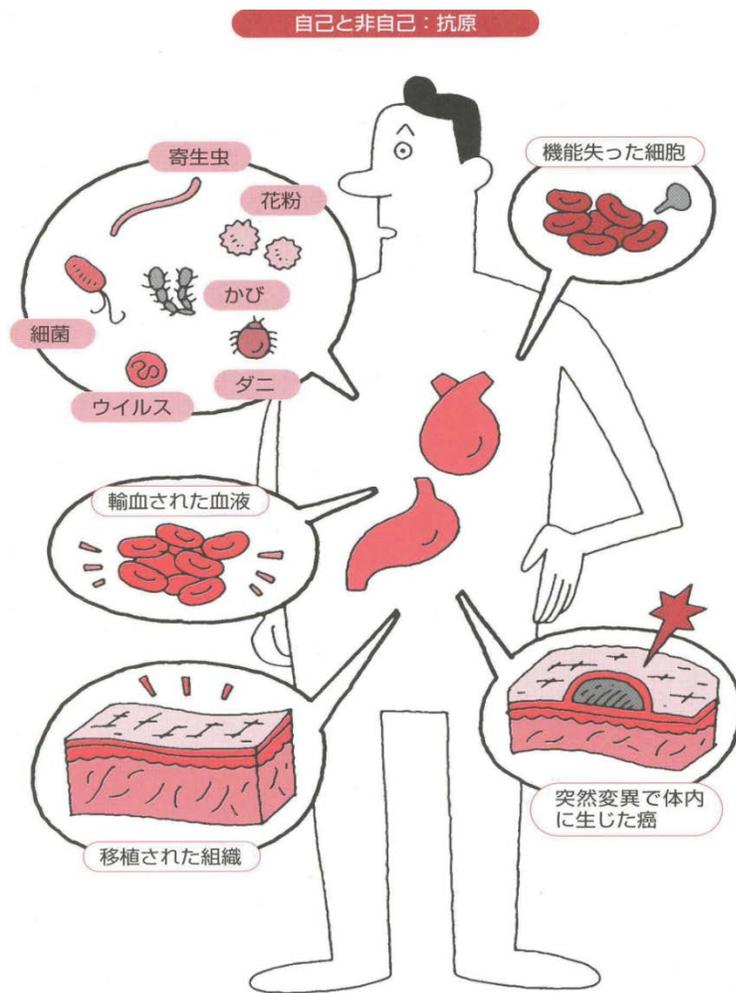
東北医科薬科大学病院 検査部
小堺利恵

Agenda

- ◆ 抗原抗体反応
- ◆ 免疫検査の歴史と種類および原理
- ◆ 免疫血清検査の自動化 } **課題**
- ◆ 免疫血清検査のピットフォール
- ◆ 免疫血清検査の精度管理



免疫とは？



免疫 = 生体防御機構

外から侵入してくるもの

ウイルス、細菌、寄生虫などの微生物、カビ、異物・毒素など

自己の内部にあるもの

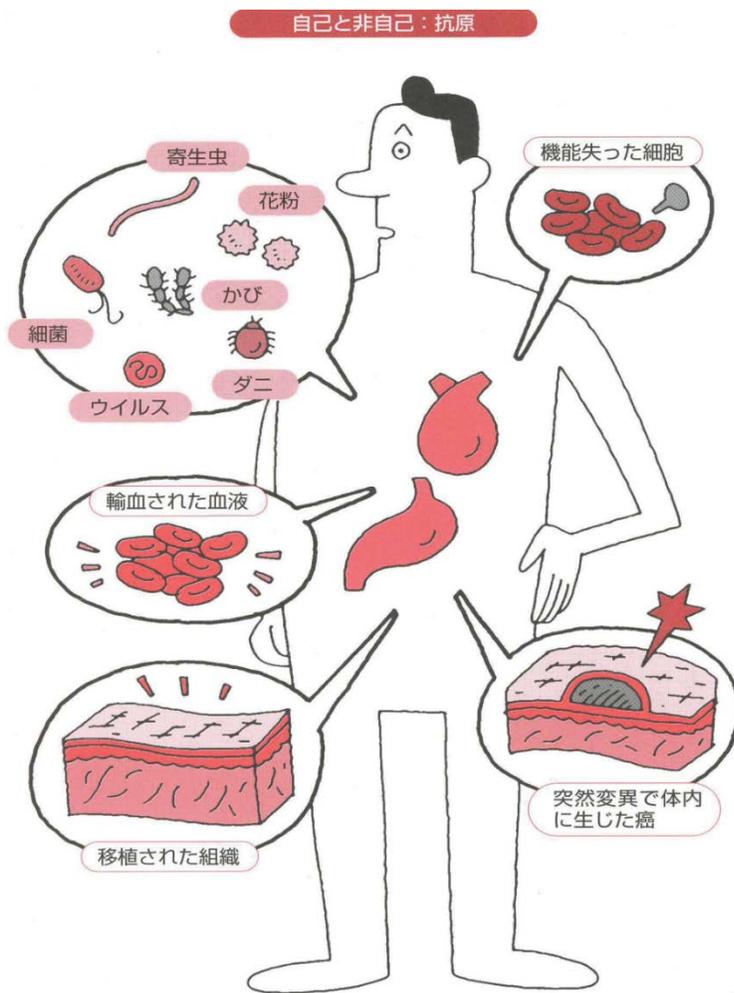
老朽化した細胞、がん細胞など

自己組織の補正をするもの

輸血された血液、移植された臓器など

非自己

免疫とは？

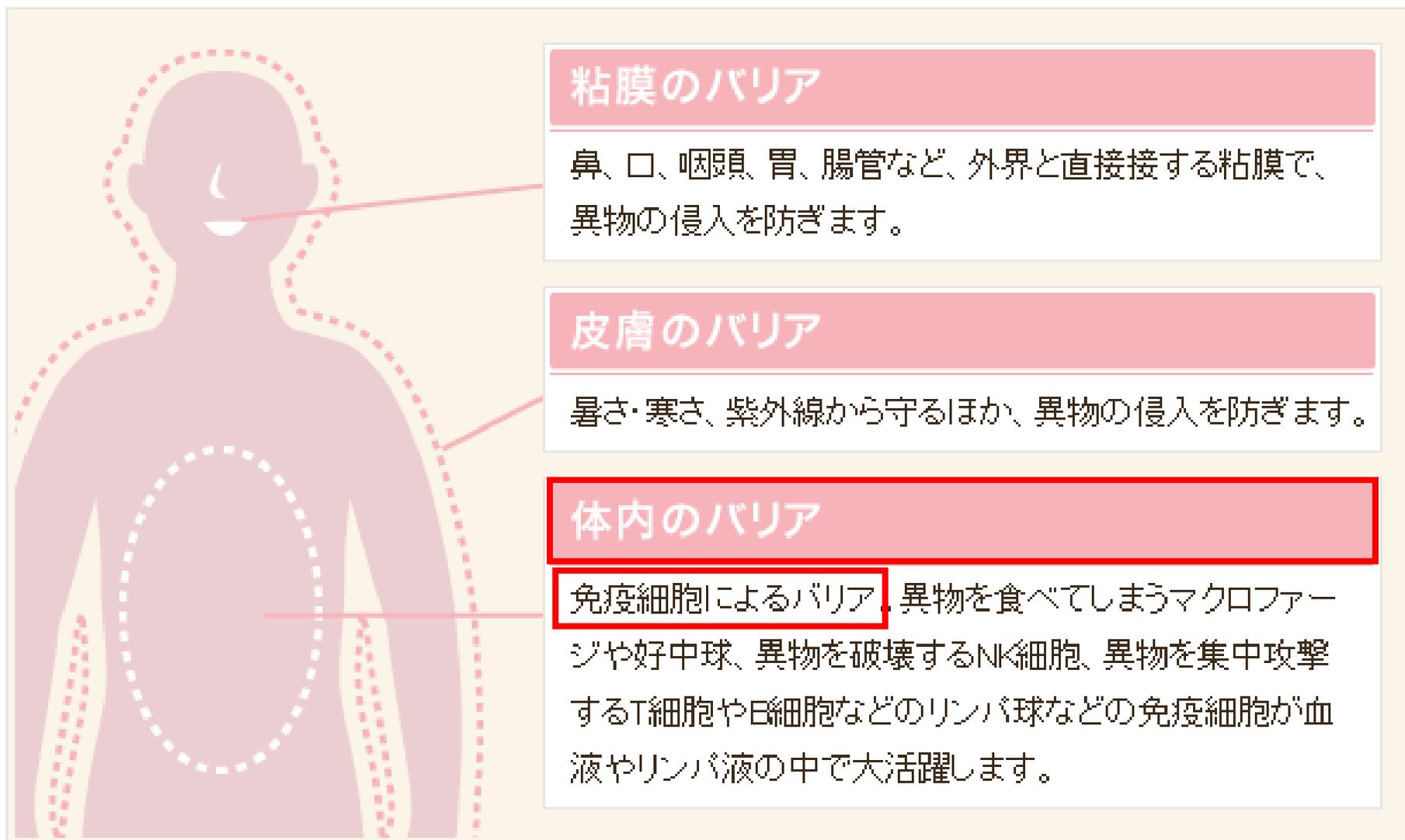


免疫 = 生体防御機構

私たちの体は、非自己（抗原）の侵入を認識すると抗体により結合して排除しようとする。

敵と味方

もともと備わっている防御機能とは？



粘膜のバリア

鼻、口、咽頭、胃、腸管など、外界と直接接する粘膜で、異物の侵入を防ぎます。

皮膚のバリア

暑さ・寒さ、紫外線から守るほか、異物の侵入を防ぎます。

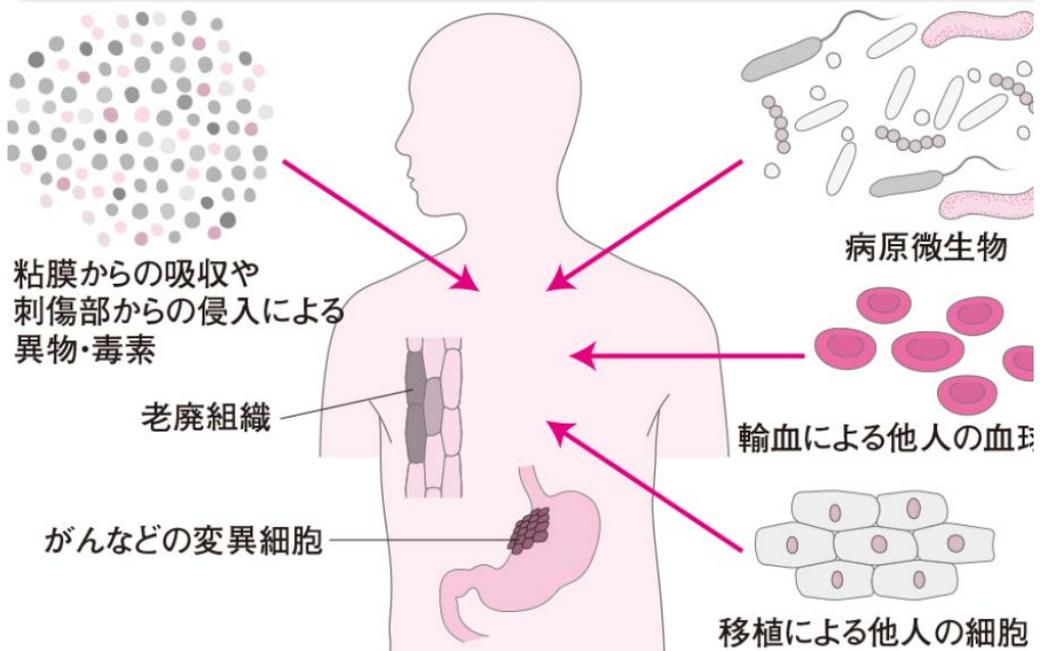
体内のバリア

免疫細胞によるバリア、異物を食べてしまうマクロファージや好中球、異物を破壊するNK細胞、異物を集中攻撃するT細胞やB細胞などのリンパ球などの免疫細胞が血液やリンパ液の中で大活躍します。

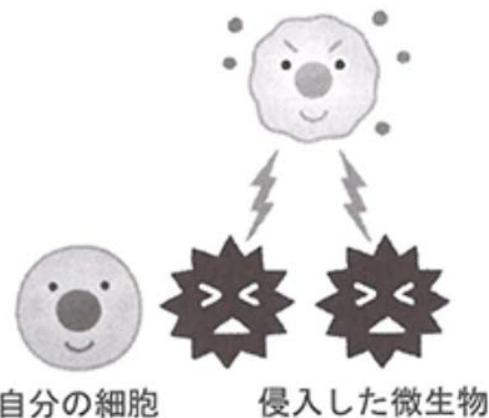
自分自身を守る生体防御機構とは？

1. 敵を見分ける

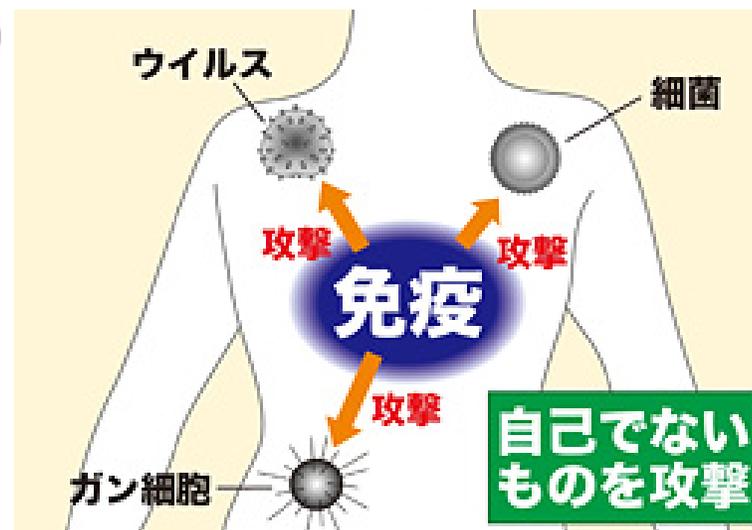
- 自己（自分自身）
- 敵 = 非自己 = 異物（細菌、ウイルス、花粉などアレルギー物質、自己免疫疾患）



① 自己と非自己を区別する



②



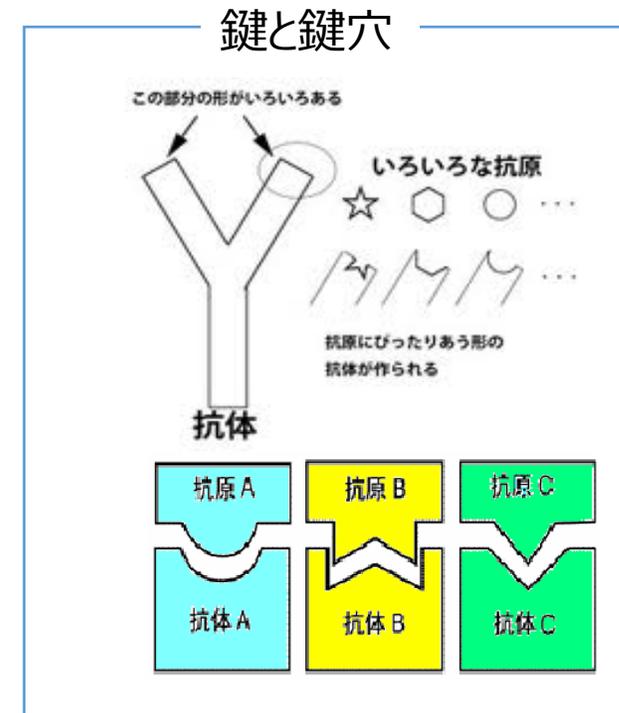
抗原・抗体とは？

私たちの体は、非自己（抗原）の侵入を認識すると抗体により結合して排除しようとする。

抗原（Ag）：特異的に反応する抗体を産生する
免疫機構を刺激する物質
→非自己 = 敵
(タンパク質・糖質・脂質・核酸など)

抗体（Ab）：抗原刺激に反応して産生され、
抗原と特異的に結合する物質
→味方 (タンパク質)

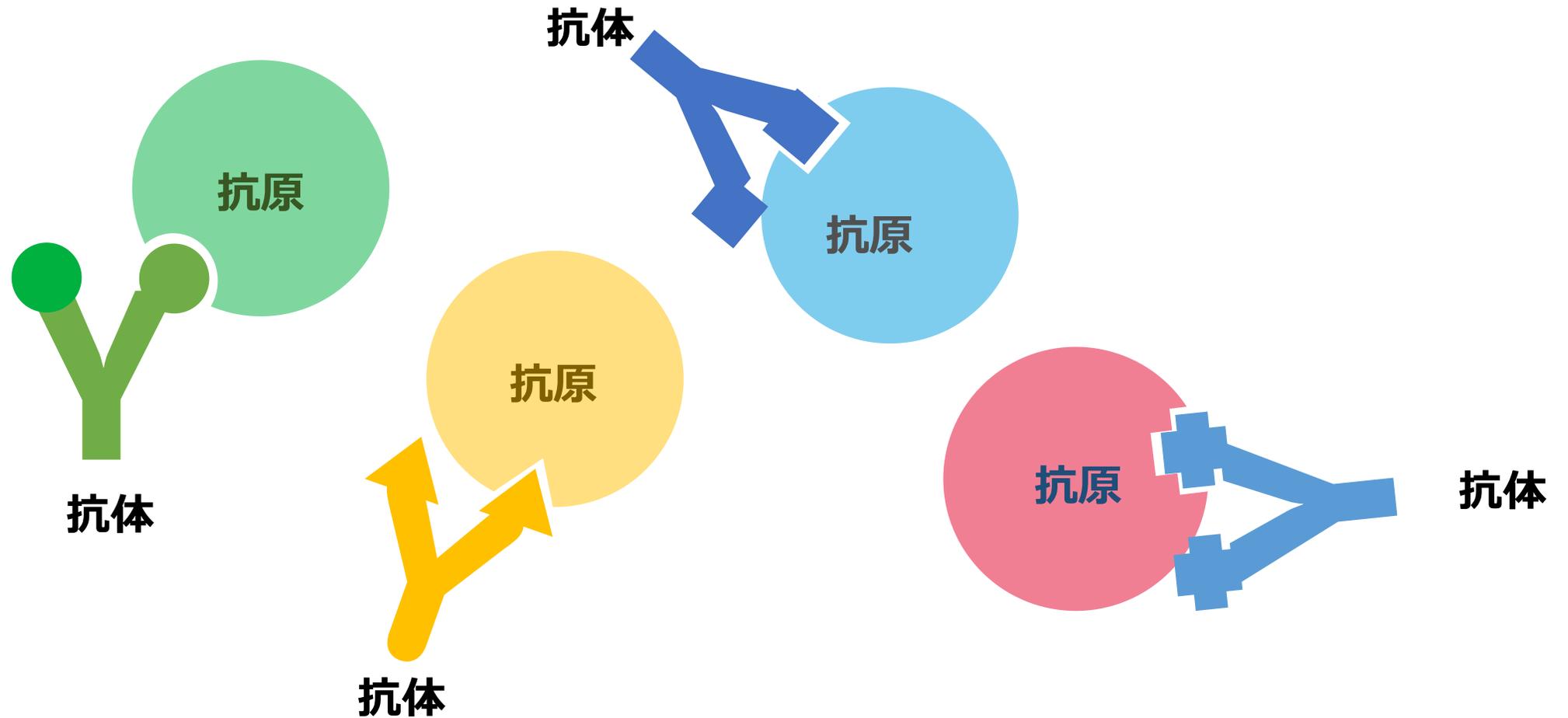
抗体には特定の抗原と結合する性質があり、これを「**抗原抗体反応**」といいます。



免疫血清検査ではこの「抗原抗体反応」が、様々な**測定**に応用されています。

抗原抗体反応の特異性

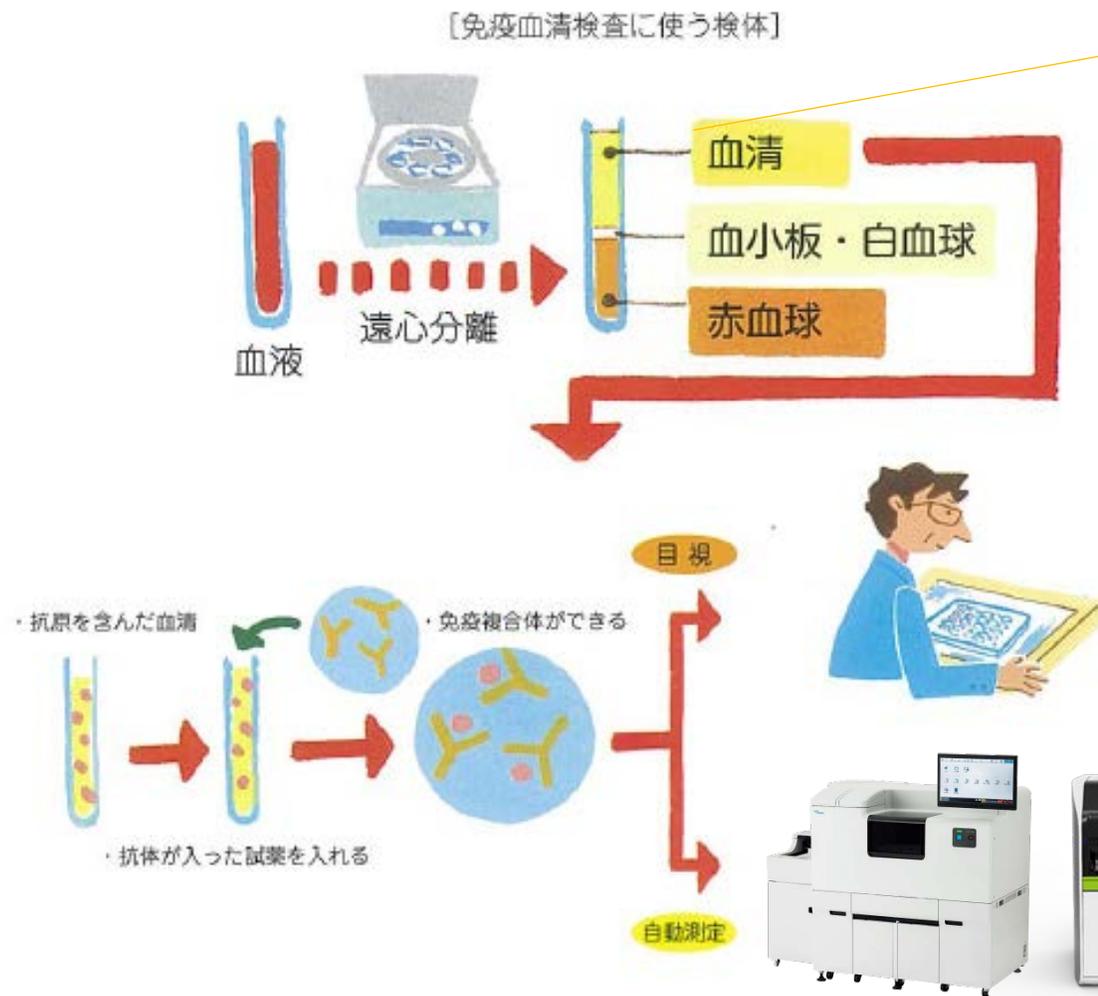
- 抗原抗体反応は鍵と鍵穴の関係。特異性が極めて高い。



免疫血清検査とは？

抗原抗体反応を使った検査です。

検査には血清を使うことが多いですが、血漿・胸水などを使うこともあります。



血清は血液を遠心分離した時にできる上澄みで、この中に異物（抗原）が存在します。



免疫学的測定法(イムノアッセイ)の測定対象物

代表的な例

- **抗原**を捕まえるもの

ウイルス抗原
腫瘍マーカー
内分泌ホルモン

- **抗体**を捕まえるもの

抗ウイルス抗体
アレルギー抗体
自己抗体



Agenda

- ◆ 抗原抗体反応
- ◆ 免疫検査の歴史と種類および原理
- ◆ 免疫血清検査の自動化
- ◆ 免疫血清検査のピットフォール
- ◆ 免疫血清検査の精度管理



免疫学的検査法と歴史

1896年	直接凝集法(Widal 反応)	凝集法
1940年	免疫電気泳動法	沈降反応
1948年	オクタロニー法	沈降反応
1950年	間接凝集法	凝集法
1950年	蛍光抗体法(IF)	標識抗原抗体法
1960年	放射免疫測定法 (RIA)	
1970年	比濁法 (TIA) 、比ろう法 (NIA)	
1970年	イムノクロマト法(ICA)	
1970年	酵素・蛍光免疫測定法 (EIA、FEIA)	
1987年	粒子計数免疫測定法(CIA)	
1980年～	発光法(LOCI、CLEIA 、CLIA、ECLIA 、BLEIA)	
1975年	モノクローナル抗体の作成技術が開発されて、多く免疫検査項目が高感度で精度良く測定可能となった	

標識免疫高感度測定法変遷



RIA IRMA

EIA FIA CLEIA

放射性免疫測定法 (RIA法)	1957年
酵素免疫測定法 (EIA法)	1972年
蛍光免疫測定法 (FIA法)	1975年
発光免疫測定法 (LIA法)	1982年

CLIA

ECLIA、LOCI、BLEIA

- ・RIA法 : 放射免疫測定(Radio immuno assay) 法(競合法)
- ・IRMA法 : 免疫放射測定 (Immuno radio metric assay)法(サンドイッチ法)
- ・CLEIA法 : 化学発光酵素免疫測定法
- ・CLIA法 : 化学発光免疫測定法
- ・ECLIA法 : 電気化学発光免疫測定法
- ・LOCI法 : Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay法(ホモジニアス測定法)
- ・BLEIA : 生物発光免疫測定法

各測定法の感度（検出限界）

1 (g/ml) 10⁻³ (mg/ml) 10⁻⁶ (μg/ml) 10⁻⁹ (ng/ml) 10⁻¹² (pg/ml) 10⁻¹⁵ (fg/ml)



発光法 (LIA法)



RIA・EIA・FEIA



蛍光抗体法・イムノクロマト法(ICA法)



ラテックス比濁法・ラテックス比ろう法



比濁法・比ろう法・凝集法



オクタロニー法

ホモジニアスとヘテロジニアス

ホモジニアスアッセイ

- B/F分離を必要としないイムノアッセイ
- 凝集反応試薬(赤血球・人工粒子凝集試薬)、ラテックス試薬、LOCI 等

B/F分離とは？

抗体（抗原）と**結合**している抗原（抗体）を、**遊離**の抗原（抗体）と分離する操作。



ヘテロジニアスアッセイ

- B/F分離を必要とするイムノアッセイ
- RIA、EIA、FEIA、CLEIA、CLIA、ECLIA、BLEIA 等

➡ 主流は、高感度・高特異性を得やすいヘテロジニアスアッセイ

免疫学的検査法 各論



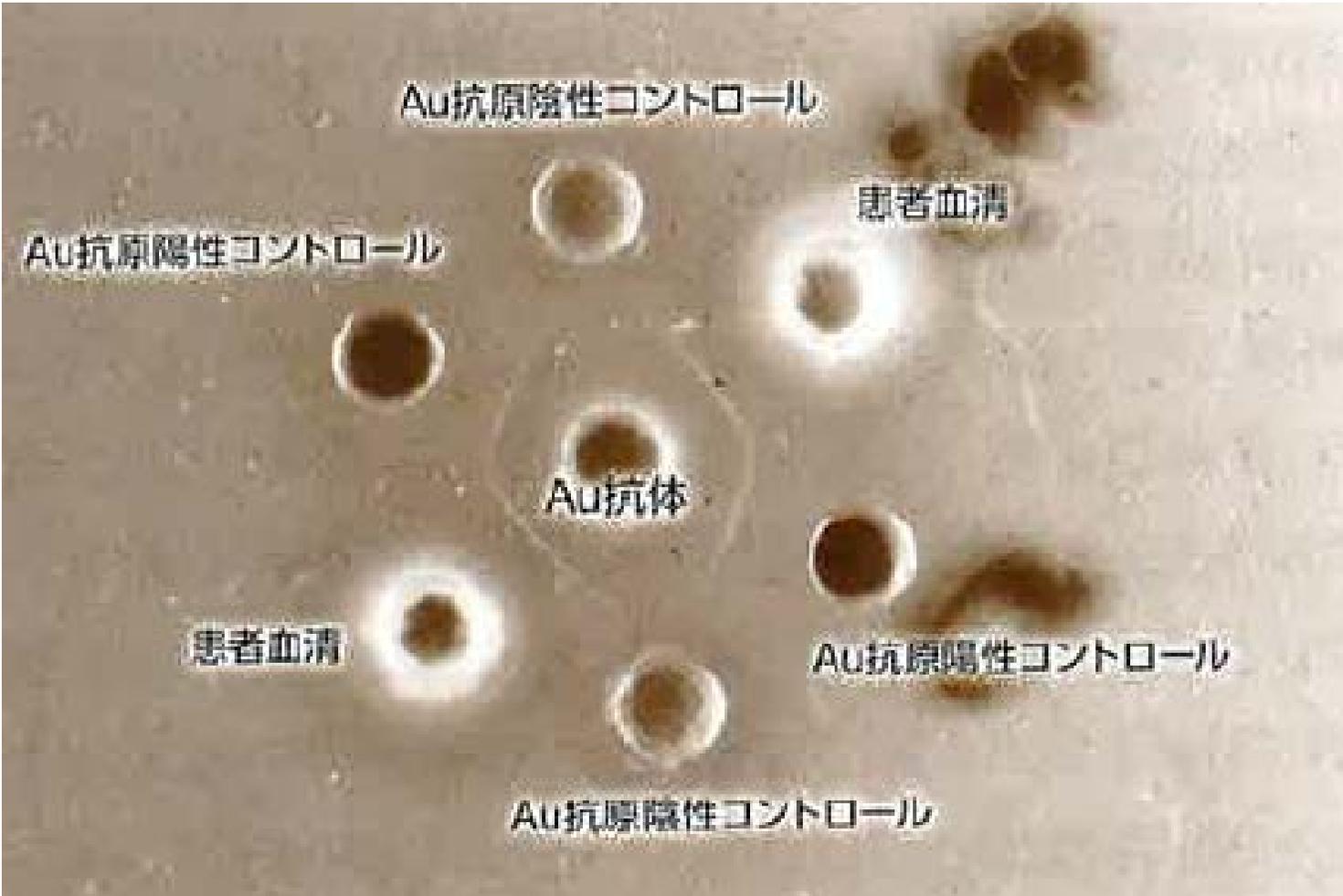
オクタロニー法(2重免疫拡散法)

オクタロニー(Ouchterlony)法

スライドガラス上に薄い寒天培地を作成し、適当な間隔と配置で小孔をいくつか空け、抗血清や抗原を入れる方法

抗血清と抗原はお互いに2次元の方向に拡散して、最適比の場所で線状の沈降物を形成する

この沈降線の形状により、抗原及び抗体の定性的分析を行う



オーストラリア抗原 (Au抗原) の検出

Au抗原: HBs抗原、Au抗体: HBs抗体

電気泳動法

■ 電気泳動

溶液中の荷電物質が電場のもとで移動する現象

ペプチド・タンパク質・核酸（DNA・RNA）など、水溶液中で+又は-の荷電を持つ物質が電気泳動の試料

■ 支持体、荷電物質の移動

水溶液中では試料が拡散してしまうため支持体として**膜やゲルを用い**、これらの中を荷電物質（試料）が移動し、直流電場下で、その性質（形や荷電状態や分子量等）に応じて自分の電荷と反対の電極へ向かって移動

血清蛋白質は両性電解質であるため、アルカリ溶液中では負に荷電するため、電場を与えると、陽極側へ移動する

■ 物質の分離

移動速度が物質によって異なることで、小さな物質は速く、大きな物質は遅く移動し、分子量に応じた分離が可能。移動距離と分子量はほぼ反比例するので、電気泳動を用いて分子量の決定も可能

■ 分離・分析

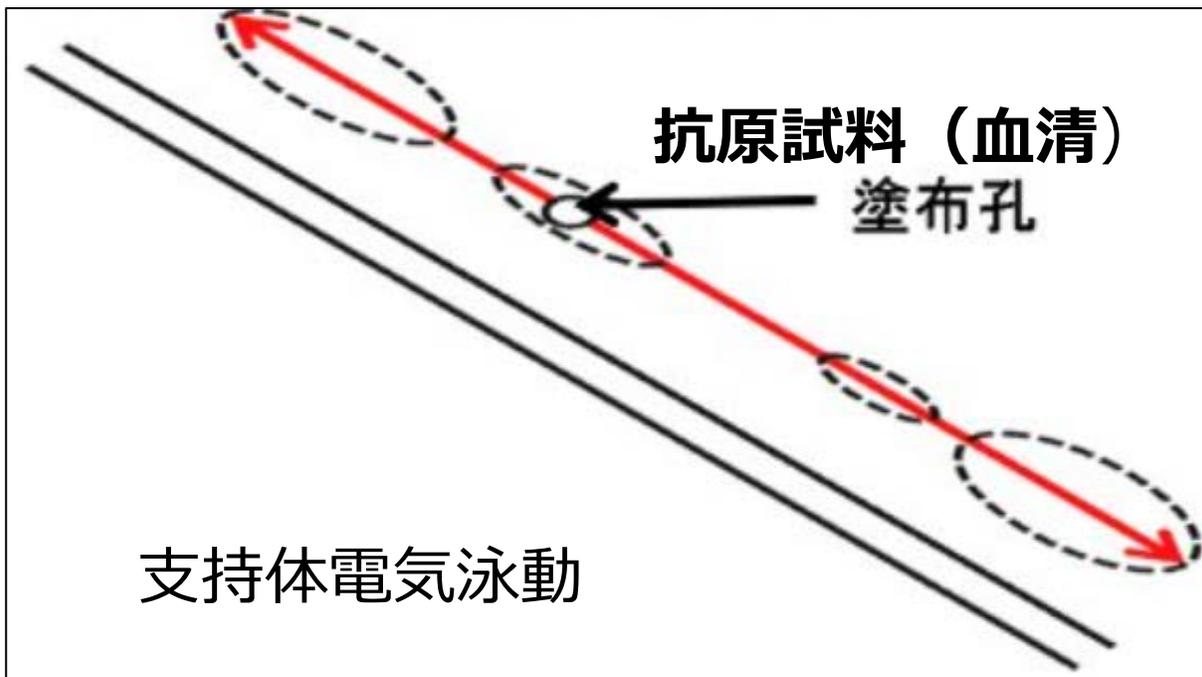
試料中の各成分を分離、分析することが出来る

電気泳動はこの様な分離原理を利用して分子量決定をはじめ等電点や純度決定、各成分の定量・精製等に利用され、タンパク質や核酸の主たる分離・分析法となっている



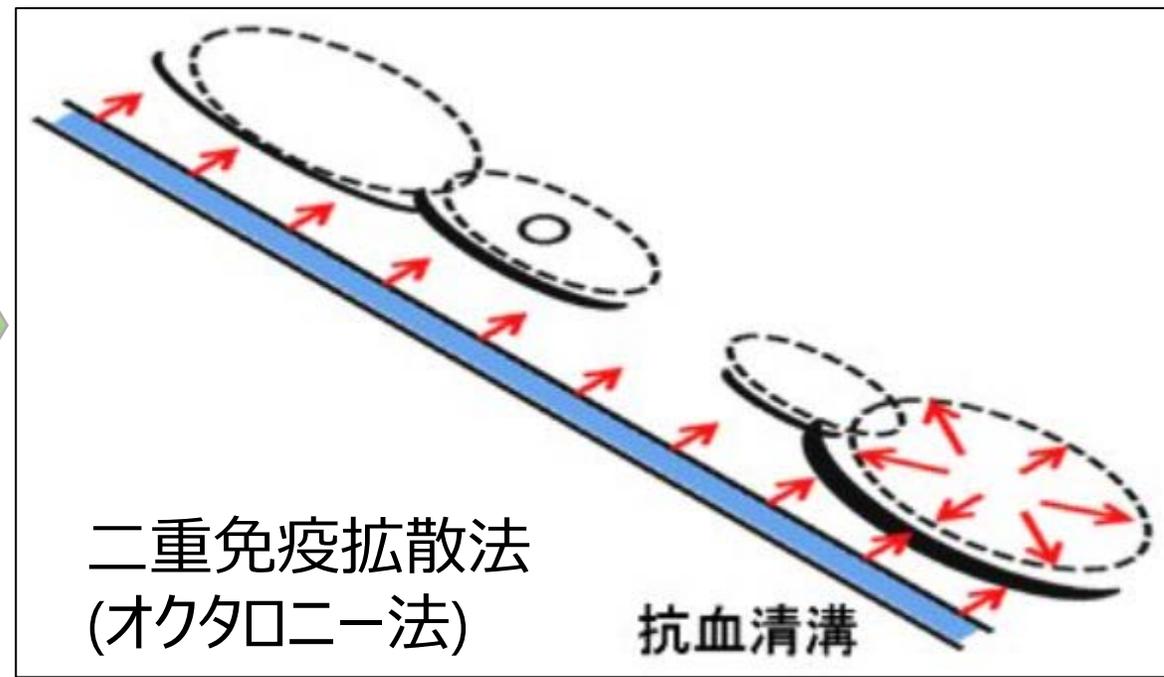
免疫電気泳動法 原理

電気泳動による抗原成分の分離



寒天ゲル平板の塗布孔に抗原試料（血清）を入れ
電気泳動を行う
それにより**抗原（蛋白）成分が適度に分離される**

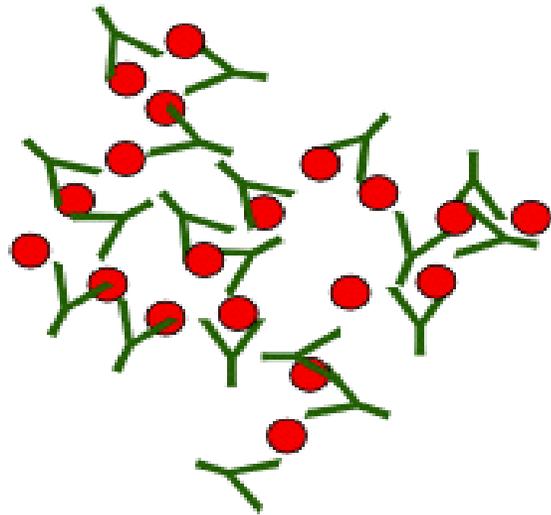
抗原成分の抗原と抗血清の抗体の抗原抗体
反応により弧状の沈降線が現れる



泳動方向に切った溝の中に抗血清を流し込み、抗原および
抗体が支持体内に拡散し、両者が出会ったところで抗原抗
体反応が起こる
その結果、各蛋白成分の位置に対応して弧状の沈降線が
現れる

凝集反応

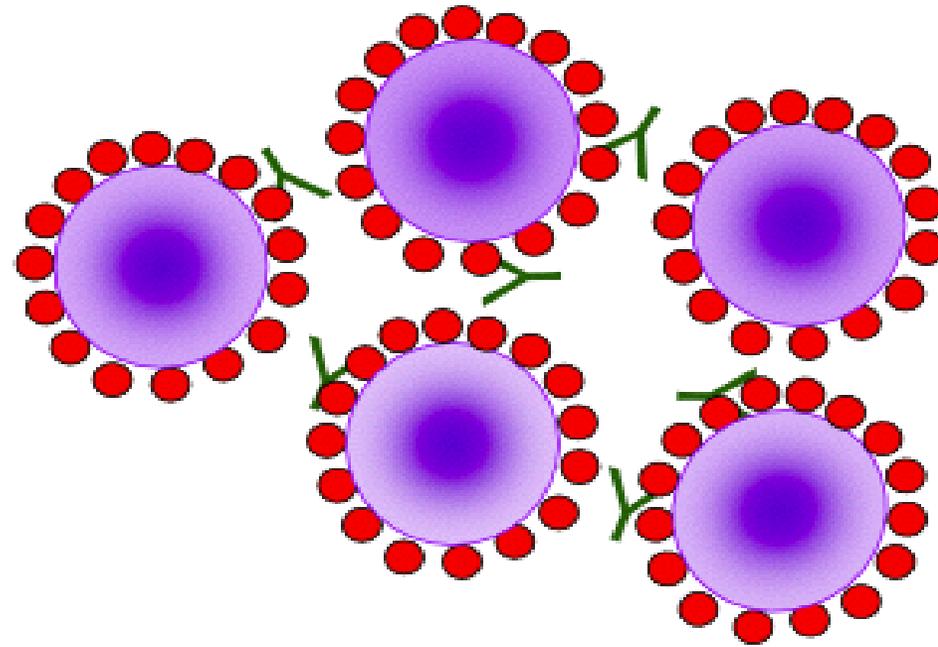
直接凝集反応



Widai反応、血液型(ABO式、Rh式)等

抗原と抗体の反応凝集を直接肉眼で判定できる

間接凝集反応

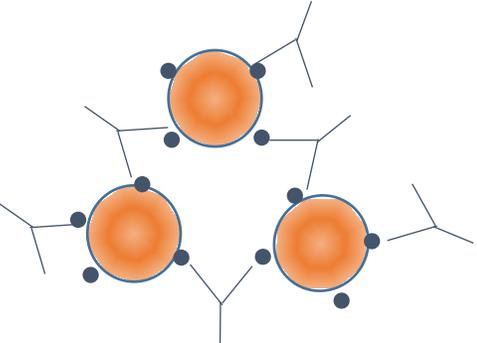
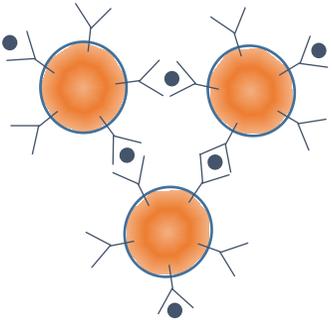


受身(逆受身)凝集法

担体に一定量の抗原あるいは抗体を感作

抗原と抗体の反応凝集を肉眼的に観察できるように、抗原あるいは抗体を**特定の物質に吸着させて**凝集の形で判定できるようにしたもの

間接凝集反応

反応形式	反応原理	目的	利用された検査項目
<p>PHA</p> <p>受身赤血球凝集反応 Passive Hemagglutination</p>		<p>抗体の検出</p>	<p>TPHA ASO サイログロブリン マイクロゾーム RAHA</p>
<p>R-PHA</p> <p>逆受身赤血球凝集反応 Reversed Passive Hemagglutination</p>		<p>抗原の検出</p>	<p>HBs抗原 HBe抗原 AFP HCG</p>

抗原・

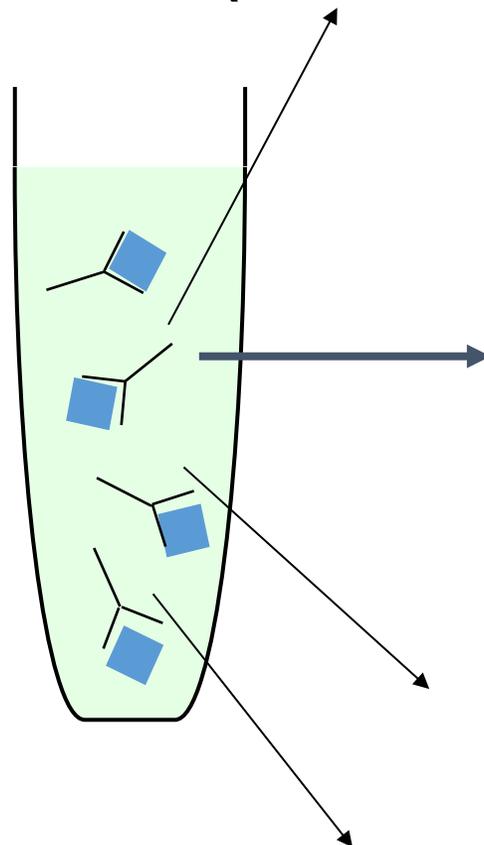
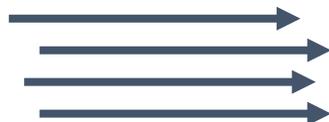
抗体 

血球 

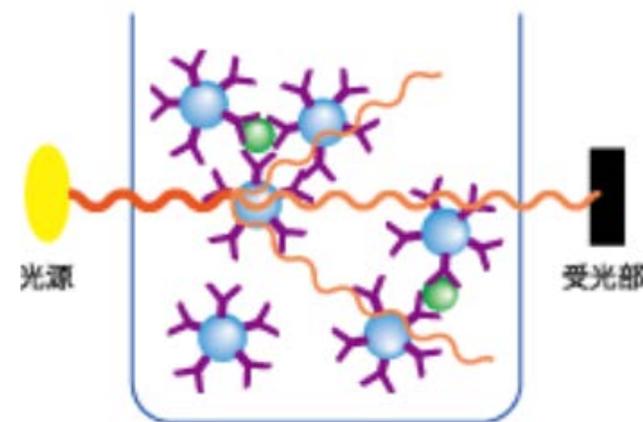
免疫比濁法 (turbidimetric (タービディメトリック) immunoassay:TIA法)

溶液内沈降反応の光学的測定

光源からの光



検出



● レックスを用いた方が高感度

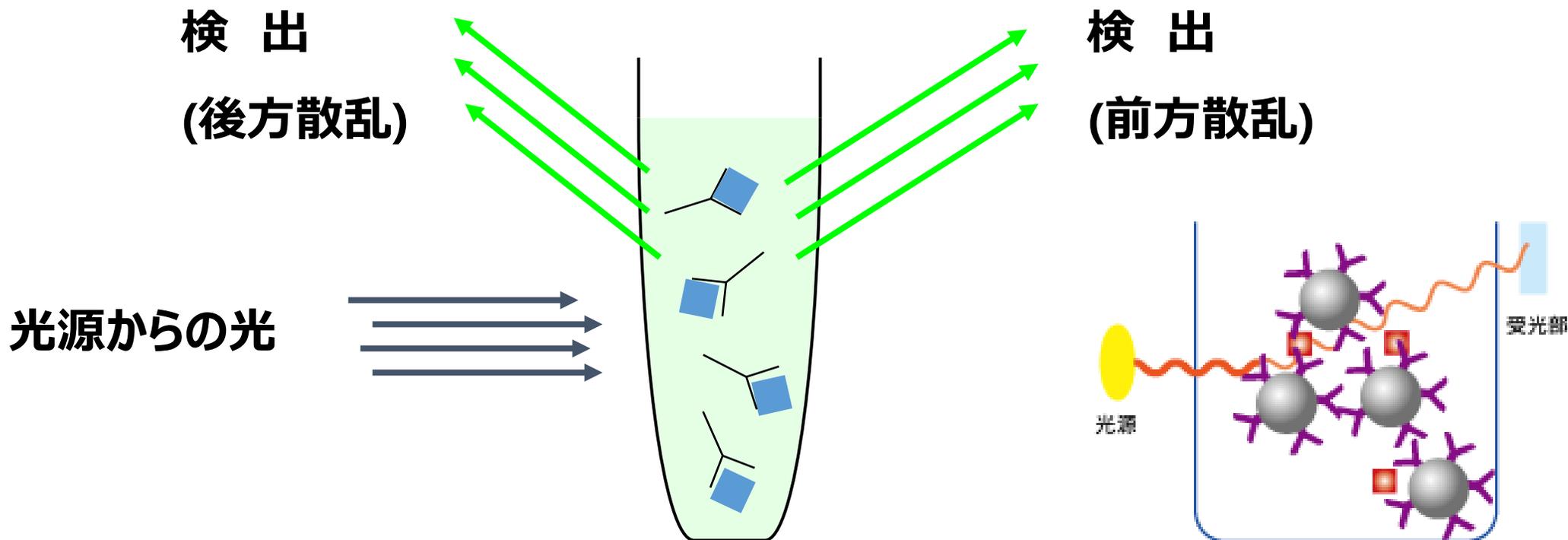
比濁法

混濁反応を呈する物質の測定法で濁りの度合い（濁度）を測定し濃度を求める方法。検体と試薬を反応させた溶液に光を当て、その**入射光と透過光の強度比の対数値が溶液の濃度に比例する性質を用いて定量する検査法**

T I A (turbidimetric immunoassay)法 免疫比濁法

目的物質（抗原）に対応する抗体を加えると抗原抗体反応により、抗原抗体複合物が生成される。この複合物による濁りが抗原量に比例するので、この濁度を測定し既知濃度の標準物質を用いた検量線により濃度を測定する検査法

免疫比ろう(朧)法(nephelometric (ネフェロメトリック) immunoassay:NIA法)



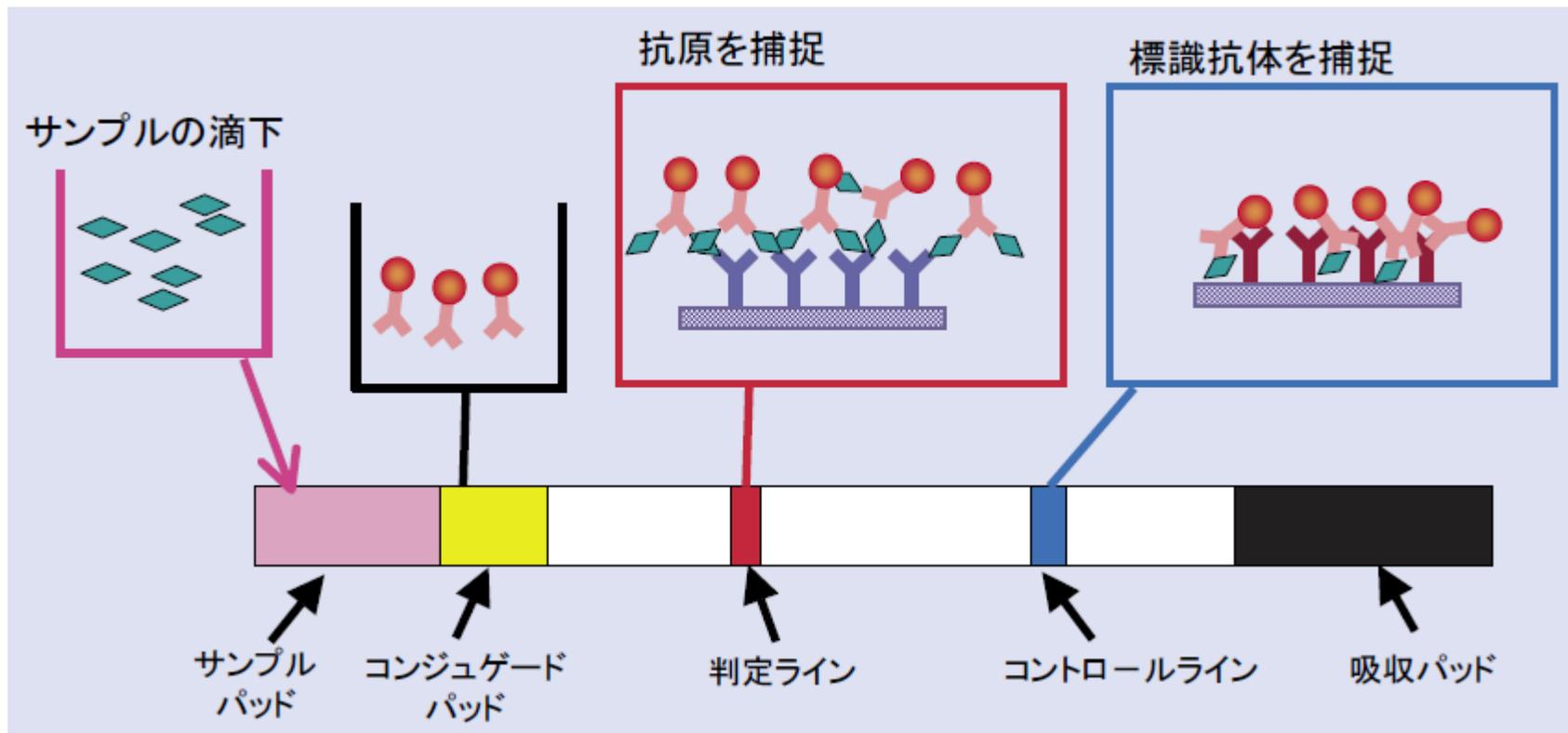
● 免疫比ろう法の方が、免疫比濁法よりやや高感度

● レックスを用いた方が高感度

免疫比ろう法

抗体 (または抗原) に、検体中の抗原 (または抗体) を反応させ、抗原-抗体複合物を形成させます。その複合物に光をあて、散乱した光を測定することで、検体に含まれる抗原 (または抗体) を定量します

イムノクロマト法(immune chromatography(クロマトグラフィー)assay: ICA)



イムノクロマト法

サンプル中の抗原(または抗体)は、検体滴下部(サンプルパッド)にあらかじめ準備されたコンジュゲート(標識)で標識された抗体(標識抗体)または標識された抗原(標識抗原)と免疫複合体を形成しながらセルロース膜状を移動し、セルロース膜状上にあらかじめ用意された補足抗体(または抗原)上に免疫複合体がトラップされ呈色する。それを目視により判定する方法

ヘテロジニアス法によるサンドイッチ法、競合法

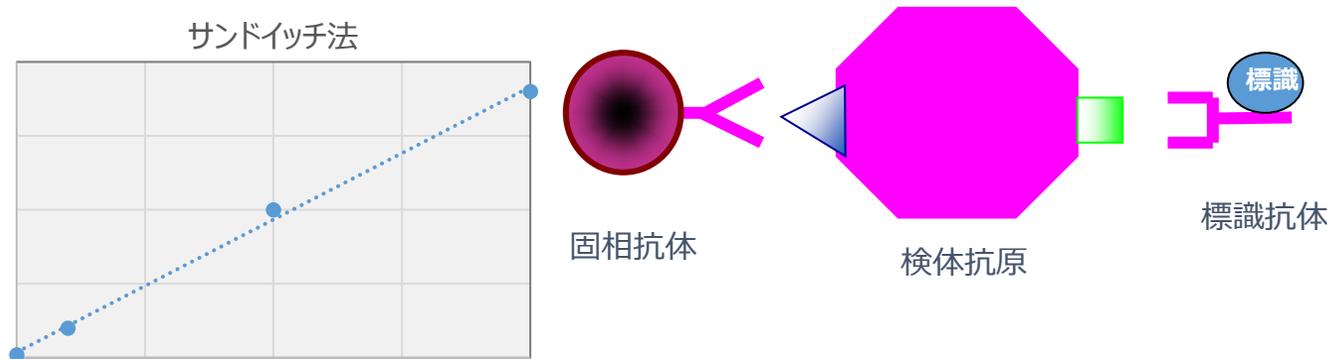
◆ サンドイッチ法

2種類以上の抗体(抗原)を用いて、測定抗原(抗体)をサンドイッチして測定する方法

1ステップ(B/F分離が1回)

2ステップ(B/F分離が2回)

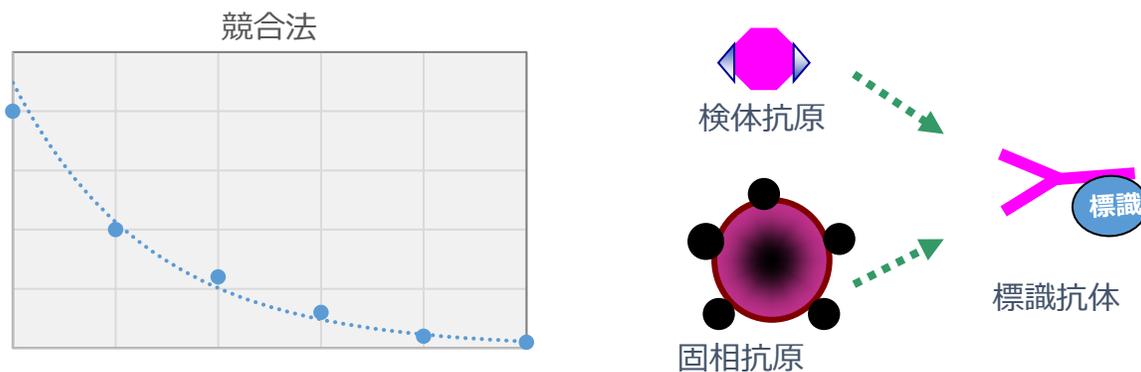
2方法の測定法が有る



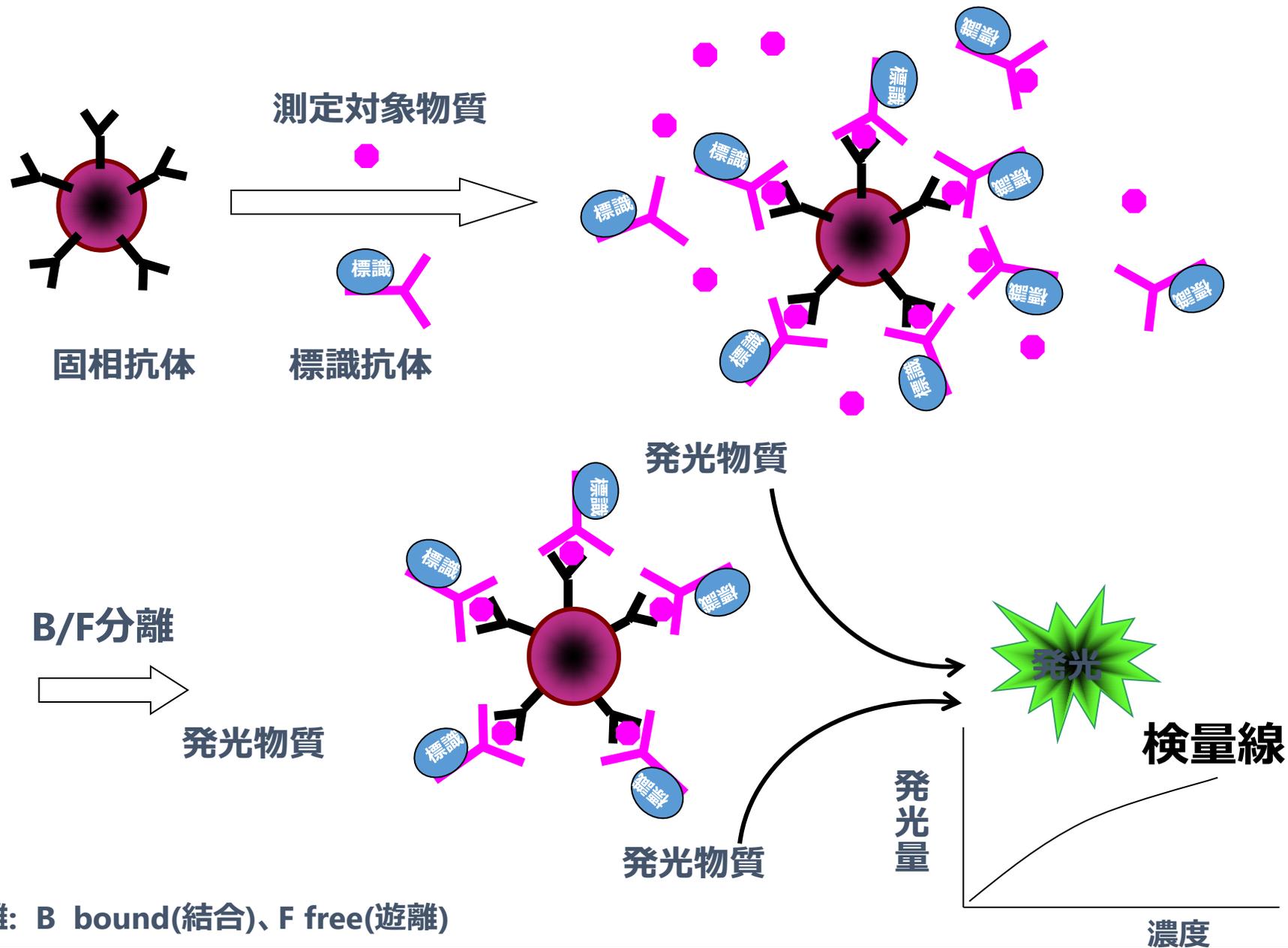
◆ 競合法

測定対象にエピトープが一つしかない抗原または抗体をサンドイッチすることが難しい低分子物質を測定する場合に原則用いられます

固相抗原(抗体)、標識抗体(抗原)、検体中の抗原(抗体)による競争反応を利用して測定する方法

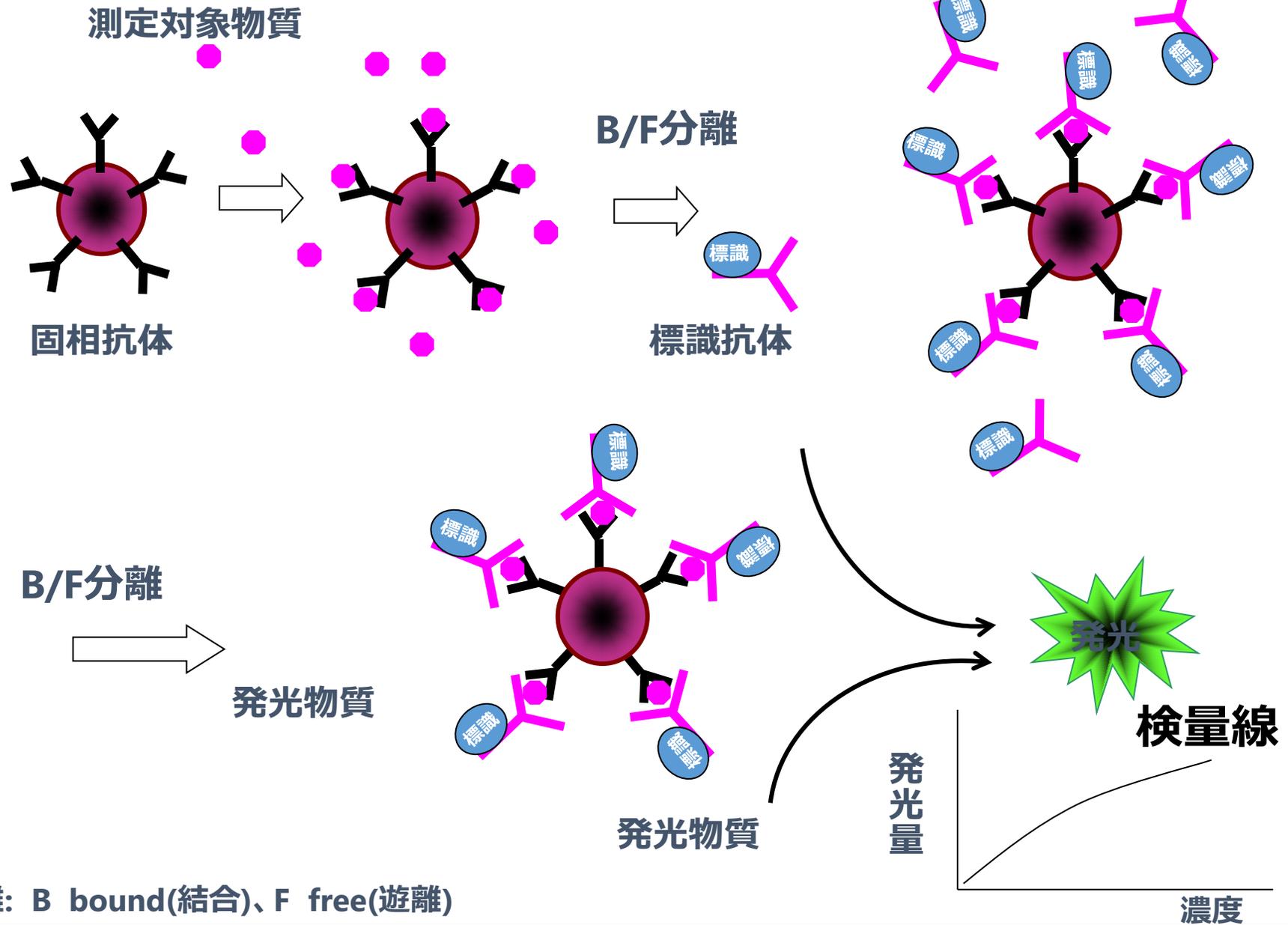


1ステップ法の測定原理 (抗原検出サンドイッチ法)



B/F分離: B bound(結合)、F free(遊離)

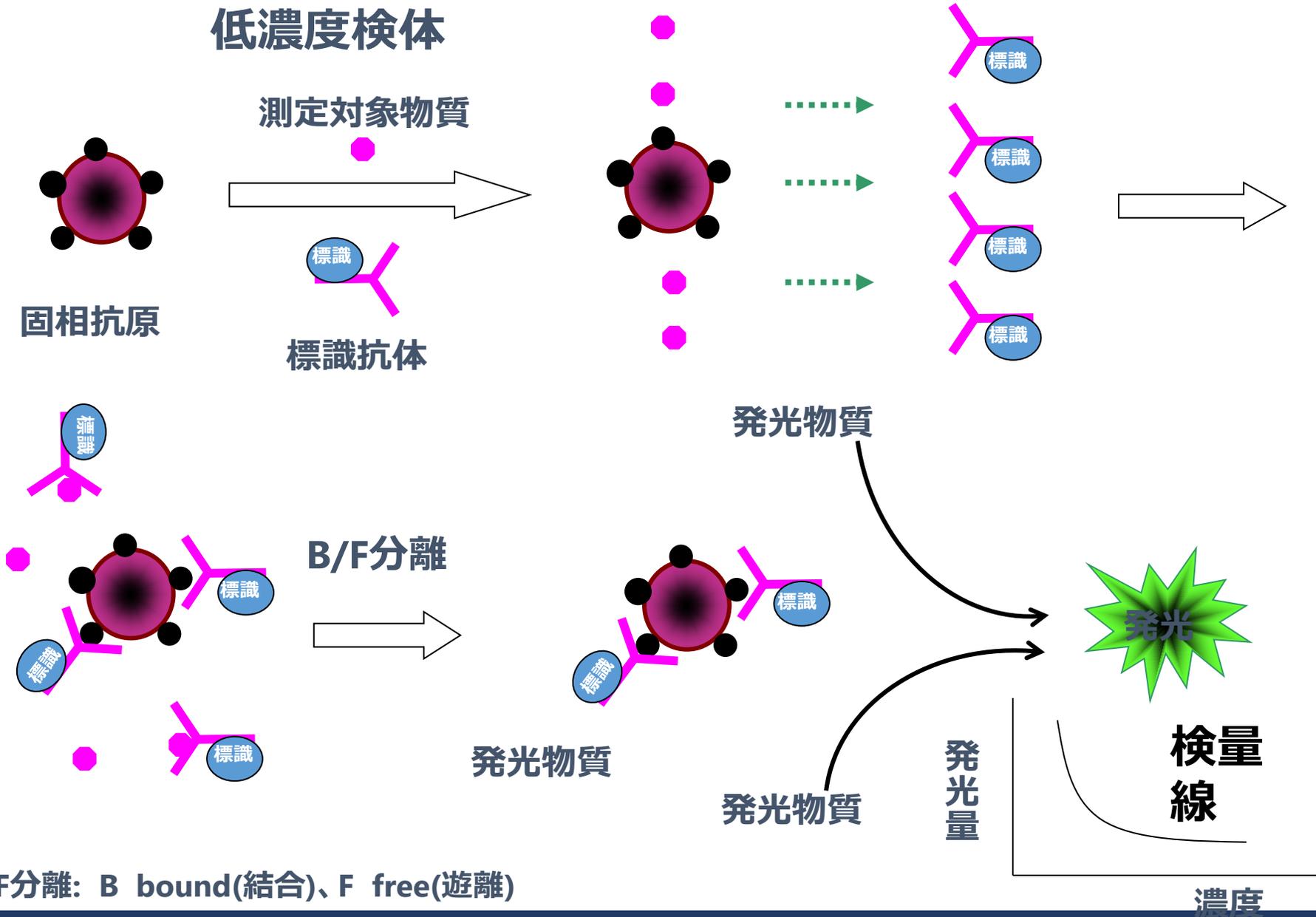
2ステップ法の測定原理 (抗原検出サンドイッチ法)



B/F分離: B bound(結合)、F free(遊離)

1ステップ法の測定原理 (抗原検出 競合法)

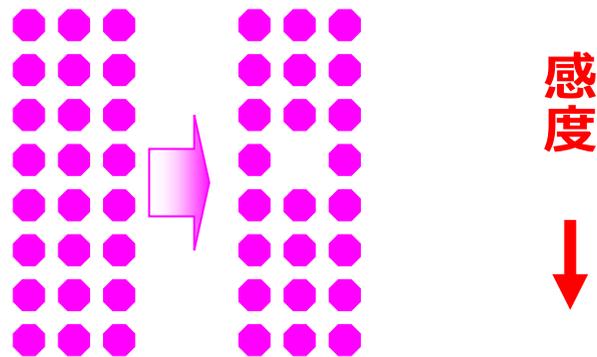
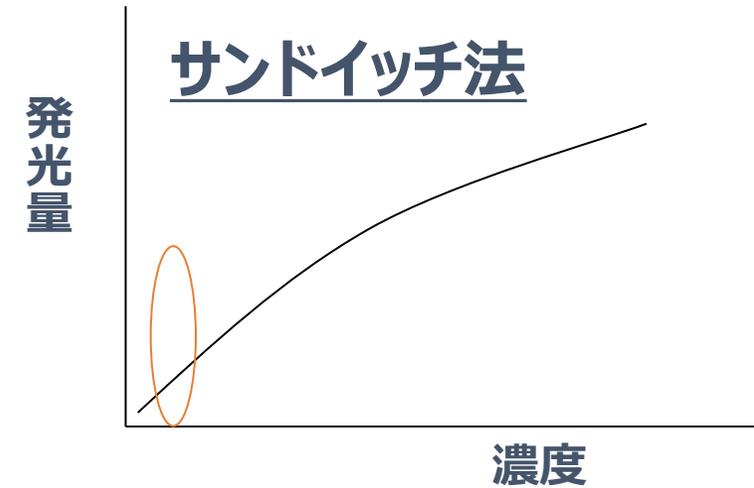
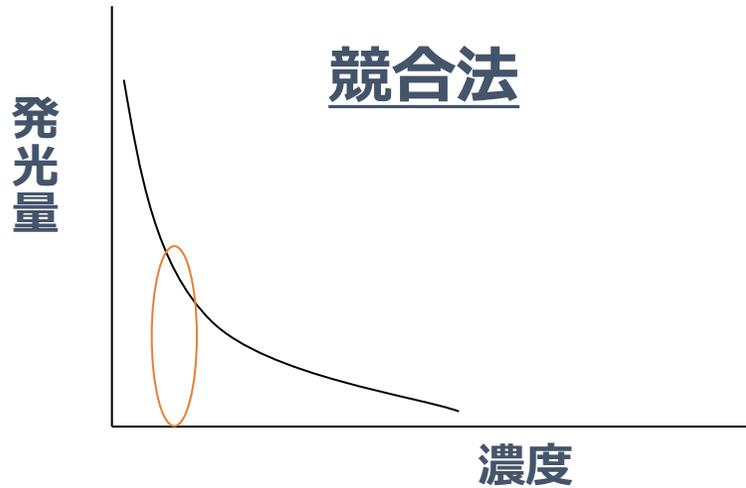
抗原測定



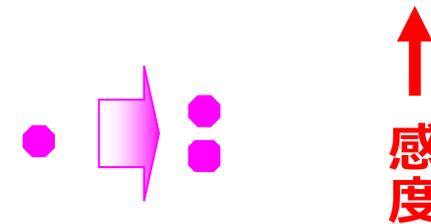
競合法デメリット

◆ 競合法

デメリット: 右下がり検量になるため、サンドイッチ法に対し高感度し難い



多くの測定対象物から1個減っても認識しづらい



1個の測定対象物が2個に増えたら認識し易い

サンドイッチ法・競合法特長

◆1ステップ サンドイッチ法

- ・ 2ステップ法に対し、抗原抗体反応時間を長く設定できるため、高感度し易い
- ・ 測定対象物(抗原または抗体)が大過剰になると、ハイドーズフック(プロゾーン)現象が発生する場合がある

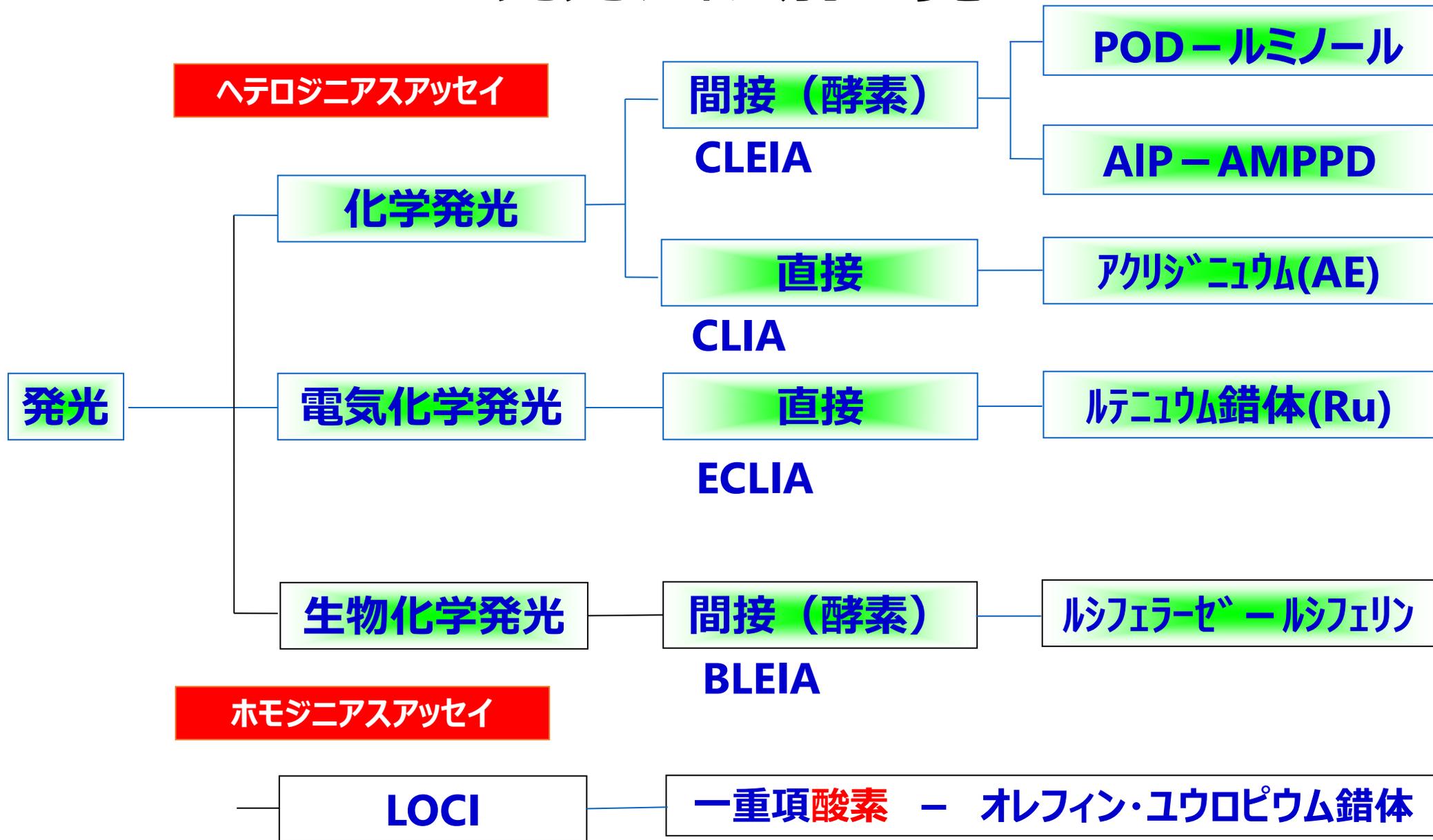
◆2ステップ サンドイッチ法

- ・ 測定対象物(抗原または抗体)が大過剰になっても、B/F分離を2回行うためハイドーズフック(プロゾーン)現象が発生しない
- ・ 1ステップ法に対し、抗原抗体反応時間を長く設定できないため、高感度し難い

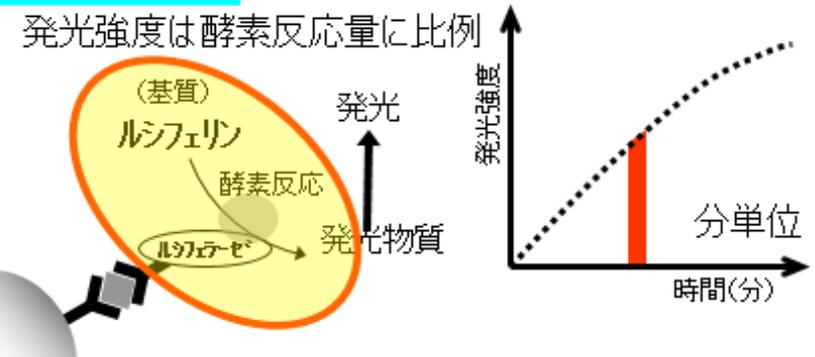
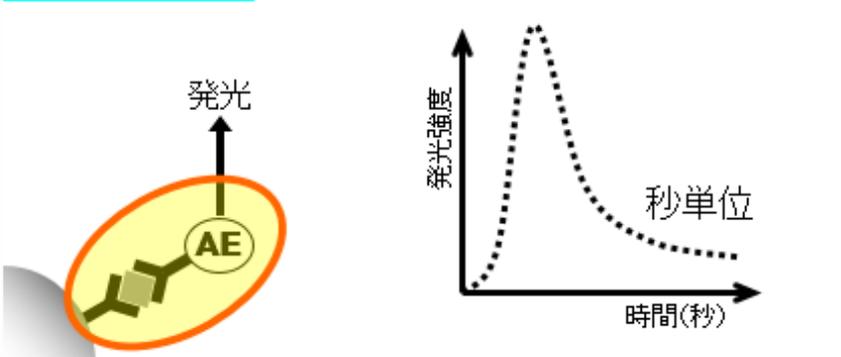
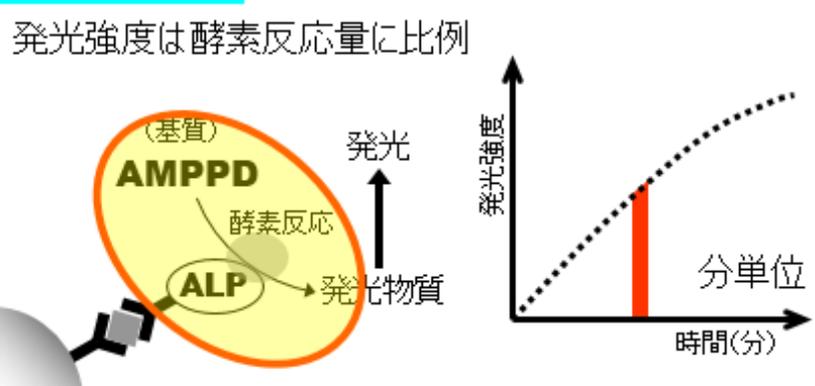
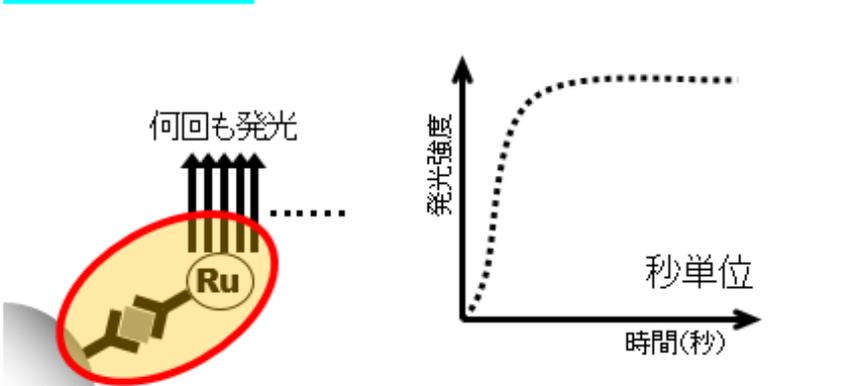
◆競合法

- ・ 右下がり検量になるため、サンドイッチ法に対し高感度し難い

発光タイプ別一覧



発光法の発光パターン

間接測定	直接測定
測定対象を間接的に反映	測定対象を直接に反映
<p>BLEIA</p> <p>発光強度は酵素反応量に比例</p>  <p>(基質) ルシフェリン</p> <p>酵素反応</p> <p>ルシフェラーゼ</p> <p>発光物質</p> <p>発光</p> <p>発光強度</p> <p>時間(分)</p> <p>分単位</p>	<p>CLIA</p>  <p>発光</p> <p>発光強度</p> <p>時間(秒)</p> <p>秒単位</p>
<p>CLEIA</p> <p>発光強度は酵素反応量に比例</p>  <p>(基質) AMPPD</p> <p>酵素反応</p> <p>ALP</p> <p>発光物質</p> <p>発光</p> <p>発光強度</p> <p>時間(分)</p> <p>分単位</p>	<p>ECLIA</p>  <p>何回も発光</p> <p>発光強度</p> <p>時間(秒)</p> <p>秒単位</p>

発光法が高感度の理由

- 通常用いられている比色法の分析機にはエネルギーとして光源が必要であり、目的吸収波長を選びますのでフィルターを要する
 - 比色法では、特定の光を物質にあてて物質が吸収しなかった光をシグナルとして機械で読むが、この目的波長以外の波長の光による影響（迷光）や、溶媒中から新たに発生する光（ラマン光）の影響を受けたり、また、光源の変動によるノイズがあり、検出器の感度を上昇させると、シグナルレベルとともにこれらのバックグラウンドやノイズも同時に上げてしまうことになる
 - 蛍光法も比色法と同様、光源が必要であるため、それに由来する迷光、ラマン光、ノイズレベルの問題がある
 - 発光法は光源を必要とせず、化学反応により生じた発光をどれだけフォトカウンターでカウントできるかであり、光源に由来する迷光、ラマン光、ノイズレベルはない
- 厳密には化学発光の場合もシグナル以外の光（ノイズ）はあるが、比色や蛍光法に比べると非常に小さく、検出器の感度を上げることができ、微弱な発光シグナルも検出することが可能

Agenda

- ◆ 抗原抗体反応
- ◆ 免疫検査の歴史と種類および原理
- ◆ 免疫血清検査の自動化
- ◆ 免疫血清検査のピットフォール
- ◆ 免疫血清検査の精度管理



様々な全自動免疫測定装置



東北医科薬科大学病院 検査部の装置

- Cobas 8000 (c702 + c502 + e801) × 2式
- Cobas 6000(c501 + e601) × 1式
- ルミパルス L2400 × 2式
- ルミパルス G1200 × 1式
- HISCL 800 × 1式
- AIA-CL1200 × 1式



分析に必要な試薬・消耗品 (例：富士レビオ ルミパルスL2400：ボトルタイプ)

☑ 分析に必要な試薬消耗品

専用試薬	共通試薬			
 <p>酵素標識抗体</p> <p>抗原(抗体)結合粒子</p> <p>ボトルタイプの試薬</p>	 <p>基質液</p>	 <p>検体希釈液</p>	 <p>B/F洗浄液</p>	<p>専用純水装置により 自動調整・供給</p>  <p>プローブ用 洗剤</p>
消耗品・その他		 <p>精度管理コントロール</p> <p>標準液</p>		

ディスポーザブルチップ方式

検体間コンタミネーションの懸念

感染症項目の高感度化が進むなか、
多くの免疫装置メーカーが「ディスポーザブルチップ対応」に移行している

検体間コンタミネーションによる
「誤報告」が患者治療・検査室信頼度に与える影響は多大



ディスポーザブルチップ方式のメリット

1. 検体間コンタミネーションを回避
2. 検体吸引ノズルの清掃の必要がないため、毎日のメンテナンスが簡便
3. 検体吸引ノズルの定期交換が発生しないため、管理費用が低減

LUMIPULSE は**ディスポーザブルチップ**でのサンプリング方式を採用

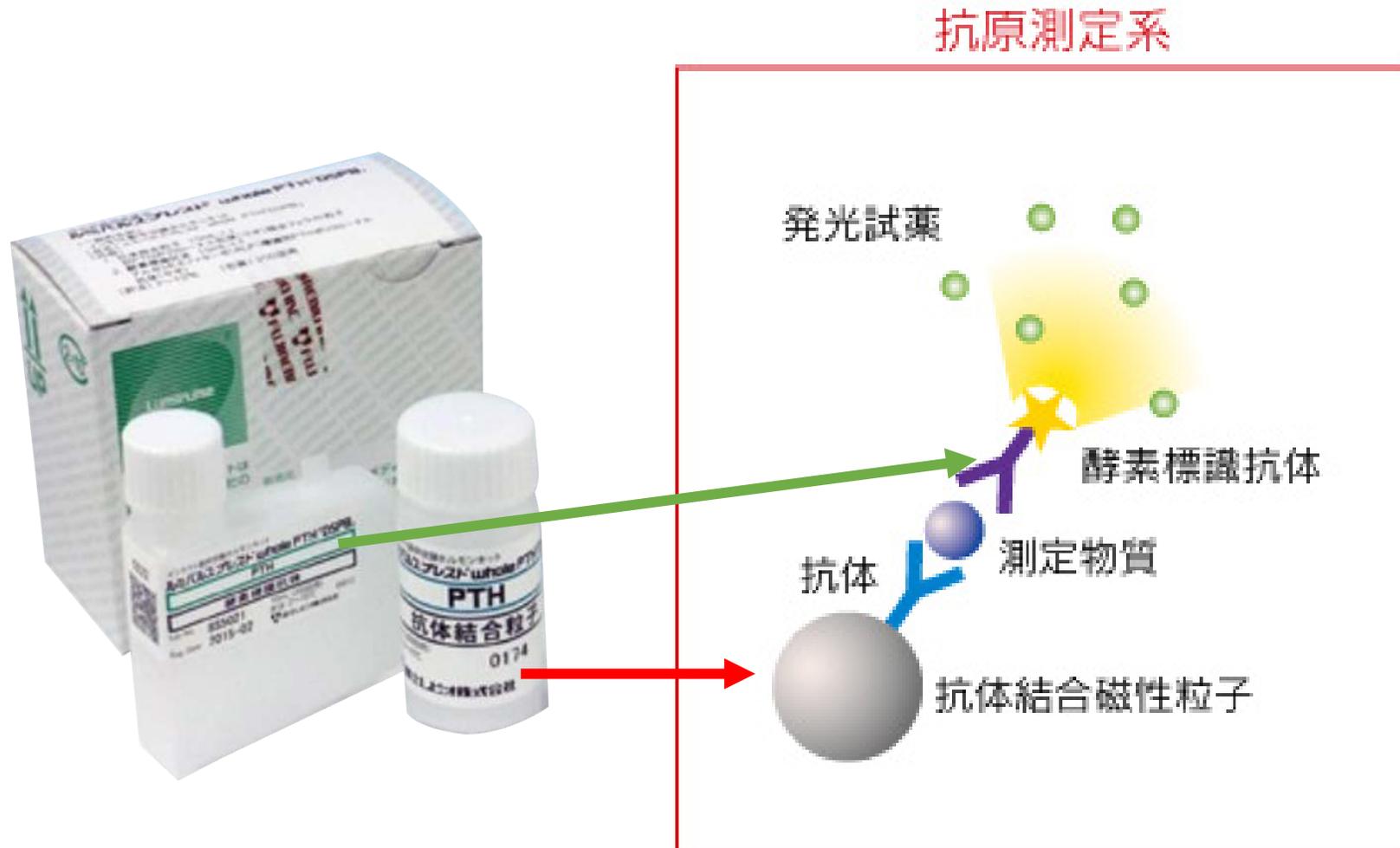
検体間コンタミネーションを回避

分析に必要な試薬・消耗品 (例：富士レビオ ルミパルスL2400：ボトルタイプ)

☑ 分析に必要な試薬消耗品

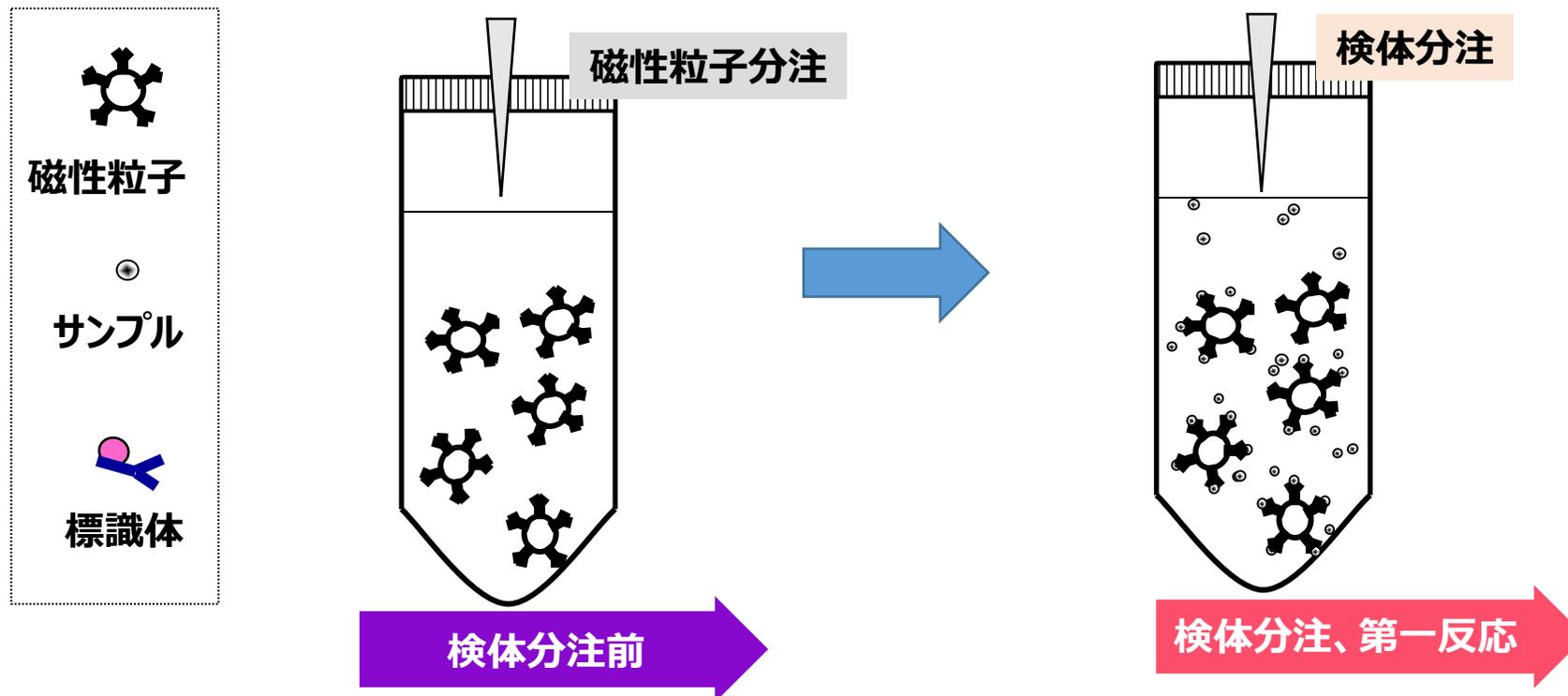
専用試薬	共通試薬			
 <p>酵素標識抗体</p> <p>抗原(抗体)結合粒子</p> <p>ボトルタイプの試薬</p>	 <p>基質液</p>	 <p>検体希釈液</p>	 <p>B/F洗浄液</p>	 <p>専用純水装置により 自動調整・供給</p> <p>プローブ用洗剤</p>
消耗品・その他				
 <p>キュベット</p>	 <p>サンプリングチップ</p>	 <p>精度管理コントロール</p>	 <p>標準液</p>	

専用試薬



測定原理 (2Stepサンドイッチ法)

測定パターン	分注動作	前処理反応	分注動作		第1 攪拌	1次免疫反応	第1 洗浄	試薬分注動作	第2 攪拌	2次免疫反応	第2 洗浄	基質分注	第3 攪拌	酵素反応	発光測定
			Cycle1	Cycle2											
	希釈 TT		分注・前処理・第1免疫						第2免疫・BF1/2・酵素 TT						検出器
2ステップ法	-	-	磁性粒子液分注	検体分注		8分		標識体液分注		8分				4分	



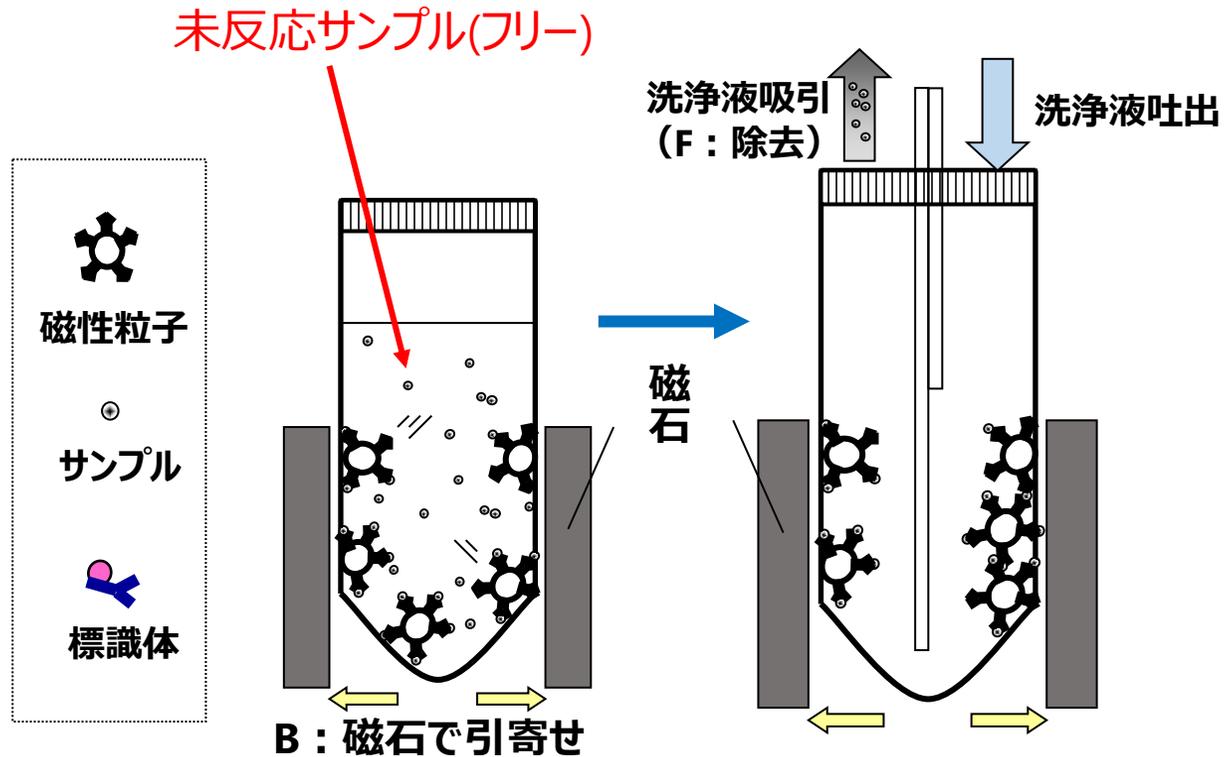
分析に必要な試薬・消耗品 (例：富士レビオ ルミパルスL2400：ボトルタイプ)

☑ 分析に必要な試薬消耗品

専用試薬	共通試薬	専用純水装置により 自動調整・供給
 <p>酵素標識抗体</p> <p>抗原(抗体)結合粒子</p> <p>ボトルタイプの試薬</p>	 <p>基質液</p> <p>検体希釈液</p>	 <p>B/F洗浄液</p> <p>プローブ用洗剤</p>
<h3>消耗品・その他</h3>  <p>キュベット</p> <p>サンプリングチップ</p> <p>精度管理コントロール</p> <p>標準液</p>		

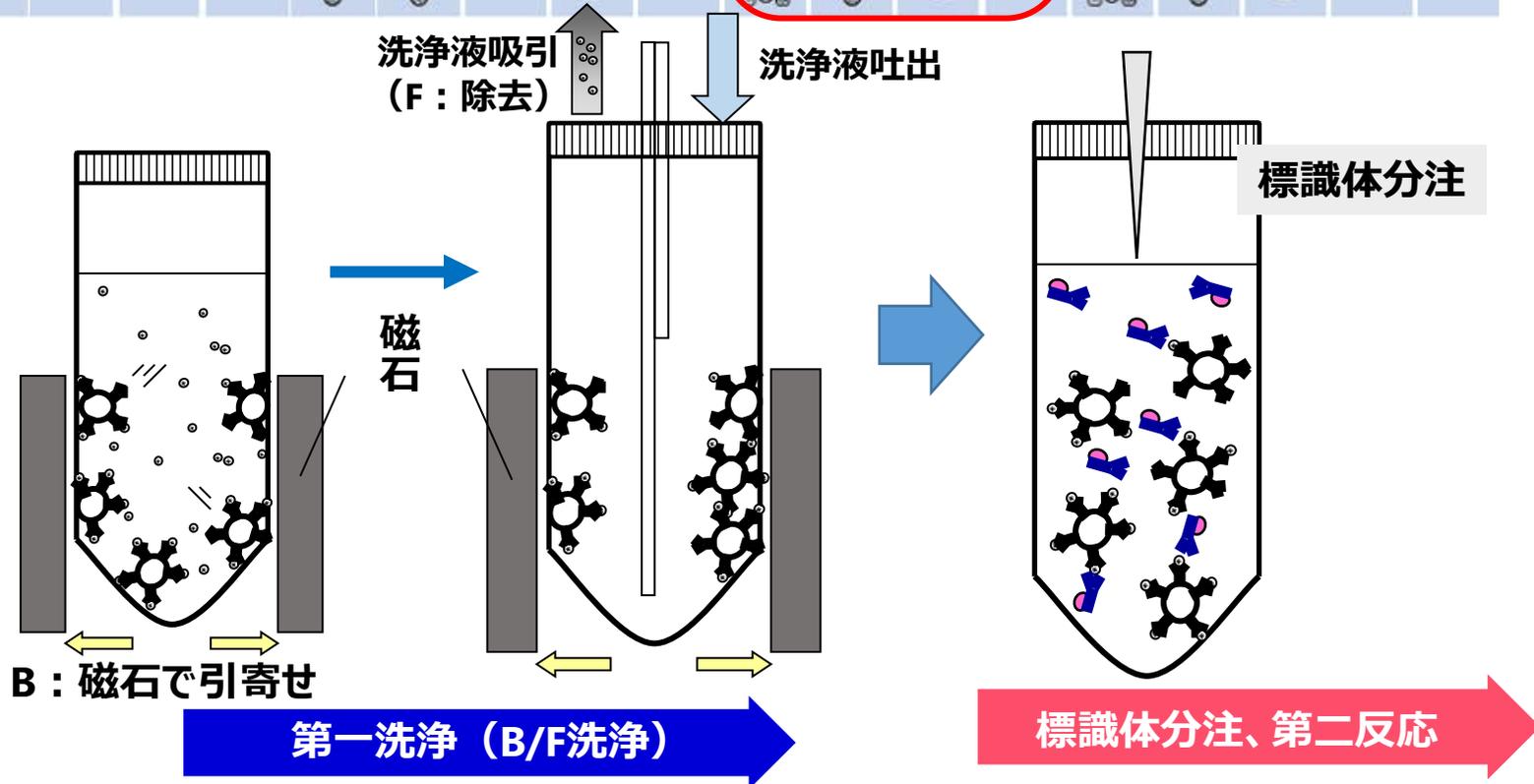
B/F分離

抗原抗体反応の結果、抗原・抗体の結合型(Bound)と、未反応のフリー(Free)が生じる。
このフリーを除くことをB/F分離という。



測定原理 (2Stepサンドイッチ法)

測定パターン	分注動作	前処理反応	分注動作		第1 攪拌	1次免疫反応	第1 洗浄	試薬分注動作	第2 攪拌	2次免疫反応	第2 洗浄	基質分注	第3 攪拌	酵素反応	発光測定
			Cycle1	Cycle2											
	希釈 TT		分注・前処理・第1免疫						第2免疫・B-F1/2・酵素 TT						検出器
2ステップ法			磁性粒子液分注	検体分注		8分		標識体液分注		8分				4分	



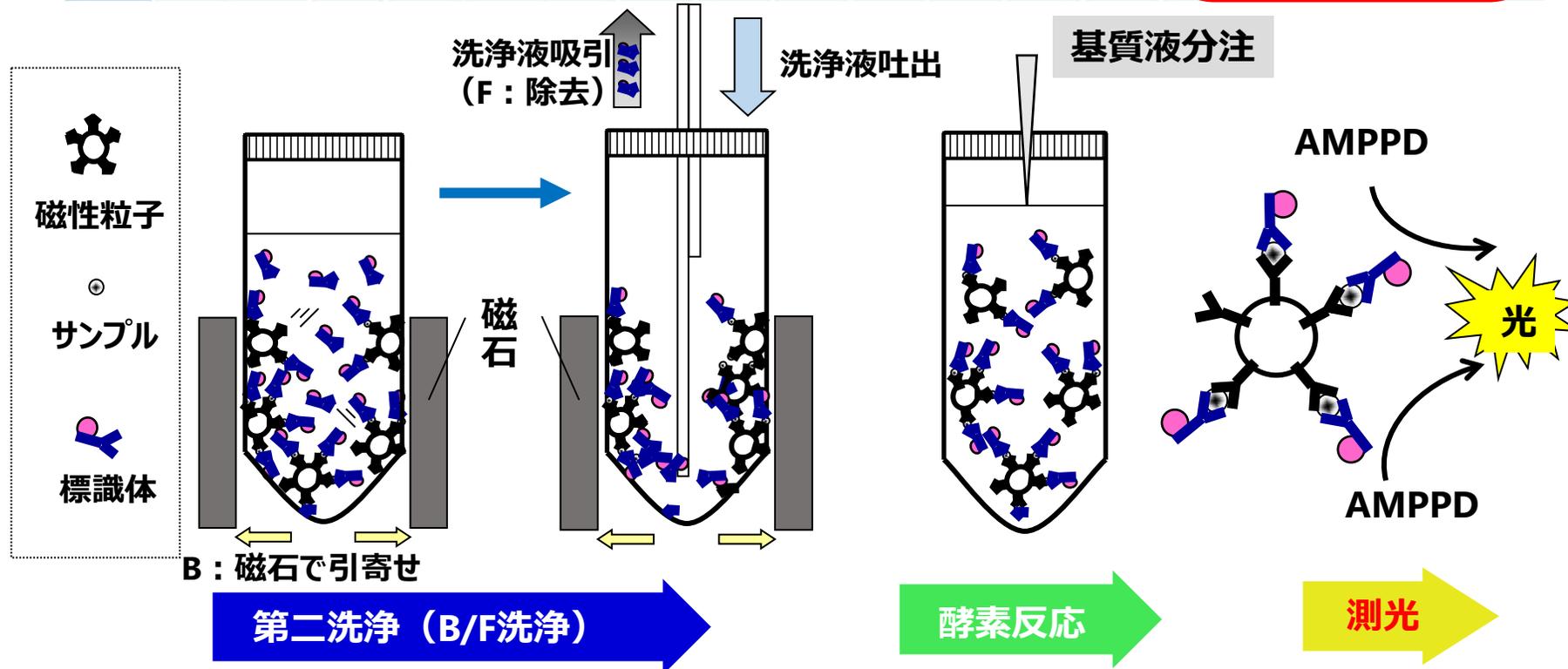
分析に必要な試薬・消耗品 (例：富士レビオ ルミパルスL2400：ボトルタイプ)

☑ 分析に必要な試薬消耗品

専用試薬	共通試薬			
 <p>酵素標識抗体</p> <p>抗原(抗体)結合粒子</p> <p>ボトルタイプの試薬</p>	 <p>基質液</p>	 <p>検体希釈液</p>	<p>専用純水装置により 自動調整・供給</p>  <p>B/F洗浄液</p>	 <p>プローブ用 洗剤</p>
消耗品・その他				
 <p>キュベット</p>	 <p>サンプリングチップ</p>	 <p>精度管理コントロール</p>	 <p>標準液</p>	

測定原理 (2Stepサンドイッチ法)

測定パターン	分注動作	前処理反応	分注動作		第1 攪拌	1次免疫反応	第1 洗浄	試薬分注動作	第2 攪拌	2次免疫反応	第2 洗浄	基質分注	第3 攪拌	酵素反応	発光測定
			Cycle1	Cycle2											
	希釈 TT		分注・前処理・第1免疫					第2免疫・B/F洗浄・酵素 TT							
2ステップ法			磁性粒子液分注	検体分注		8分		標識体液分注		8分				4分	



分析に必要な試薬・消耗品 (例：富士レビオ ルミパルスL2400：ボトルタイプ)

☑ 分析に必要な試薬消耗品

専用試薬	共通試薬			
 <p>酵素標識抗体</p> <p>抗原(抗体)結合粒子</p> <p>ボトルタイプの試薬</p>	 <p>基質液</p>	 <p>検体希釈液</p>	 <p>B/F洗浄液</p>	<p>専用純水装置により 自動調整・供給</p>  <p>プローブ用洗剤</p>
消耗品・その他		精度管理コントロール		標準液

標準液と検量線

標準液 = キャリブレーション(校正物質)

- 検量線を作成するための既知濃度の試料

検量線(標準曲線 : Calibration Curve/Standard Curve)

- 測定対象物質の濃度を求めるために検出したシグナル(=カウント値)に対して、あらかじめ濃度が判明している物質(標準品)のシグナルとの関係をグラフ化したもの。濃度を計算するための"ものさし"、"換算式"にあたる。
- これにより、測定対象物質の未知の濃度が計算により求められる。

キャリブレーション(校正)とは

- キャリブレーションで検量線を作成すること

サンドイッチ法 補正キャリブレーション

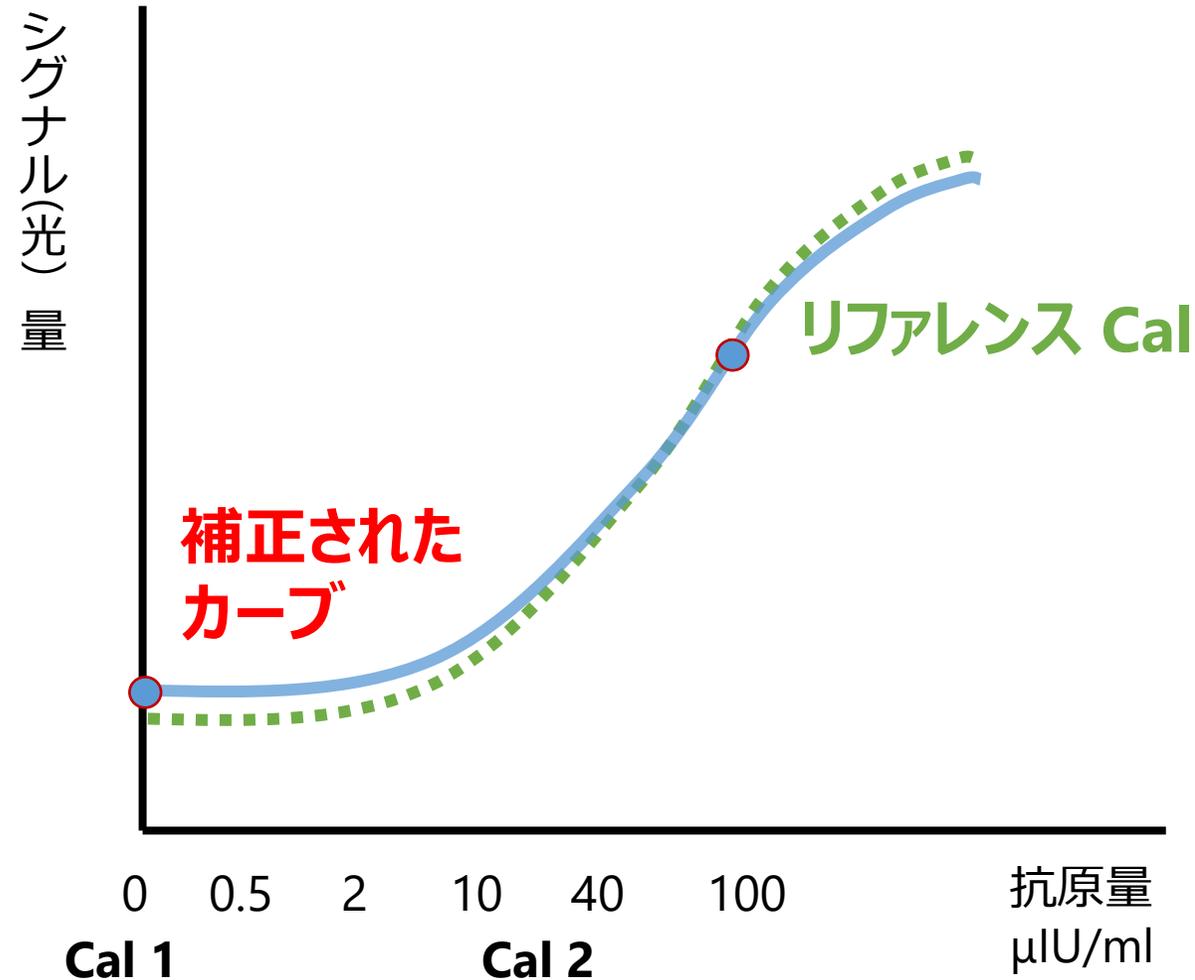
例：TSH

- 補正キャリブレーションではロットごとに記録されたカーブ（マスターカーブ）を2濃度のキャリブレータで補正

例

Cal	濃度	REF CAL	回帰曲線
A	0	209.0	322.7
B	0.5	44836.0	44039.3
C	2	169353.0	169566.3
D	10	742051.0	725164.9
E	40	1903701.0	1889026.6
F	100	2829482.0	2783713.0

	平均
Cal 1	322.5
Cal 2	1876945.5

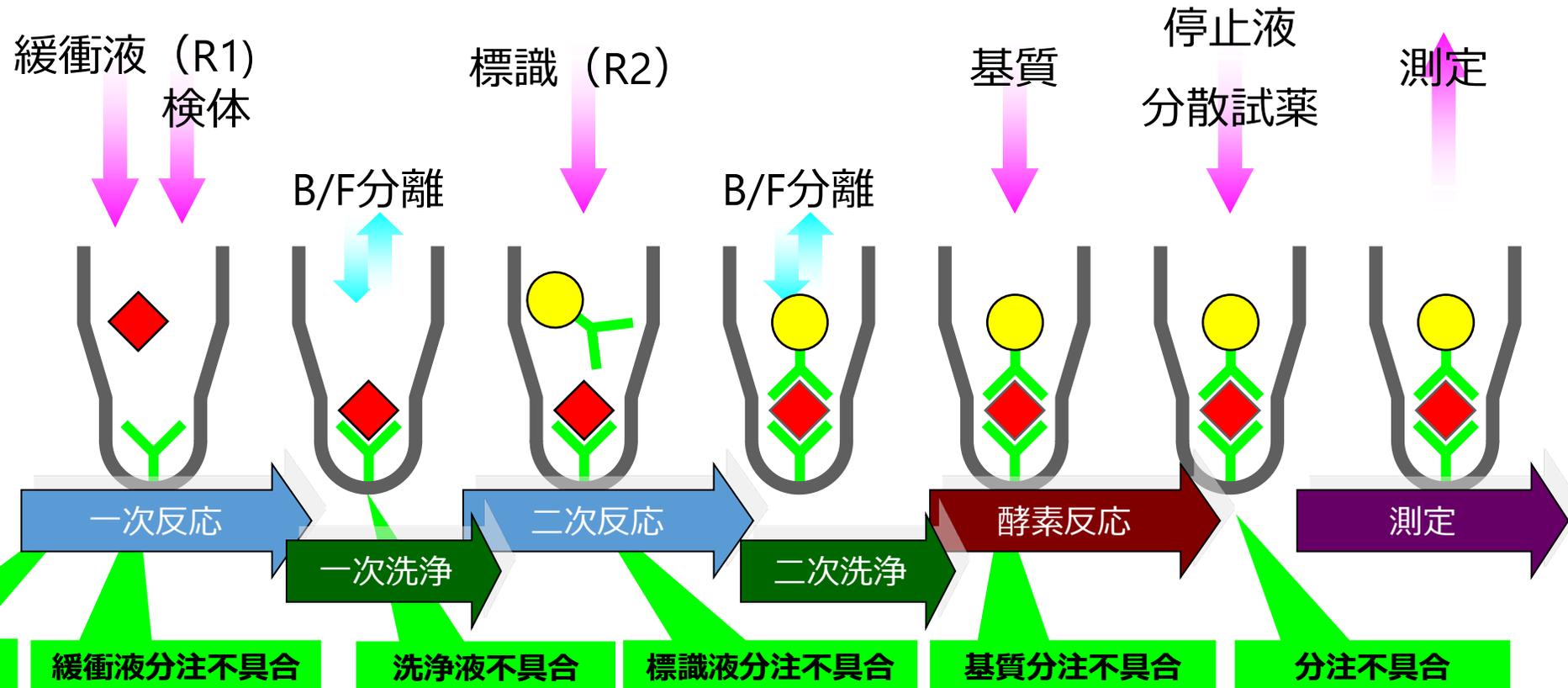


免疫学的検査法 自動化の課題

- ✓ 機器の機構や特徴の理解
- ✓ 機器の使用・メンテナンス方法の理解
- ✓ 各社試薬の測定値についての理解



測定原理 (2Stepサンドイッチ法)



ディスチップ不良 検体フィブリン生成 偽低値	試薬気泡発生 希釈が不十分となる 偽高値	洗浄液混和不十分 or濃度間違い (薄めに作製) 偽高値	試薬気泡発生 サンドイッチ複合体 が形成されない 偽低値	気泡混入 シグナルが得られず 偽低値	気泡混入 シグナルが得られず 偽低値
----------------------------------	--------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	------------------------------	------------------------------

問1.この検査結果をどう考えますか？

氏名：東北花子さん

性別：女性

年齢：28歳

診療科：産婦人科

現病歴：（第1子出産より2年後）第2子妊娠のため2016年6月に妊婦健診。

HBsAgが陽性となり、翌月に再検査したところ、陰性となった。

既往歴：2014年に第1子を出産（当時、輸血などは実施していない）

項目名	2016/7	2016/6	2014/2
HBs Ag定性	(-)	(+)	(-)
HBs Ag定量値	0.05未満	1.36	0.05未満
HCV Ab定性	(-)	(-)	(-)
HCV Ab定量値	1.0未満	1.0未満	1.0未満



どうして陽性に？分析機器の故障？？



問2.この検査結果をどう考えますか？

朝のルミパルスG1200の精度管理で、HCVAbとHBcAbのコントロールが低値域と高値域の両方が前日より高い。だけど、同じコントロールのHBsAbは変化なし。キャリブレーションとかはしていないし、試薬交換もしていない。もう一台のルミパルスで、同じコントロールを測定していつもと同じデータになった。コントロール試料の変性ではないと思うけど。おかしいな、昨日は希釈液の交換だけしているけど、何か関係あるのかな？

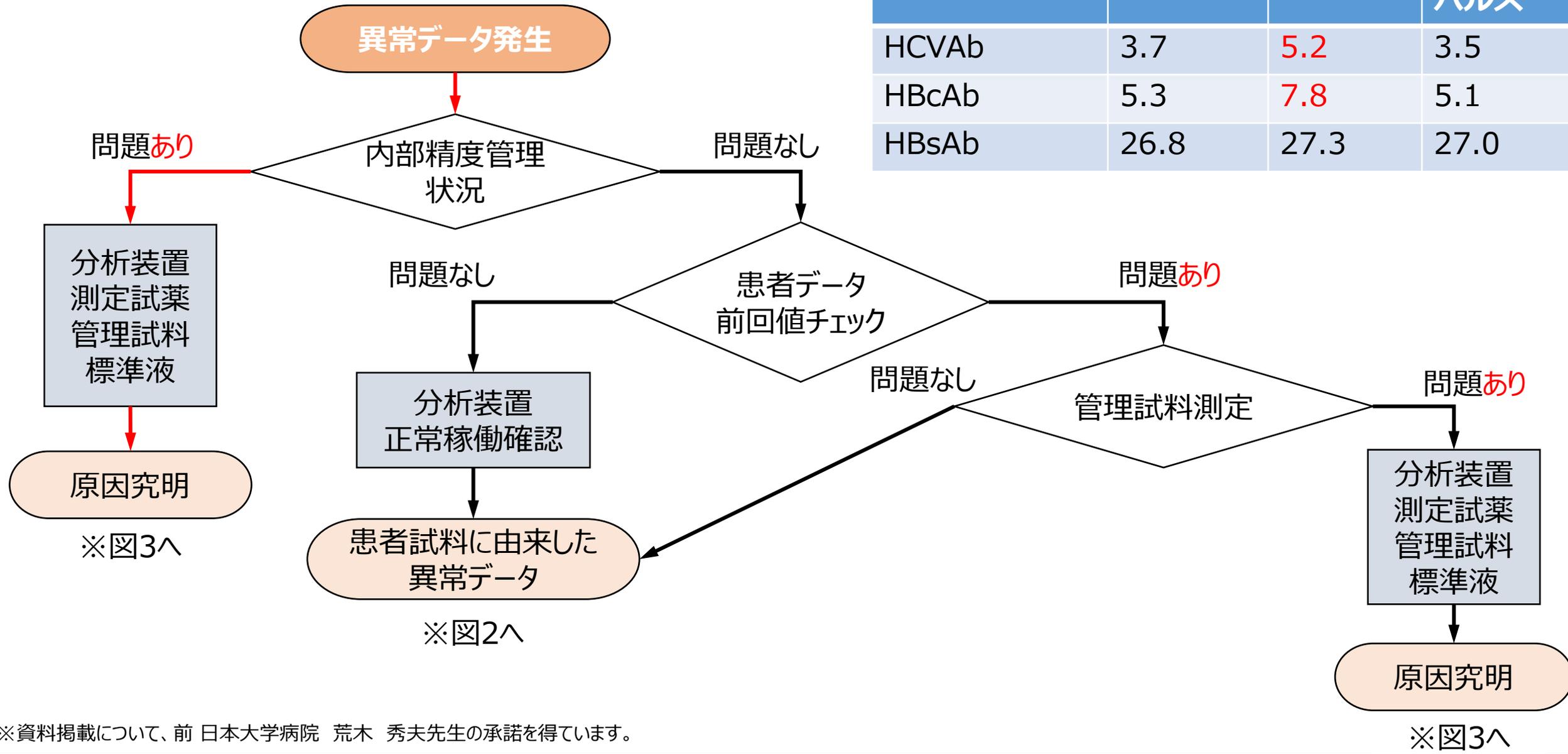
項目名	前日	本日	別のルミパルス
HCVAb	3.7	5.2	3.5
HBcAb	5.3	7.8	5.1
HBsAb	26.8	27.3	27.0



どうして2項目だけ？ 試薬の劣化？ ？ 分析装置の故障？ ？ ？



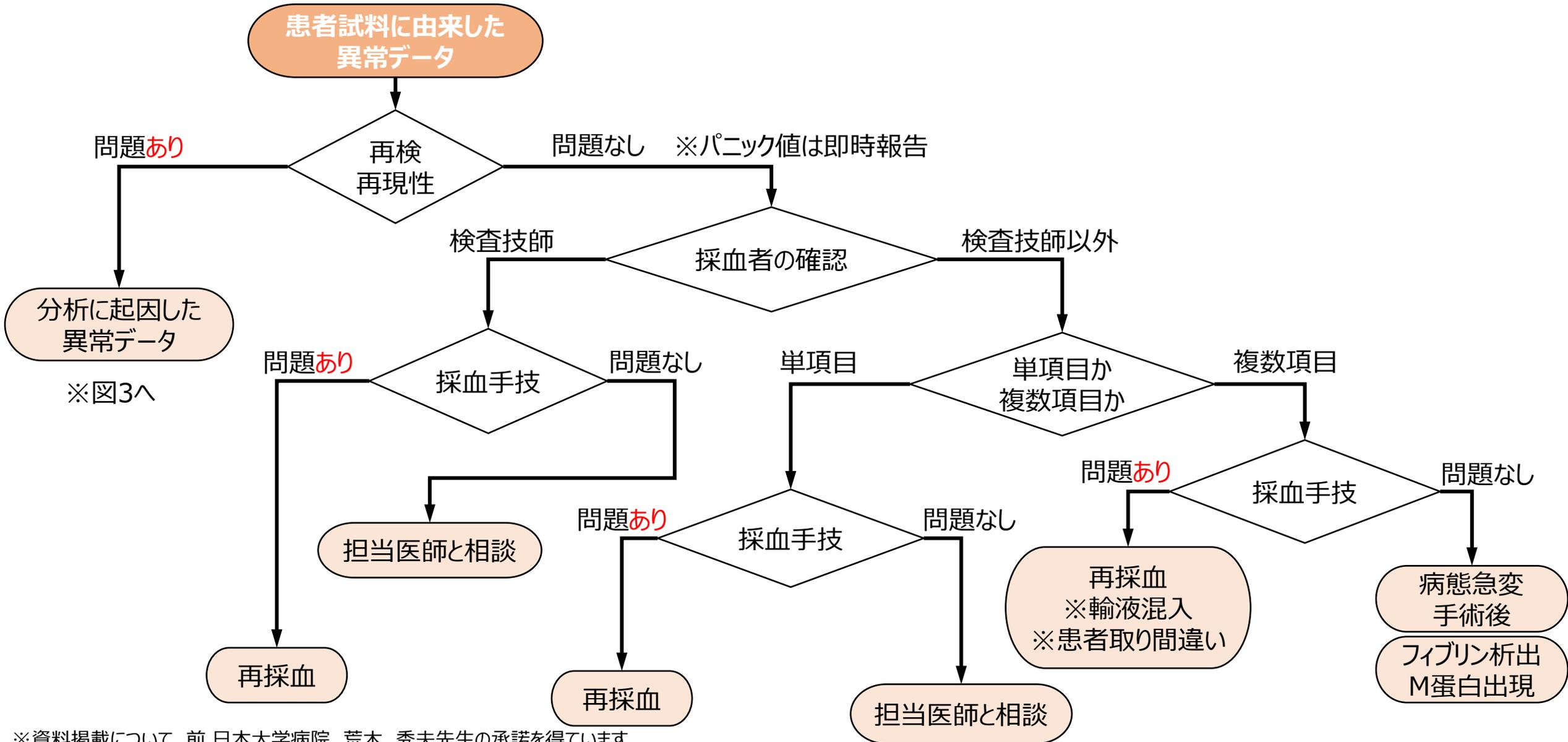
図1 異常データ発生時の確認の流れ



項目名	前日	本日	別のルミパルス
HCVAb	3.7	5.2	3.5
HBcAb	5.3	7.8	5.1
HBsAb	26.8	27.3	27.0

※資料掲載について、前 日本大学病院 荒木 秀夫先生の承諾を得ています。

図2 患者試料に由来する異常データ発生時の原因究明の流れ

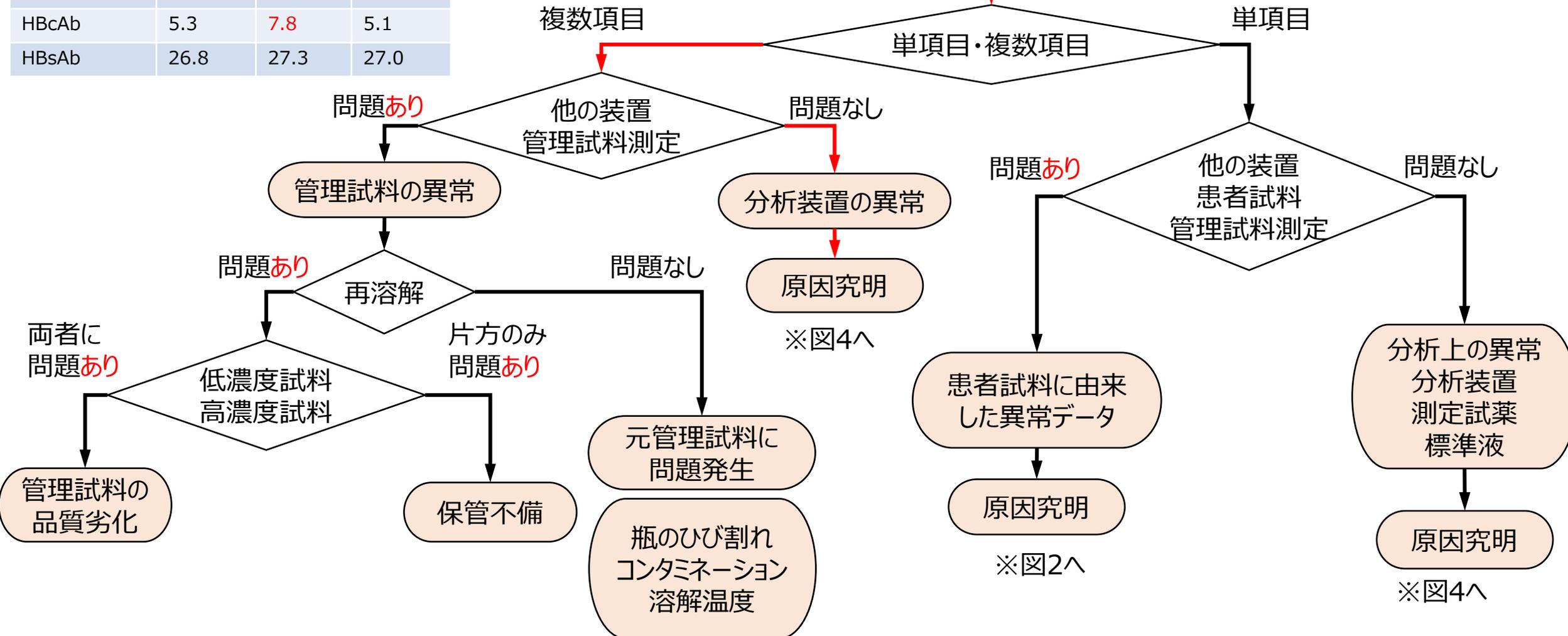


※資料掲載について、前 日本大学病院 荒木 秀夫先生の承諾を得ています。

図3 分析上の問題による異常データ発生時の原因究明の流れ

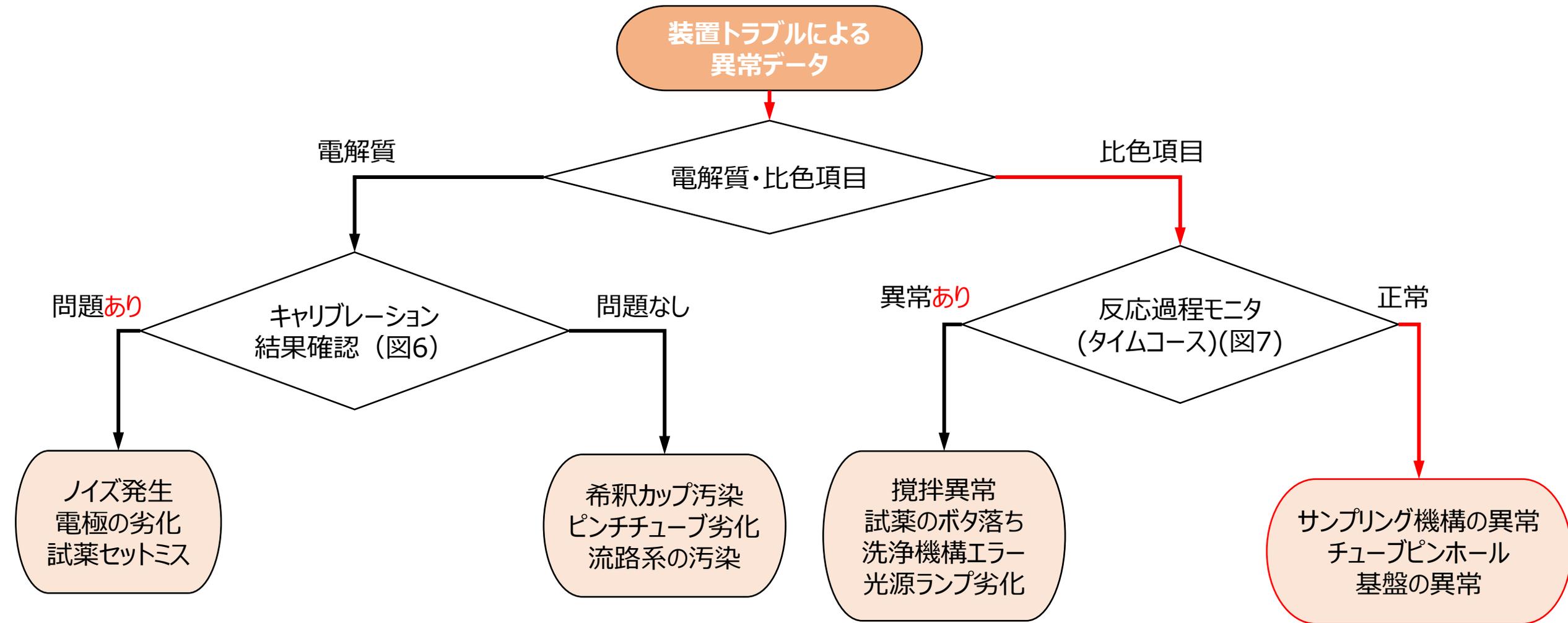
項目名	前日	本日	別のルミパルス
HCVAb	3.7	5.2	3.5
HBcAb	5.3	7.8	5.1
HBsAb	26.8	27.3	27.0

分析上の問題による異常データ



※資料掲載について、前 日本大学病院 荒木 秀夫先生の承諾を得ています。

図4 分析装置の問題による異常データ発生時の原因究明の流れ



参考) 日本臨床化学会ピットフォール研究専門委員会ピットフォール症例解析マニュアル 第1版 2023.3

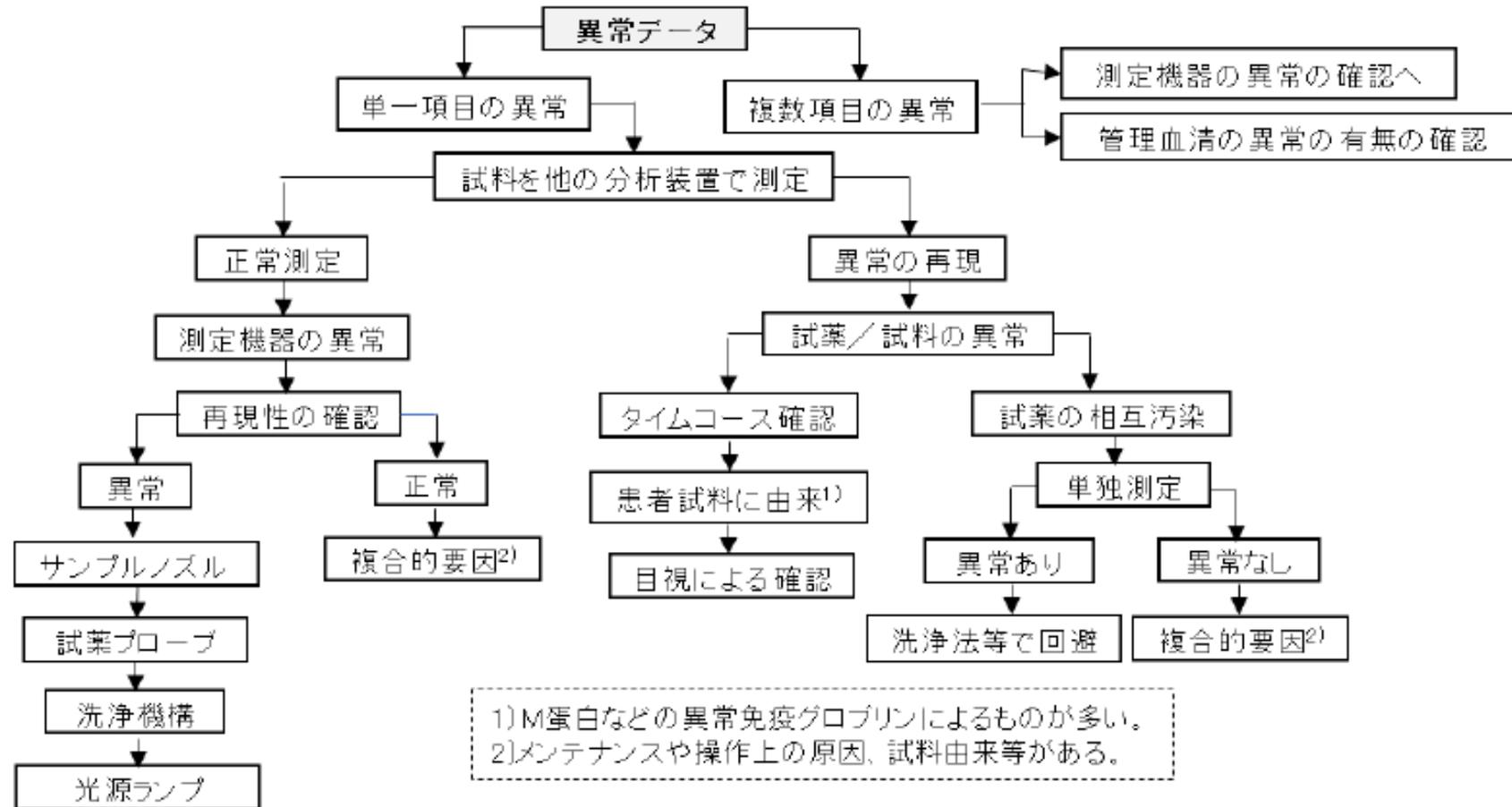


図1 自動分析装置異常データの解析フローチャート

問3.この検査結果をどう考えますか？

救急受診した80代の患者のBNP値が感度以下になった。
 でもこの患者は心不全とカルテに記載あるし、前回測定した時は212 pg/mLとなっているな。
 感染症は前回同様にすべて陰性だから変化なしか。
 この年齢で劇的に心不全が改善するの？
 試しにBNPのコントロールを測定したら、感度以下になった！
 「免疫反応ラインY軸モーターがスリップしました」というエラーは出ているけど、関係あるかな...

患者

項目名	前回 (1か月前)	本日
BNP(pg/mL)	212.0	0.6
HBsAg	<0.005 陰性	<0.005 陰性
HCVAb	<1.0 陰性	<1.0 陰性

QC

BNP (pg/mL)	前日	本日
L	35.8	0.1
H	178.8	0.2



BNP測定試薬がおかしいのか？ 感染症は問題ないから装置の故障じゃない？

問4.この検査結果をどう考えますか？

朝の免疫装置の精度管理で、腫瘍マーカーが全項目で低値域も高値域も前日より高い。キャリブレーションとかはしていないし、試薬交換もしていない。もう一台の装置では同じコントロールを測定していつもと同じデータになった。コントロール試料の変性ではないと思うけど。おかしいな、昨日は洗浄液の補充だけしているけど、何か関係あるのかな？ 洗浄液は少し水を多めに入れちゃったけど、そのくらいで変わらないと思ったけど……

QC : L

項目名	前日	本日	別の装置
CEA	4.37	6.74	4.28
CA19-9	14.8	20.6	16.2
CA125	28.9	37.2	29.8



腫瘍マーカー全項目だから装置の故障？



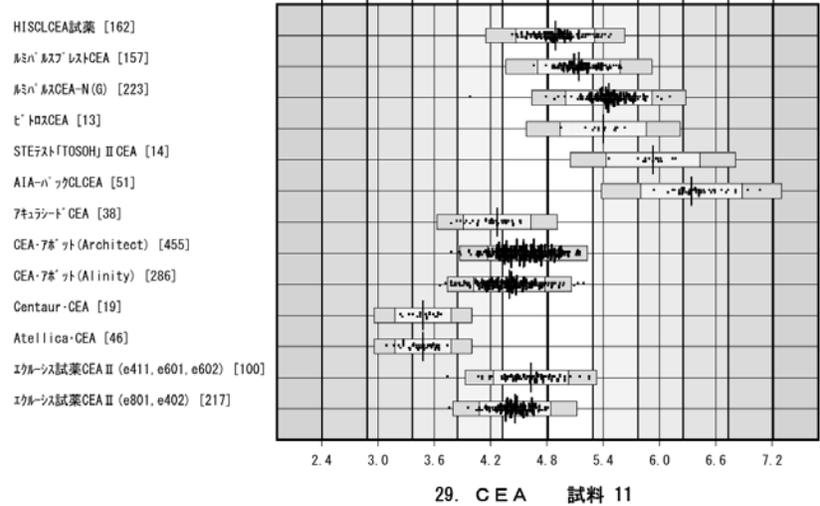
各社試薬の測定値についての理解

- 免疫血清項目は試薬中に含まれる抗体の種類、特異性、反応条件や測定原理の違いなどによって、測定キット間で違いが見られるため、検査値の解釈には注意を要する。
- 日本医師会精度管理調査の結果および当院での検討結果を提示
 - 報告書には「本調査のサンプルは実試料ではないため、実臨床に直接当てはめるべきではない」と記載あり。実患者のデータの傾向とは一部異なることも念頭に置くこと。

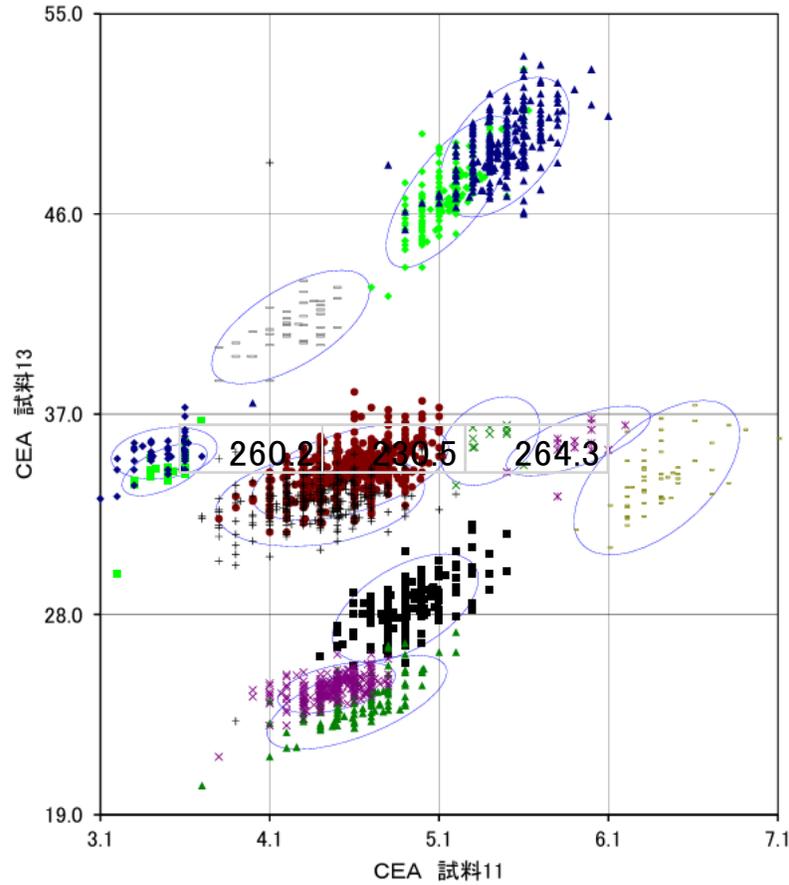
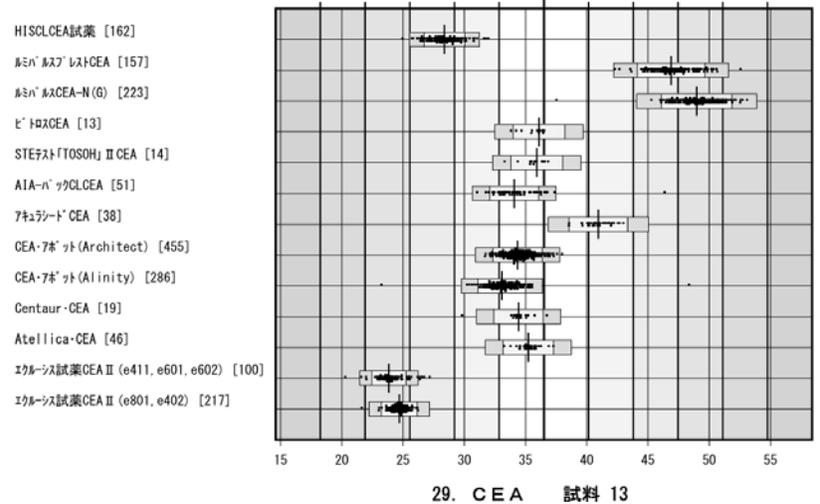
CEA

検査項目: 29. CEA

方法間CV= 11.95%(0.57) 方法内CV= 4.56%(0.22) 共通CV= 4.27%(4.75%) 評価用CV= 7.50%(コホセンCV) 総平均 4.809

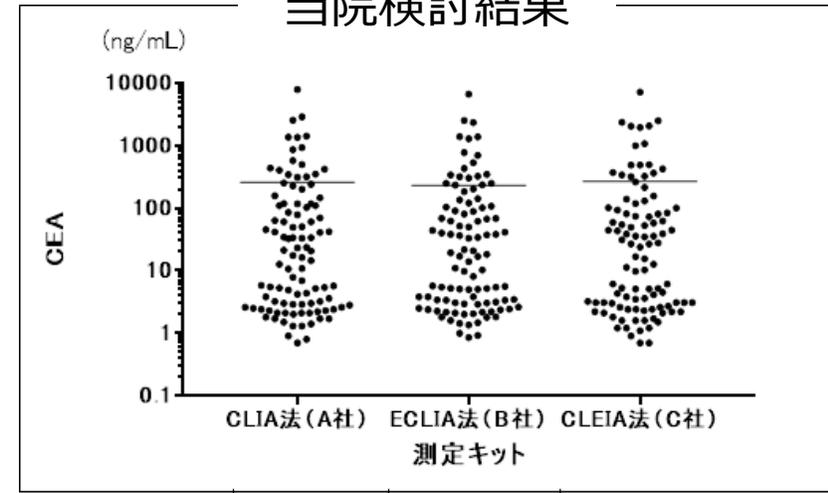


方法間CV= 23.38%(8.53) 方法内CV= 3.11%(1.09) 共通CV= 2.94%(2.95%) 評価用CV= 5.00%(コホセンCV) 総平均 36.499



- HISCLCEA試薬 [162]
- ルミハルスプレストCEA[157]
- ▲ ルミハルスCEA-N(G)[223]
- × ビトロスCEA[13]
- × STEテスト「TOSOH」II CEA[14]
- AIA-バックルCEA[51]
- アクセラードCEA[38]
- CEA・アボット(Architect)[455]
- CEA・アボット(Alinity)[286]
- Centaur・CEA[19]
- Atellica・CEA[46]
- ▲ エカルセンス試薬CEA II (e411,e601,e602)[100]
- × エカルセンス試薬CEA II (e801,e402)[217]

当院検討結果

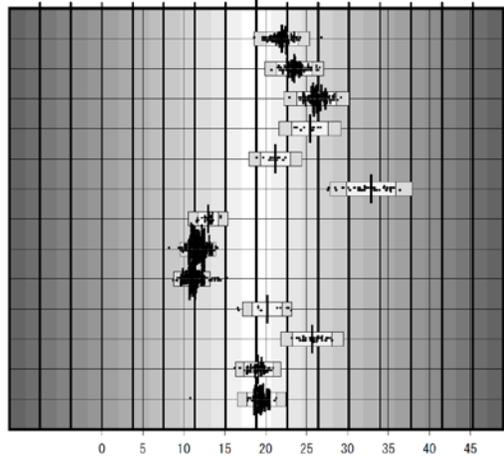


CEA(ng/mL)	CLIA (A)	ECLIA (B)	CLEIA (C)
mean	260.2	230.5	264.3

CA19-9

方法間CV= 36.01%(6.80) 方法内CV= 5.12%(0.92) 共通CV= 4.48%(6.94%) 評価用CV= 7.50%(コンセンサスCV) 総平均 18.874

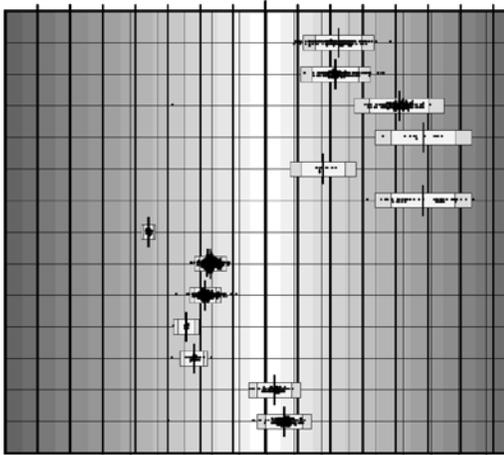
- HISCLCA19-9 II 試薬 [148]
- ルミバールテストCA19-9 [163]
- ルミバールCA19-9-N(G) [217]
- ビトロスCA19-9 [11]
- STEテスト「TOSOH」II (CA19-9) [13]
- AIA-ハックルCA19-9 [47]
- フェュラント CA19-9 [36]
- CA19-9XR-7キット(Architect) [433]
- CA19-9XR-7キット(Alinity) [280]
- Centaur-CA19-9 II [11]
- Atellica-CA19-9 [42]
- エクルーシ試薬CA19-9 II (e411,e601,e602) [95]
- エクルーシ試薬CA19-9 II (e801,e402) [216]



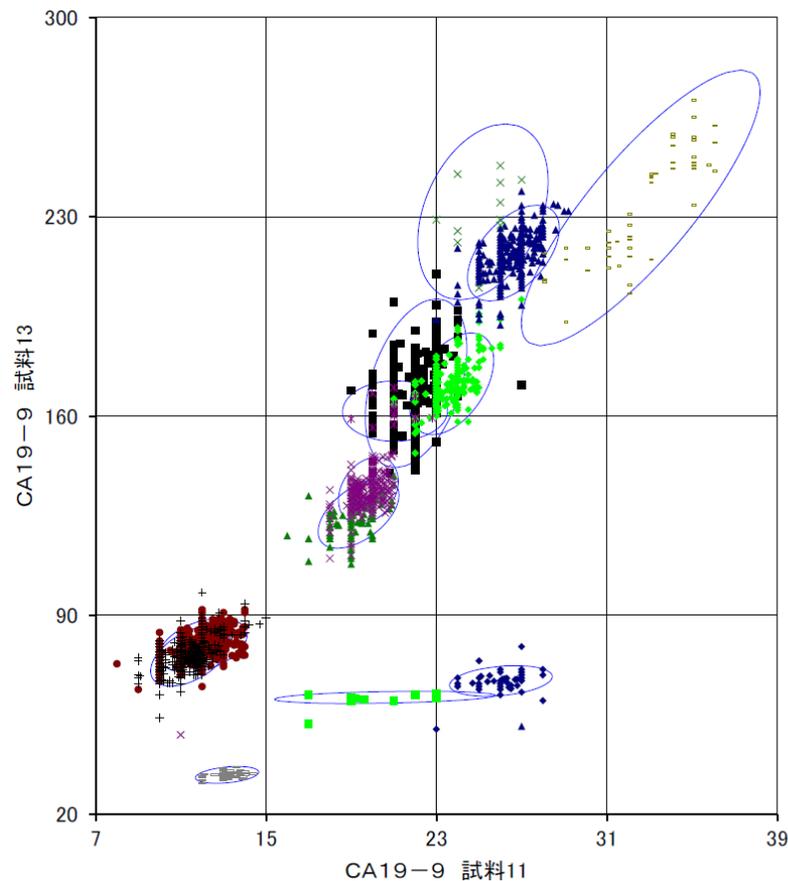
31. CA19-9 試料 11

方法間CV= 50.47%(59.98) 方法内CV= 5.90%(7.46) 共通CV= 5.02%(5.09%) 評価用CV= 7.50%(コンセンサスCV) 総平均 118.858

- HISCLCA19-9 II 試薬 [148]
- ルミバールテストCA19-9 [163]
- ルミバールCA19-9-N(G) [217]
- ビトロスCA19-9 [11]
- STEテスト「TOSOH」II (CA19-9) [13]
- AIA-ハックルCA19-9 [47]
- フェュラント CA19-9 [36]
- CA19-9XR-7キット(Architect) [433]
- CA19-9XR-7キット(Alinity) [280]
- Centaur-CA19-9 II [11]
- Atellica-CA19-9 [42]
- エクルーシ試薬CA19-9 II (e411,e601,e602) [95]
- エクルーシ試薬CA19-9 II (e801,e402) [216]

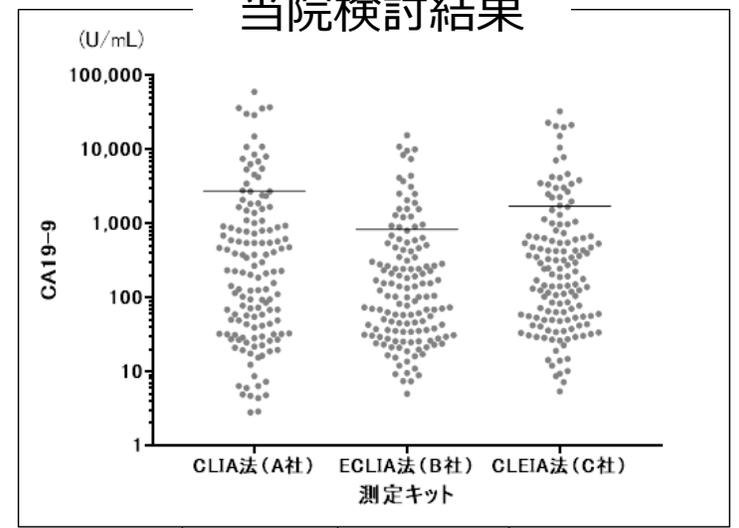


31. CA19-9 試料 13



- HISCLCA19-9 II 試薬[148]
- ルミバールテストCA19-9[163]
- ▲ ルミバールCA19-9-N(G)[217]
- × ビトロスCA19-9[11]
- * STEテスト「TOSOH」II (CA19-9)[13]
- AIA-ハックルCA19-9[47]
- フェュラント CA19-9[36]
- CA19-9XR-アボット(Architect)[433]
- + CA19-9XR-アボット(Alinity)[280]
- Centaur-CA19-9 II [11]
- ◆ Atellica-CA19-9[42]
- ▲ エクルーシ試薬CA19-9 II (e411,e601,e602)[95]
- × エクルーシ試薬CA19-9 II (e801,e402)[216]

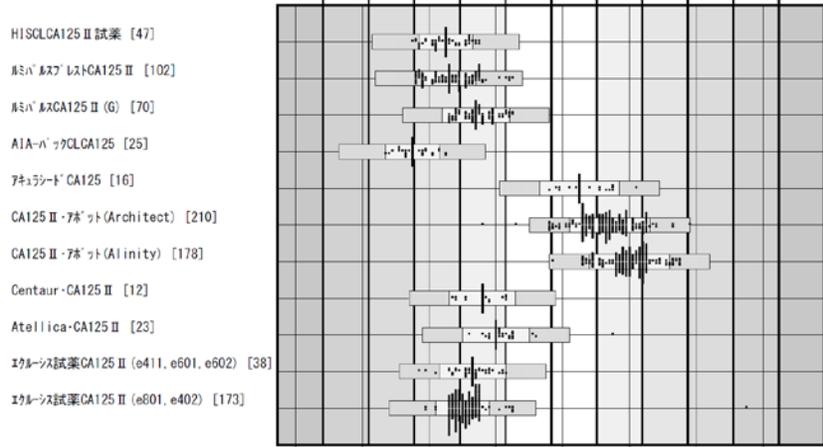
当院検討結果



19-9(U/mL)	CLIA (A)	ECLIA (B)	CLEIA (C)
mean	5173	1502	3462

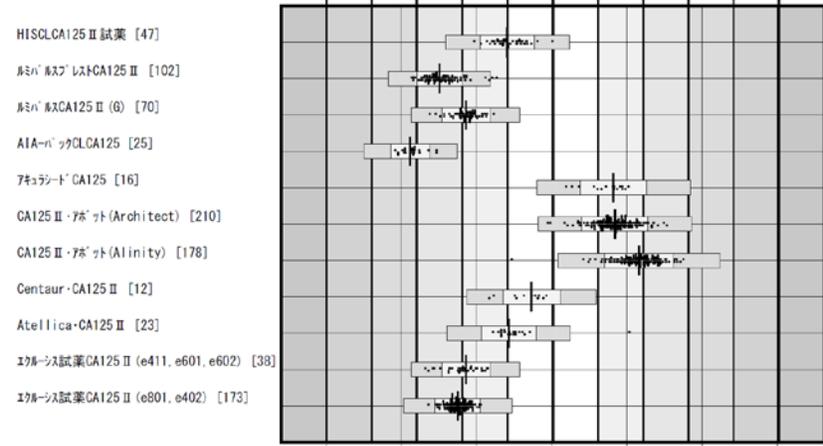
CA125

方法間CV= 18.60%(2.54) 方法内CV= 4.25%(0.55) 共通CV= 4.00%(8.34%) 評価用CV= 8.34%(補正共通CV) 総平均 13.653
 -60% -50% -40% -30% -20% -10% 0% 10% 20% 30% 40% 50% 60%



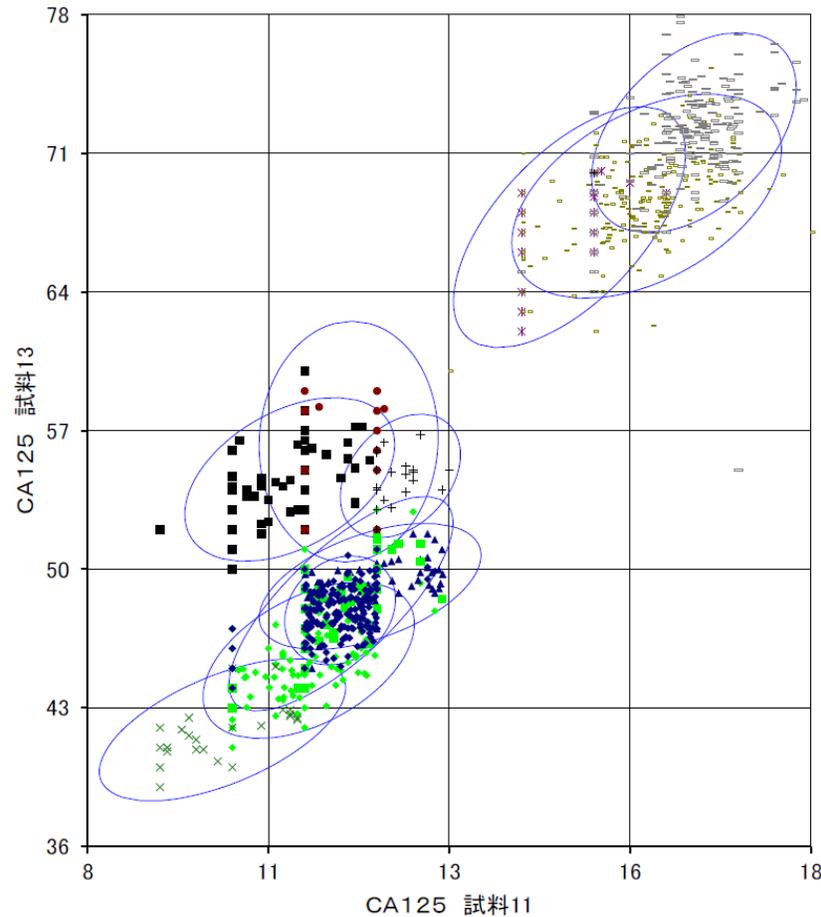
32. CA125 試料 11

方法間CV= 20.17%(12.13) 方法内CV= 3.39%(1.96) 共通CV= 3.26%(3.66%) 評価用CV= 7.50%(コンセンサスCV) 総平均 60.133
 -60% -50% -40% -30% -20% -10% 0% 10% 20% 30% 40% 50% 60%



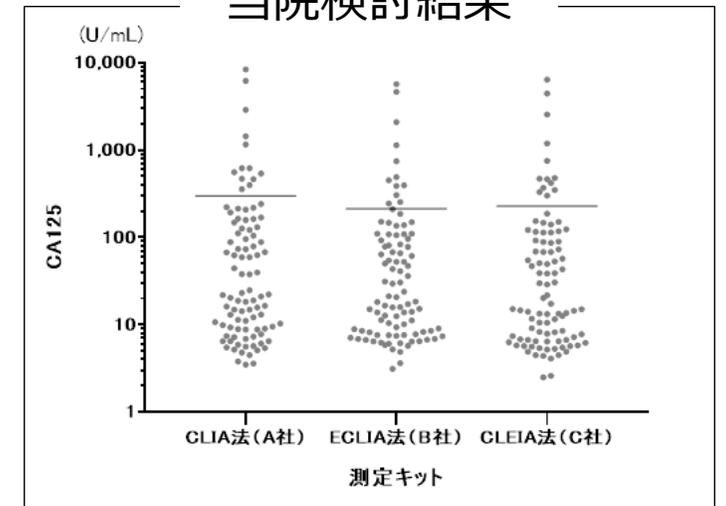
32. CA125 試料 13

検査項目: 32. CA125



- HISCLCA125 II 試薬[47]
- ◆ ルミパルスプレストCA125 II [102]
- ▲ ルミパルスCA125 II (G)[70]
- × AIA-ハックCLCA125[25]
- * アクアリードCA125[16]
- CA125 II・アボット(Architect)[210]
- CA125 II・アボット(Alinity)[178]
- Centaur・CA125 II [12]
- + Atellica・CA125 II [23]
- エクセルシス試薬CA125 II (e411,e601,e602)[38]
- ◆ エクセルシス試薬CA125 II (e801,e402)[173]

当院検討結果



CA125(U/mL)	CLIA (A)	ECLIA (B)	CLEIA (C)
mean	455	304	327

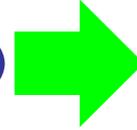
Agenda

- ◆ 抗原抗体反応
- ◆ 免疫検査の歴史と種類および原理
- ◆ 免疫血清検査の自動化
- ◆ 免疫血清検査のピットフォール
- ◆ 免疫血清検査の精度管理



イムノアッセイ異常反応 発見の糸口

凝集法（用手法）
イムノクロマト法



自動分析法

- ✓ 未感作血球（粒子）の凝集
- ✓ 異常な凝集像
- ✓ イムノクロマト法判定ラインの異常

- ✓ 低値陽性
- ✓ 希釈直線性の不良
- ✓ 再現性が得られない
- ✓ 年齢・性別からあり得ない結果

目視確認

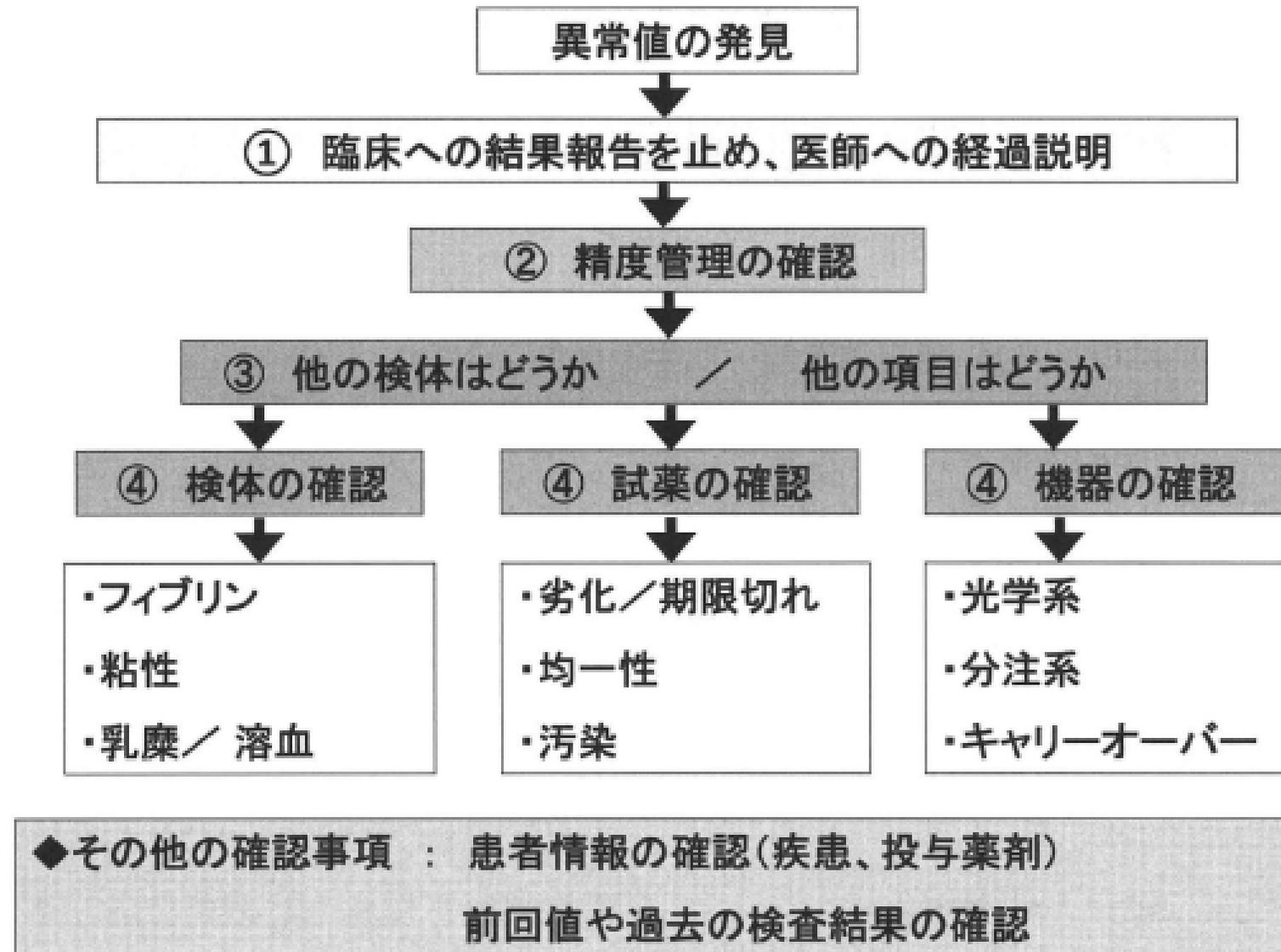


共通の糸口

- ✓ 前回値との不一致
- ✓ 他法・関連項目との乖離
- ✓ 臨床症状との不一致
- ✓ 試薬を検討評価するとき

目視不可
糸口難しい

イムノアッセイ異常反応 発見の糸口



問5.この検査結果をどう考えますか？

氏名：仙台太郎さん

性別：男性

年齢：80歳

診療科：消化器内科（下部消化管）

現病歴：他院にて大腸ポリープを指摘され、切除目的で当院紹介

既往歴：脂質異常症

項目名	2018/7	2014/5
HBs Ag定性	(+)	(-)
HBs Ag定量値	0.08	0.05未満
HCV Ab定性	(-)	(-)
HCV Ab定量値	1.0未満	1.0未満

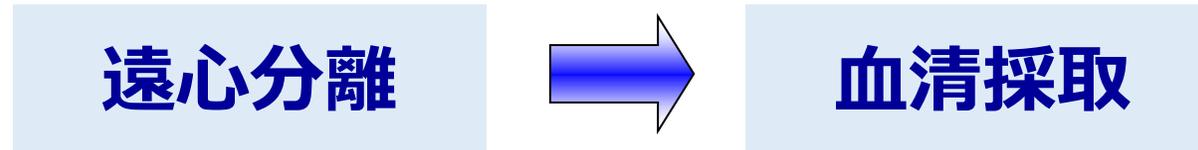


どうして陽性に？感染した？？
それともまたキャリアオーバー？？？



**採血は検査のはじまり！
特に“転倒混和”の影響が大きい！**

採血から血清採取までの操作手順



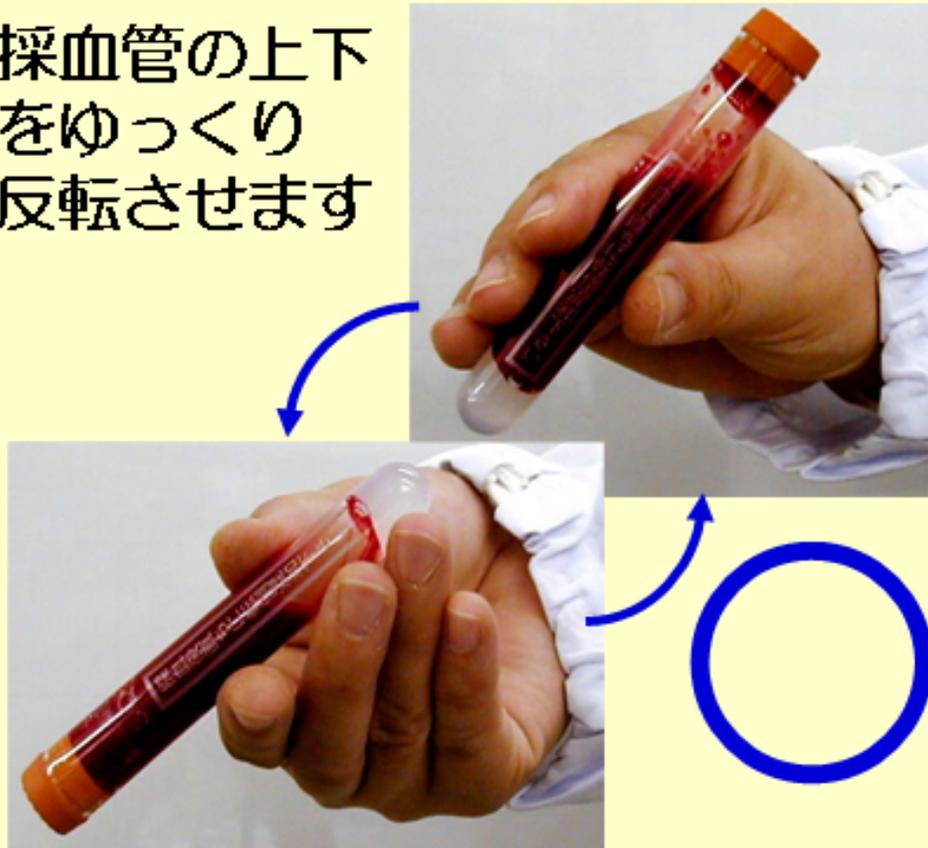
遠心推奨条件: 1500G~1700G ※ 10分 (室温温度 約25℃)

※ $1.12 \times \text{ローター半径(cm)} \times \text{回転数(rpm)}^2 \times 10^{-5}$

真空採血管の転倒混和方法

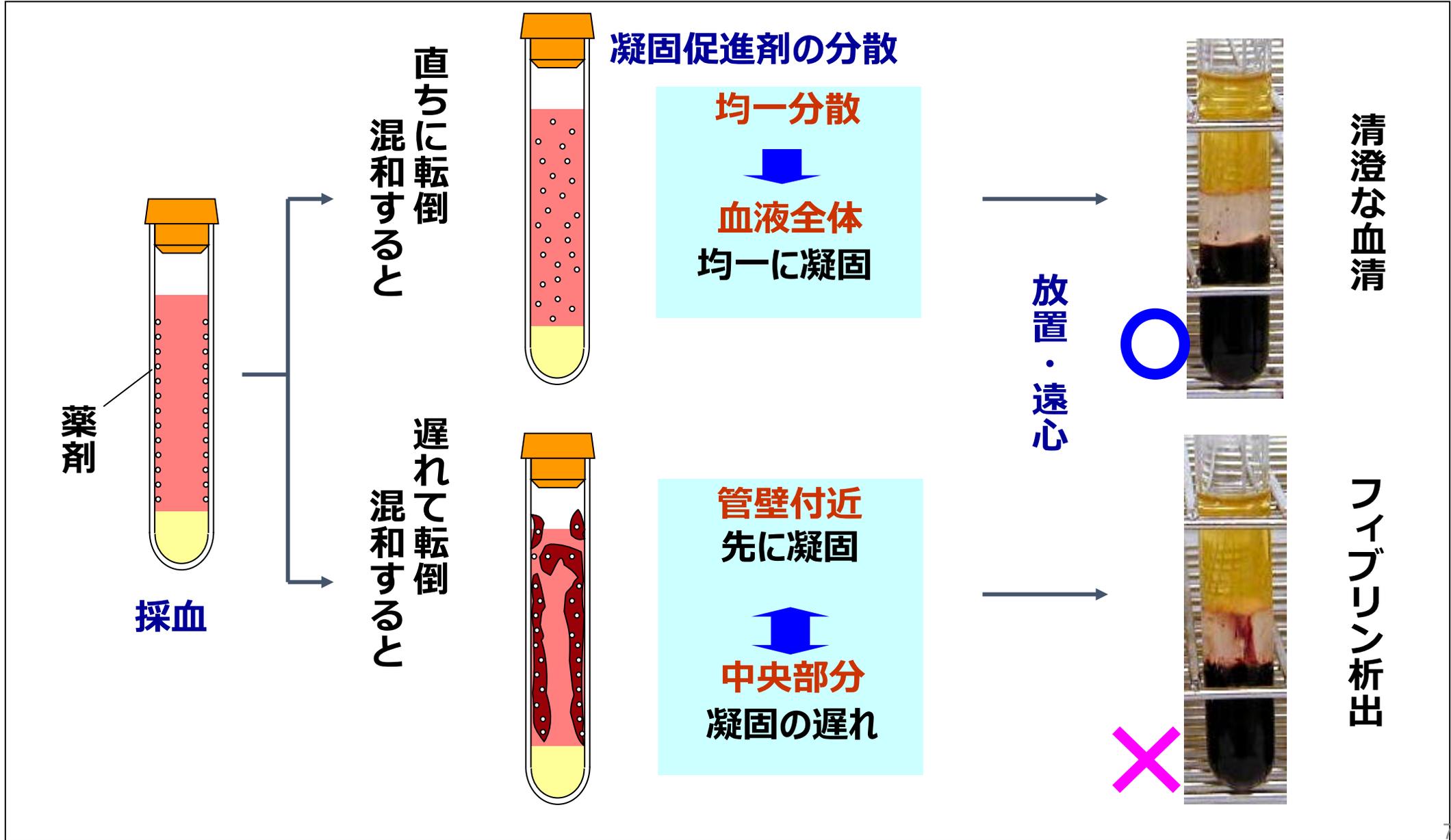
5~6回転倒混和

採血管の上下
をゆっくり
反転させます

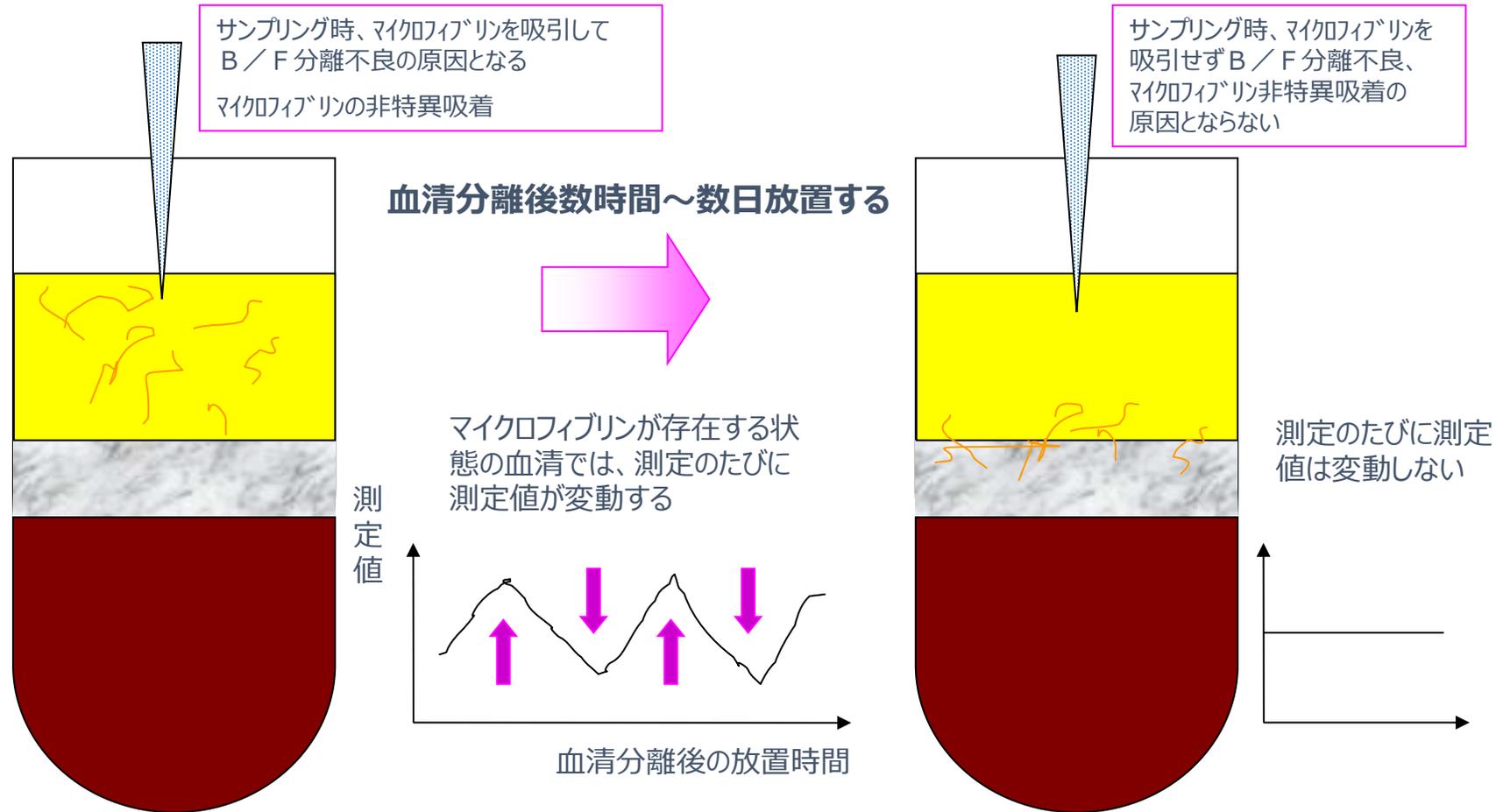


採血管を反転させないで縦
や横に振ると、混和不十分
や泡立ちになり、検査に支
障を与える場合があります

真空採血管の転倒混和のタイミング



血清分離不完全による免疫反応への影響



血清分離不完全血清では、遠心分離した血清中で、フィブリノーゲンがフィブリンに変化する反応が継続している

血清中のフィブリノーゲンが全てフィブリンに変化し自然沈降しフィブリンを含有しない血清になる

血清分離不完全による発生するマイクロフィブリン免疫検査項目への影響 採血後の転倒混和不足によりHBs抗原の偽陽性、偽高値 事例

- 転倒混和あり、なしでHBs抗原の測定を行ったところ、
転倒混和なしで偽陽性、偽高値が高頻度で発生した
- 転倒混和を十分に行うことが重要で、その他、凝固までの放置時間を長くする、遠心分離時間を長くすることでも、
影響が小さくなると報告されている
- 原因は、転倒混和不足によるマイクロフィブリン
(微小なフィブリン析出)、血球成分の浮遊などが、
高感度の試薬に影響を及ぼすと考えられている

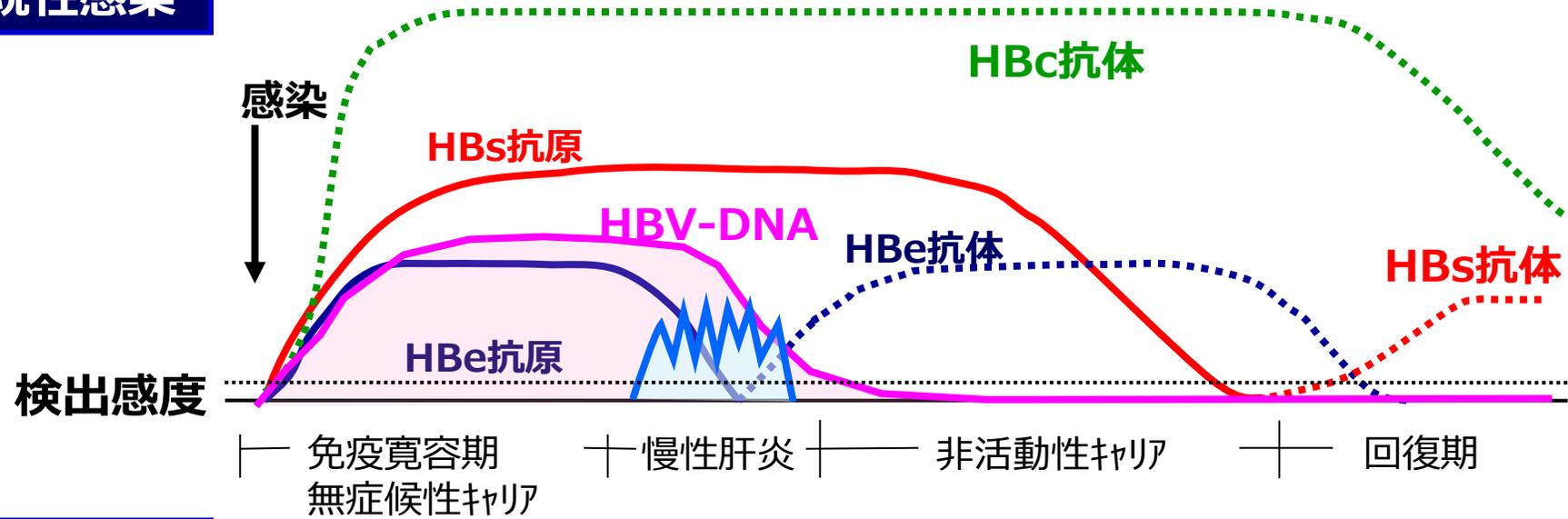
**生化学用採血管も必ず
転倒混和してください**

インセパック（凝固促進タイプ）	
混和あり	混和なし
0/72（0.0%） 偽陽性、偽高値 発生無し	全検体、偽陽性・ 偽高値発生率 14/64（21.9%） 偽陽性率 8/64（12.5%） 偽高値化率※ 6/64（9.4%）

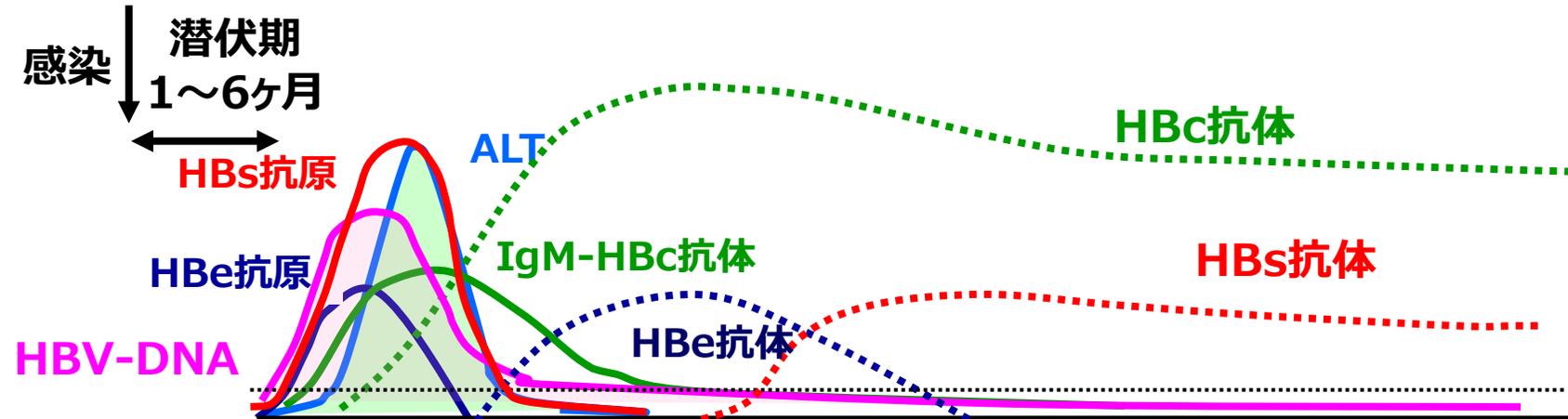
※ 偽高値:陰性であるが再検後0.3COI以上低値を示した場合

HBVマーカーの推移

持続性感染



一過性感染



免疫測定法の異常反応

試薬側の要因

測定原理

測定法（ECLIA、CLEIA、CLIA、RIA、EIA、FIA、TIA、免疫クロマトなど）
競合法とサンドイッチ法

測定系の影響

抗体の特異性の影響 → **交差反応、非特異反応**

抗原の純度、精製度、由来など → **交差反応、非特異反応**

標準品の選定の問題

測定条件の影響（反応時間、サンプル量、材料等）

試薬劣化

免疫測定法の異常反応

測定物質の性状や検体側での要因

目的物質について

- 類似物質の存在 → 交差反応による偽高値、偽陽性
- サブタイプの存在
- 分子量の大小
- 抗原決定基の数
- 合成される部位

検体による影響

- HAMA(Human Anti-Mouse Antibody)、自己抗体、M蛋白等の存在、クリオグロブリン等の存在
 - 非特異反応による偽高(低)値、偽陽(陰)性
- 薬剤の影響 → 偽高(低)値、偽陽(陰)性
- 採血管血清分離不良による影響 → マイクロフィブリンによる偽高(低)値、偽陽(陰)性

M蛋白：
均一な分子構造を持つ
免疫グロブリン

免疫測定法の異常反応

分析装置での要因

検体

検体詰まり (検体粘性、フィブリン)
検体量不足
高濃度検体によるキャリオーバー

ルーチンデータ・精度管理データ不良

対処法

ディスポ検体サンプリングチップによる圧力検知 警報リスト表示、アラーム

試薬

試薬量管理
試薬ロット・有効期限
キャリブレーション有効期限
各項目試薬クロスコンタミ(ボトル試薬のみ)

ルーチンデータ・精度管理データ不良

対処法

各種センサー、リーダ読み取り
警報リスト表示、アラーム

機器

分析機各機構の動作異常
各種部品・分注シリンジ・ポンプ等劣化

ルーチンデータ・精度管理データ不良

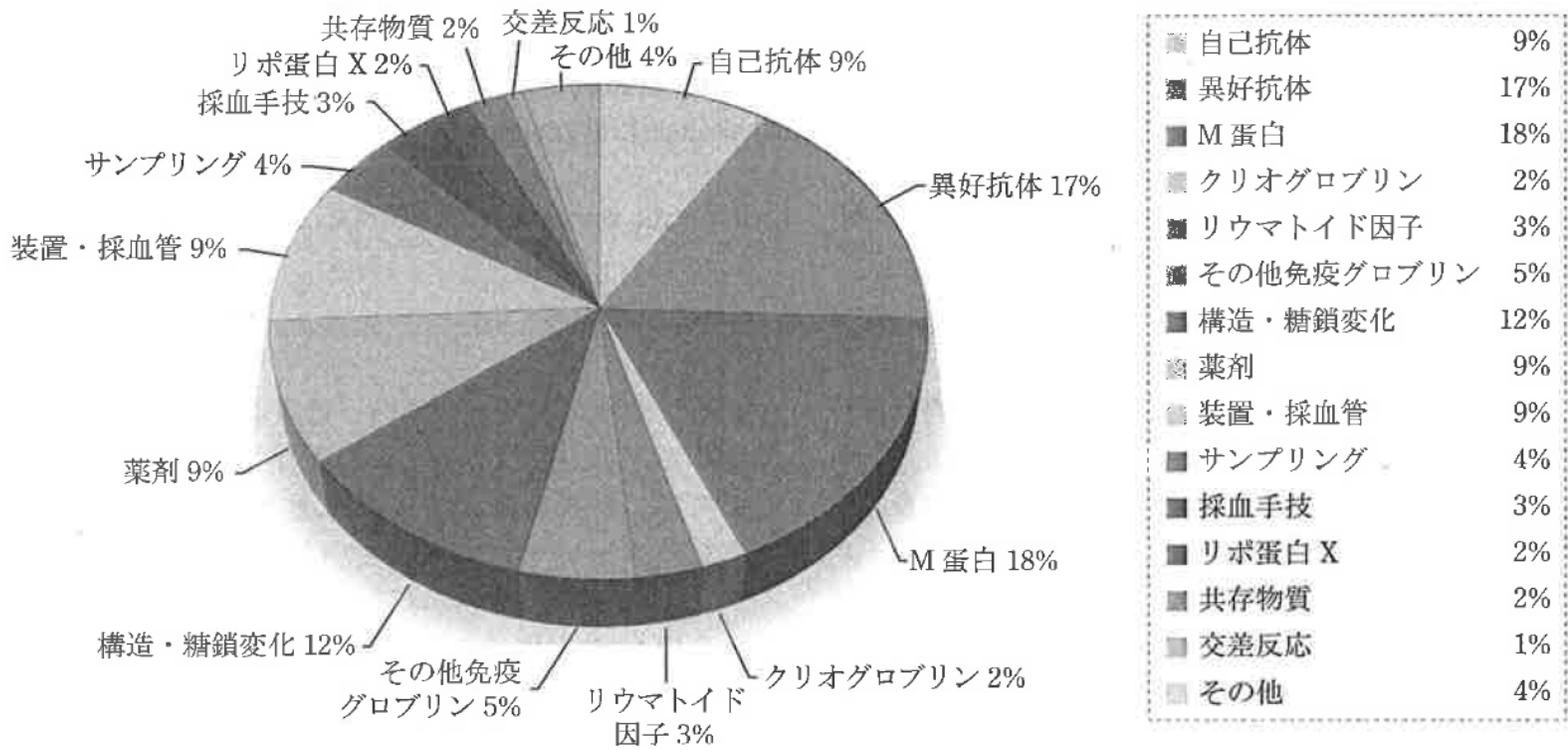
対処法

各種センサー
警報リスト表示、アラーム
定期メンテナンス

ピットフォール事例原因

■ 患者体内に存在する物質(免疫グロブリン、脂質等)、体外から取り入れた物質(薬剤、サプリメント等)、分析装置や採血管・採血手技に起因するもの、環境(温度、光等)に起因するものなど多岐にわたる

■ 自己抗体、異好抗体、M蛋白、クリオグロブリンなど免疫グロブリンに関する事例が半数を超えている



測定値への影響

■ 異好抗体

- 異種動物の抗体と反応する抗体
- 代表例: ヒト抗マウス抗体 (HAMA: Human Anti-mouse Antibodies)
- 動物由来の抗体を用いた試薬にて非特異反応が生じる可能性がある

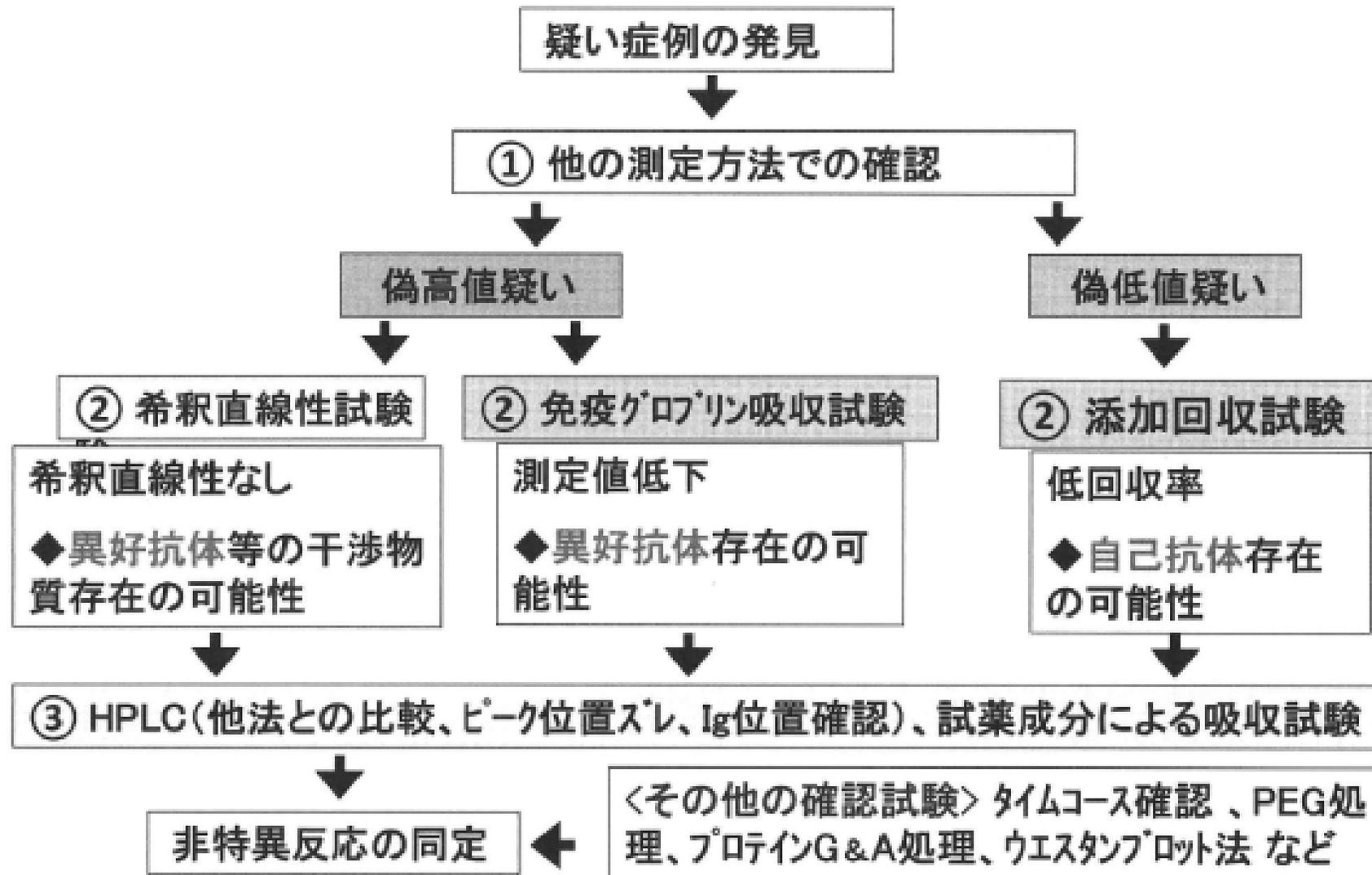
■ 自己抗体

- 自己抗原に対する抗体
- 測定対象となる抗原に対する自己抗体が血中に存在するために異常値を示す可能性がある

■ プロゾン現象

・抗原が過剰な状態において、標識抗体に抗原が結合し、標識抗体が十分量でなくなり、「固相化抗体—抗原—標識抗体」の免疫複合体が形成されず、見かけ上測定値が低くなってしまう現象。

免疫化学的検査における非特異反応解析のフローチャート



異常反応(非特異反応) 解析方法

1	検体の再遠心(高速遠心を含む)
2	希釈直線性試験(再検時 原倍再検でなく希釈再検)
3	ポリエチレングリコール(PEG)処理(免疫グロブリン除去 IgG、IgM等の吸着除去)
4	測定原理の異なる測定法や使用抗原、抗体の異なる測定試薬で確認
5	関連他項目の結果確認
6	抗原、抗体添加による中和試験(抗原、抗体検出検査時)
7	シアテスト (Sia euglobulin precipitation test) 検体(血清・血漿)+精製水→白濁沈殿物確認試験
8	異好抗体阻止試験(市販の吸収剤(阻止剤)による吸収試験)
9	特異抗血清、プロテインG、A、Lによる免疫グロブリン吸収試験(免疫グロブリン除去)
10	DTT(dithiothreitol)、2-ME(2-mercaptoethanol)での還元処理 (IgM 型の異好抗体失活)
11	ノイラミニダーゼ処理(シアル酸を切り離す作用)
12	ゲル濾過分析

異常反応(非特異反応) 解析方法

13	標識体、未感作粒子・ラテックスなど試薬成分での吸収試験
14	血清蛋白・リポ蛋白分画電気泳動
15	試薬成分添加試験 検体(血清)+試薬成分→ラテックス免疫比濁法等で試薬中の成分により生じる非特異的な混濁確認
16	酸加熱抽出試験 (耐熱・耐酸性抗原CEA等の非特異反応確認試験、酢酸Na緩衝液・血清等量混合70℃15分)
17	検体の不活性化
18	ウエスタンブロット法
19	添加回収試験
20	投薬薬剤の確認
21	汎用測定の場合、タイムコース確認

異好抗体は多様であり、1つの方法で異好抗体による干渉が否定されただけではその存在自体を否定することはできない

希釈直線性試験

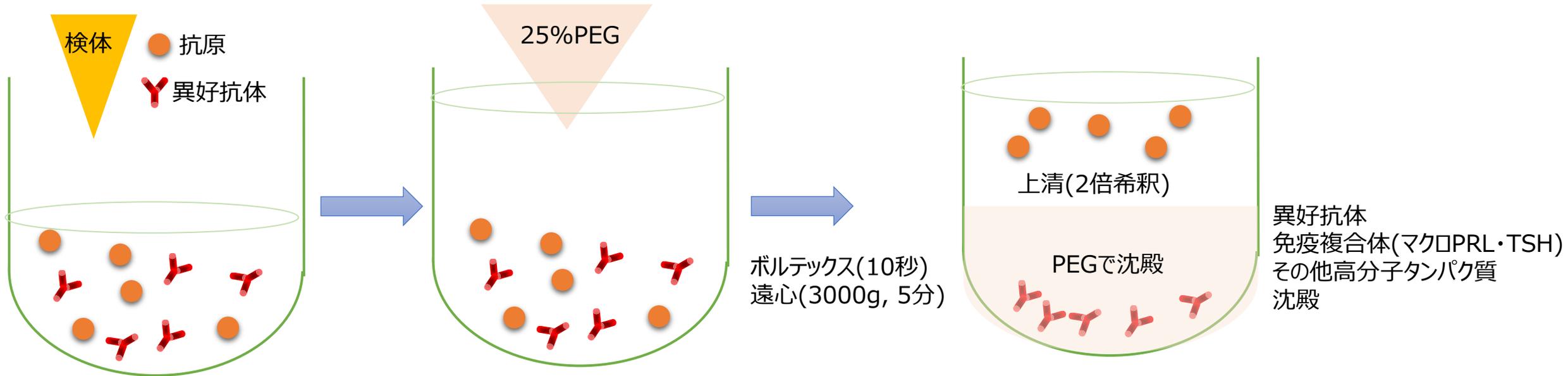
目的	試薬に干渉を及ぼす成分の有無を確認する
原理	高値を示した異常検体は、希釈により原因物質の濃度が低下し非特異的反応の影響が弱まるため直線性が得られない
方法	<ol style="list-style-type: none">① 非特異反応を示す試料を生理食塩水もしくは専用希釈液などを用い、段階希釈系列を作成し測定する② 段階希釈した測定値をプロットし近似曲線を描く③ 原点を通る直線が得られていることを確認する あらかじめ、原液濃度より段階希釈の理論値を求めておき、理論値から±5%のずれがあった場合を直線性がないと判断するなど、評価基準を決めておく
明らかになる点	試薬に干渉を及ぼす成分の有無
明らかにならない点	非特異反応の原因物質の特定
解釈と注意点	非特異反応であっても希釈直線性が保たれるケースもあるので注意が必要

ポリエチレングリコール(PEG)処理法(免疫グロブリン除去 IgG、IgM等の吸着除去)

目的	異常反応の原因に免疫グロブリンの関与が疑われる際に、免疫グロブリンを吸着して異常反応の減弱を確認する
原理	<ul style="list-style-type: none"> PEGが水に溶解する際にはPEGの周りに水を引き付ける。蛋白質は蛋白分子の周りに水分子を水素結合させて水に溶解しているが、PEGを加えるとPEGが蛋白質表面に結合している水分子を奪い取るため、自身がタンパク質と水素結合することで沈澱を誘発する 疎水性の高い高分子タンパク質が沈殿しやすい PEGによって、蛋白が分解することはないので、沈殿物をBuffer等で再溶解すれば、復元する 異好性抗体の確認のために通常実施しているPEG添加条件では、異好性抗体が沈殿し（これ以外の普通の抗体も同様に沈殿）、測定目的物質抗原は沈殿しないので、沈殿を除いた上清のみ測定すれば異好性抗体の影響を受けにくくなる
方法、回収率	<p>PEG6000の25%水溶液と検体を等量混合して攪拌し、遠心して上清を測定する。検体処理後に回収率が40%以上の測定値の低下によりPEG試験陽性と判断するという方法が報告されている。試験時には目的物質の同程度の濃度の別検体も同時に行って比較する（対照試験）</p> <p>PEG添加により検体の成分マトリックス変化のため対照検体でも回収率が100%とならない場合あり</p> <p>回収率 (%) = { (PEG処理後の測定値 × 2※) / (PEG処理前の測定値) } × 100% ※:PEGで検体が2倍に希釈される</p>
明らかになる点	異常反応の原因として免疫グロブリン等の異常蛋白が関与しているかどうかの確認
明らかにならない点	原因となる異常蛋白質の種類
解釈と注意点	<ul style="list-style-type: none"> 免疫グロブリンなどを非特異的に吸着して沈殿させることで、これらの異常反応への関与を予想する（スクリーニング）もので、原因物質の特定はできない 測定物質の分子量が大きいとPEG処理により沈殿する可能性があるため、測定物質の分子量が小さい場合に向く スクリーニング法なので、本法で陽性が確認された場合は免疫グロブリンなどの関与を他の方法で確認する必要がある

ポリエチレングリコール(PEG)処理法(免疫グロブリン除去 IgG、IgM等の吸着除去)

検体1 : 25%PEG 1



PEG処理前の測定値

PEG処理後の測定値

回収率 (%) = { (PEG処理後の測定値 × 2※) / (PEG処理前の測定値) } × 100% ※: PEGで検体が2倍に希釈される

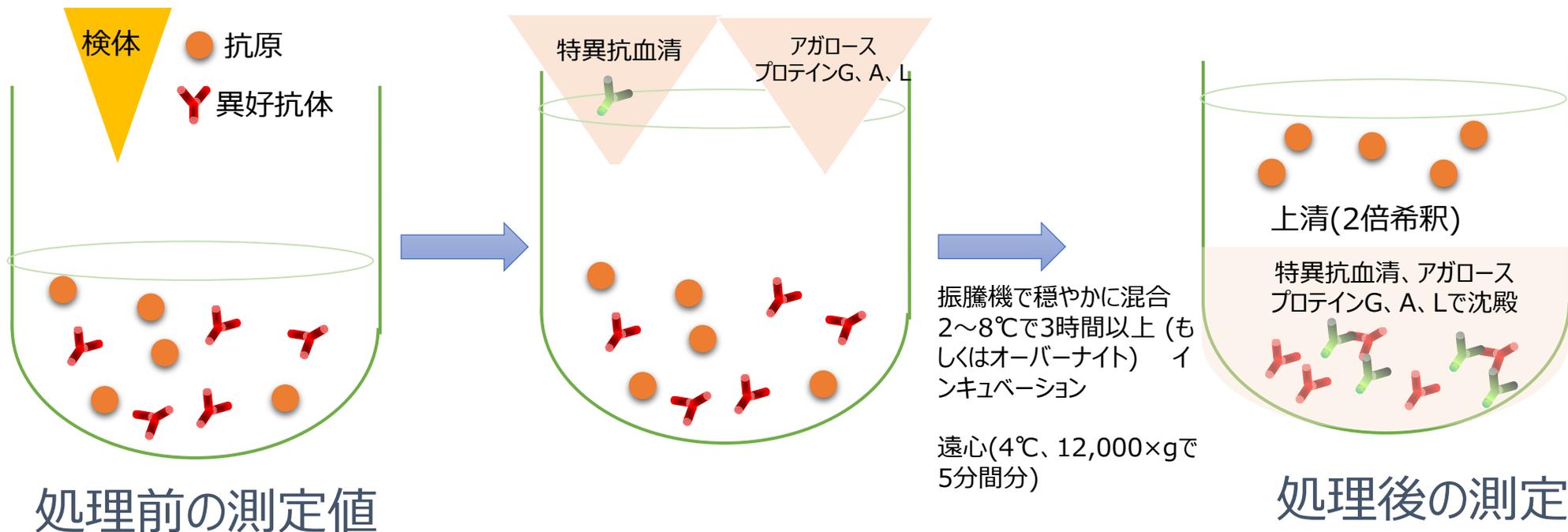
回収率判定	標識体との非特異的反応	回収率低下40% ↓	測定値偽高値
-------	-------------	------------	--------

シアテスト (Sia euglobulin precipitation test)

目的	自動分析装置による血清・血漿測定において、マイナスの測定値や類まれな高値・低値例、およびエラーフラグを伴う測定値が得られた場合、病態を反映していない異常値の可能性が考えられる このような症例に遭遇した時に、シアテストは異常反応のスクリーニング試験を目的として実施される
原理	検体中の異常反応を引き起こすタンパク質は疎水性のアミノ酸に富む構造であることが多く、精製水との混合によって不溶性（難溶性）の白濁沈殿物を形成する シアテストは、このような強い疎水性を示すタンパク質を検出することで異常反応の存在を可視化することができる。また、得られた白濁沈殿物を回収し、解析することで、異常反応の直接の原因となったタンパク質の同定に繋がる可能性がある
方法	シアテストの手順は以下の通りである（特殊な試薬や器具器材は不要なため、随時実施可能） ① 対象検体、精製水※1、各種スピッツ・試験管、ピペット（スポイトでも代用可）を用意する ※1 塩類を豊富に含む生理食塩水や緩衝液では、タンパク質を可溶化させるため使用不可 ② 用意したスピッツ・試験管に、精製水 1 mL に対して対象検体 100 μ L を滴下※2 する ※2 精製水：対象検体 = 10：1 が目安、検体量が多いほど③の判定と④の白濁沈殿物の回収が容易 ③ ②の滴下の直後、目視で白濁沈殿物の形成が確認された場合はシアテスト陽性と判定する ④ シアテストで得られた白濁沈殿物を回収する場合、3,000 rpm 5 分の遠心後に pH 7.2 のリン酸緩衝液で溶解して用いる
明らかになる点	<ul style="list-style-type: none"> ● シアテスト陽性の場合、通常のヒト検体中には存在しない異常なタンパク質の存在が示唆される ● シアテストで得られた白濁沈殿物を回収し、解析することで、異常反応の原因となったタンパク質の同定も可能である
明らかにならない点	<ul style="list-style-type: none"> ● 感度・特異度ともに 100%ではないため、完全に異常反応を肯定・否定することはできない ● 簡易的な定性試験のため、異常反応の原因となるタンパク質の同定には種々の解析が必要となる
解釈と注意点	<ul style="list-style-type: none"> ● あくまでも異常反応に対するスクリーニング試験の位置づけとして用いること ● シアテストの反応が弱い検体もあるため、検体滴下時の白濁沈殿物の形成を見落とさないこと

特異抗血清、プロテインG、A、Lによる免疫グロブリン吸収試験(免疫グロブリン除去)

検体 1 : 特異抗血清又はアガロースプロテインG、A、L 1



回収率 (%) = { (処理後の測定値 × 2※) / (処理前の測定値) } × 100% ※: 抗血清、プロテインG、A、Lで検体が2倍に希釈される

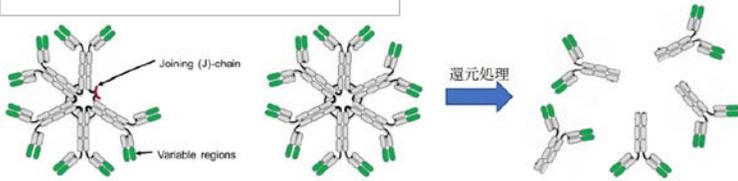
回収率
判定

対照検体※と比較し回収率が著しく変動した場合、測定値に対し、免疫グロブリンが非特異反応に関与していること推測する

例) TSH偽高値またはマクロTSH→回収率低下、TSH偽低値→回収率上昇

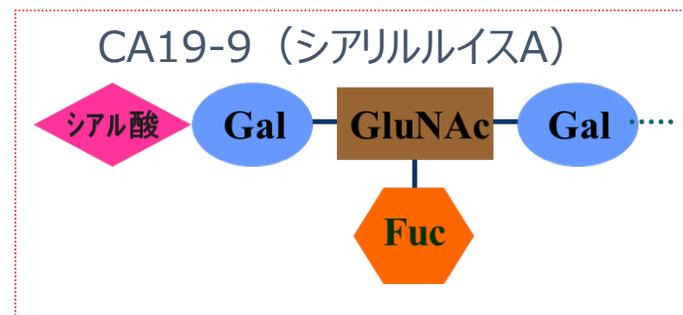
※対照検体: マトリクス変化のため対照検体でも回収率100%とならない場合あり。免疫グロブリンの除去によるタンパク質濃度変化、アガロース懸濁液はバッファーのため希釈されることにより、マトリクスが変化し、通常検体とは試薬との反応性が異なる可能性があり

DTT、2-ME還元処理

目的	ジスルフィド結合 (S-S 結合) を還元剤により切断することで、IgM に起因する異常反応であるかの確認を行うため
原理	<p>ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT) もしくは 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol, 2-ME) などの還元剤を用いて、IgM の 6 量体もしくは 5 量体+J 鎖を形成している S-S 結合を切断することで、IgM を単量体化し、異常反応の消失の有無を確認</p> 
方法	<p>DTT 処理： 0.005～0.01 M DTT with PBS (pH 7.3-7.4) を等量の試料（血清もしくは血漿）と混和し、37℃で 30～60 分インキュベートを行う</p> <p>2-ME 処理： 0.2M 2-ME with PBS (pH 7.3-7.4) を等量の試料（血清もしくは血漿）と混和し、37℃で 15分インキュベートを行う（0.1 M 2-ME の場合は 37℃、60～120 分程度）</p> <p>いずれも、対照として PBS のみを試料と等量混合したものも準備しておく</p>
明らかになる点	異常反応への IgM の関与
明らかにならない点	<ul style="list-style-type: none"> ● IgM の作用機序 ● 異常反応物質の同定
解釈と注意点	<ul style="list-style-type: none"> ● 多量体の IgM を単量体化する還元剤の濃度に注意が必要である。必要以上に還元処理を行うとμ鎖間の S-S 結合や、IgG 等他の免疫グロブリンの S-S 結合を切断してしまうことになる ● 適切な条件で還元処理が行われた場合、還元処理によって異常反応が消失すれば、IgM が関与していたことが明らかとなる。異常反応が消失しなければ、他の原因を考えることとなる

ノイラミニダーゼ処理

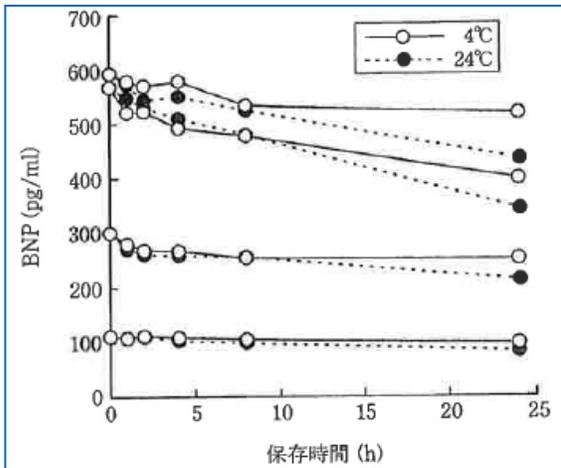
目的	ノイラミニダーゼ (シアリダーゼ) 処理により検体中のCA19-9の抗原決定基からシアル酸を離脱させた後、CA19-9測定値の低下を確認することによって、処理前の検体中CA19-9結合活性が真の反応性を反映しているかを確認
原理	<p>ノイラミニダーゼ (シアリダーゼ) は糖脂質や糖蛋白糖鎖からシアル酸を脱離する糖分解酵素であり、CA19-9の抗原決定基はルイス式血液型糖鎖にシアル酸が結合したもの</p> <p>検体をノイラミニダーゼで処理することにより、シアル酸が脱離するため、CA19-9測定値は低下する</p> <p>非特異反応が生じている場合はノイラミニダーゼ処理後もCA19-9測定値は低下を示さないため、これにより非特異反応の有無を判別することができる</p>
方法	<p>①500 mU/mLに調整したノイラミニダーゼ溶液 (凍結保存) を、室温で融解後、すぐに以下の操作を行う</p> <p>②100 μLの検体をサンプルチューブにとり、これに同量のノイラミニダーゼ 500 mU/mL 溶液を加える</p> <p>③ボルテックスで約 10 秒軽く攪拌 (または指で軽くチューブをはじいて攪拌) 後、37°Cにて3-4時間インキュベートする</p> <p>④処理後の検体のCA19-9を測定する</p> <p>ノイラミニダーゼ溶液の調製 ノイラミニダーゼ 低プロテアーゼグレード (Sigma Aldrich, Cat. No. 11 585 886 001) を使用する 0.25 mg/mL BSA 添加 10 mM リン酸緩衝液 (pH) を調製する ノイラミニダーゼ 5Uを試薬添付の取扱説明書に従って溶解後、上記緩衝液で500mU/mL溶液とする。(100 μLを小分け分注して凍結保存し、必要時に融解して使用する)</p>
明らかになる点	<p>回収率 (%) を算出 回収率 (%) = (ノイラミニダーゼ処理後の測定値×2) / (処理前の測定値) ×100</p> <p>CA19-9測定値の回収率低下:CA19-9真の反応性を反映、回収率低下なし:非特異反応の可能性あり</p> <p>判定時に、対照検体でのノイラミニダーゼ処理後の CA19-9測定値(回収率)が低下することを確認する</p>
明らかにならない点	対照検体の回収率が顕著に低下しない場合は、酵素反応が正常に機能していないと考えられ、非特異反応の判定は不能



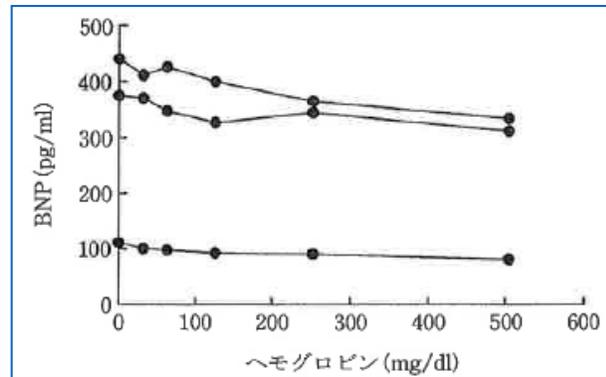
溶血の影響

成分名	全血(血球)、血清、血漿中タンパク分解酵素
インスリン	セリンプロテアーゼ等により分解されて低値化する
BNP	
ProGRP	

BNP事例

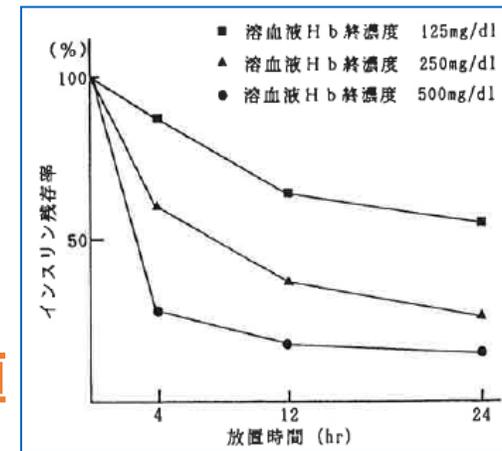


偽低値



偽低値

インスリン事例

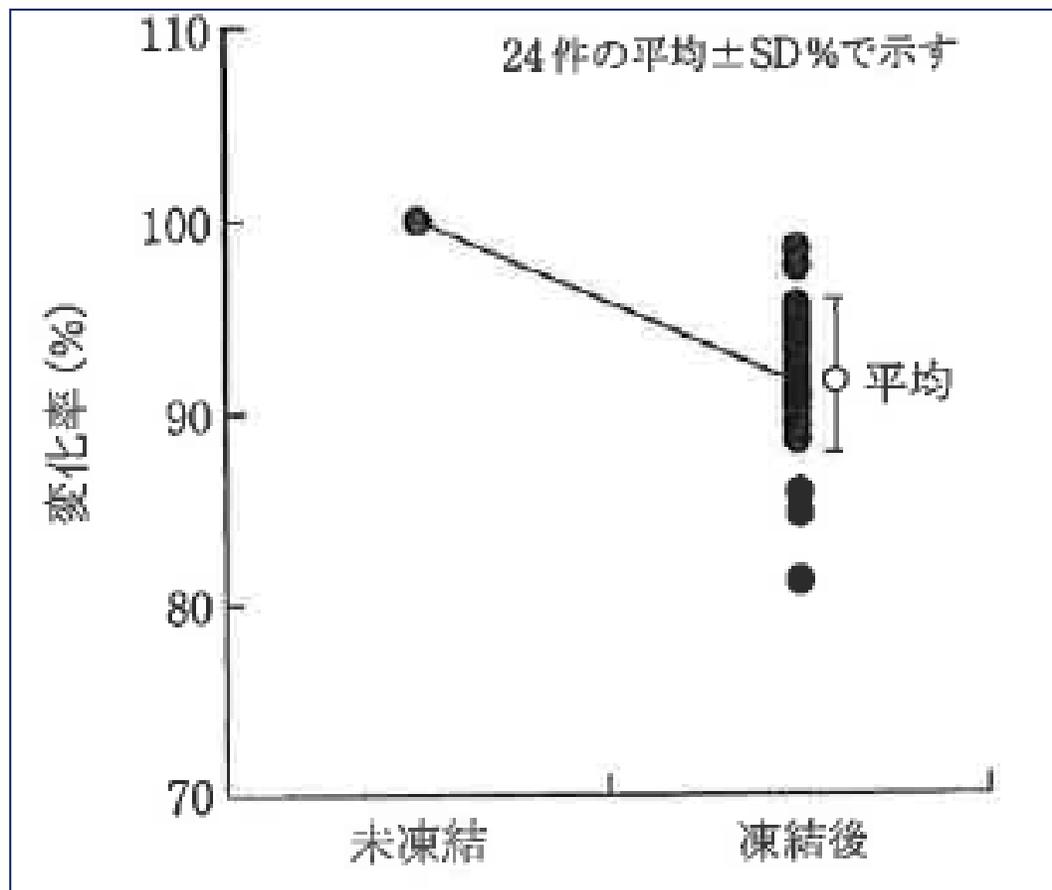


偽低値

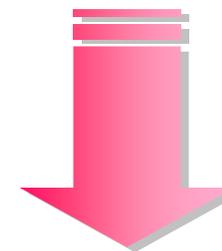
凍結融解の影響

BNP 血漿検体の安定性 未凍結 VS 凍結融解 比較

血漿検体24例 遠心直後の測定値 VS -20°C凍結後翌日溶解 測定値 比較
→ 未凍結検体100%とした場合、凍結後翌日溶解 測定値 91.5 ± 4.0 (平均 \pm SD)

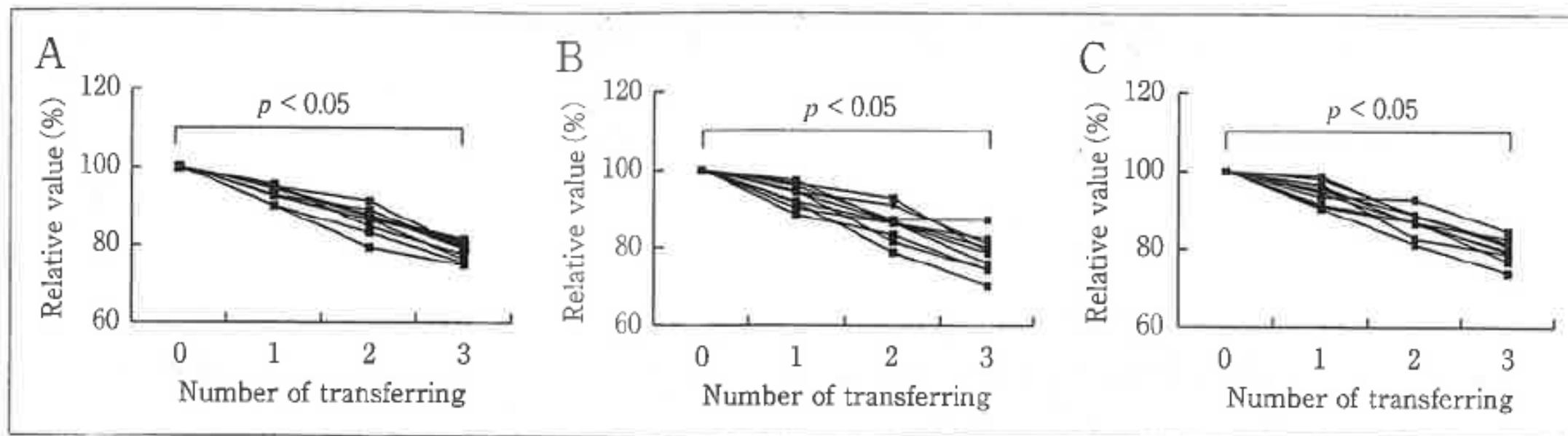


BNP事例



偽低値

容器移し替えによるプロカルシトニン濃度偽低値現象



移し替えの回数が増えることで、低下傾向となる。

一般的にホルモン分泌は日内リズムがある

日内変動項目をきたす主な血清検査項目

項目	高値となる時間帯	低値となる時間帯
ACTH	6~10	0~4
コルチゾール	5~8	21~3
テストステロン	2~4	20~24
TSH	20~2	7~13
サイロキシン (T ₄)	8~12	23~3
プロラクチン	5~7	10~12
アルドステロン	2~4	12~14
レニン	0~6	10~12
エピネフリン	9~12	2~5
ノルエピネフリン	9~12	2~5

測定値を比較する場合は、検体採取時間を一定にすることが必要

がん以外での測定値上昇〔異常値〕報告事例

CA19-9

疾患名・薬剤・その他要因	文献報告値 (U/mL)
糖尿病	～約 3,000
嚢胞性線維症 日本では極めて稀 20～30名 (遺伝性疾患)	～約 600
びまん性汎細気管支炎	～約 3,000
特発性間質性肺炎	～約 10,000
虫垂炎	～約 100
自己免疫性疾患	～約 1,000
肝疾患	～約 5,000
膵・胆道系疾患 (主に結石由来)	～約 90,000
水腎症、腎嚢胞 (主に結石由来)	～約 5,000
スクラルファート (胃粘膜保護剤)	～約 4,000
スルホニル尿素薬 (ルイス血液型: Le a-b- 患者)	～約 1,000
紅茶多飲	～約 1,500
若年健康女性 (性周期)	～約 200
唾液混入	～約 50

スクラルファート〔胃粘膜保護剤〕

**胃粘膜保護剤スクラルファート〔商品名:アルサルミン〕
を長期服用すると血中CA19-9値が上昇する**

測定系によっては、4,000U/mLまで上昇し、服用中止後測定値は、基準値以下まで下がった例がある

CA19-9は胃粘膜にも存在しており、胃粘膜保護剤の使用により胃粘膜のCA19-9が毛細血管を通り、血中に入り込んだためCA19-9が上昇したと考えられる

PSA 発毛剤〔プロペシア〕で偽低値

男性型脱毛症治療薬のフィナステリド（商品名：プロペシア）

- ✓ 飲む発毛剤
- ✓ 前立腺肥大治療薬として承認された薬剤

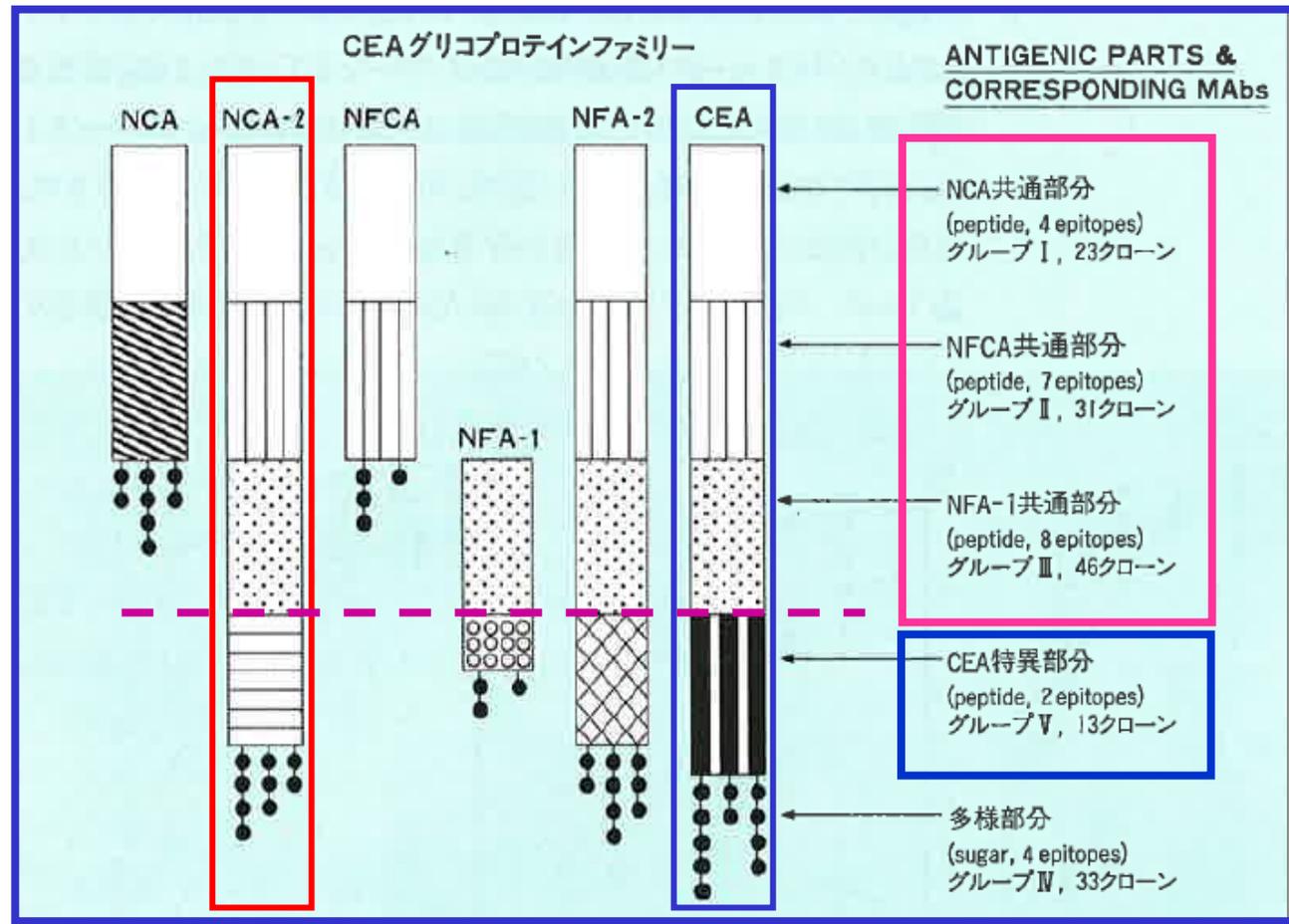
プロペシア48週間使用

PSA値	40～49歳で40%減少
	50～60歳で50%減少



PSA過去1年間の上昇率から判断する方が好ましい

CEAファミリー〔NCA-2〕



CEAにはいくつかの遺伝子ファミリーが存在するが、分子量約170kDaのNCA-2は糖蛋白質で胎児便に多く含まれ、成人の消化管でも産生される場合がある。CEA（分子量約180kDa）と構造が非常に類似していることから、特定のCEA測定試薬によってはCEAと同様に測定される¹⁾。これは各々の試薬に用いられている抗体が異なることによるもので、抗体ごとにCEA遺伝子ファミリーとの反応性が異なる。そのため、NCA-2との反応性がある試薬ではNCA-2保有者は明確な異常がないにもかかわらずCEAが高値となる場合がある。現在市販の試薬でNCA-2との反応性のある試薬はCobas、AIA、ARCHITECT、HISCL、反応性の低い試薬はルミパルス、UniCel、スフィアライト、Centaurなど。特にNCA-2の交差反応が問題となるのは紹介患者などの持参データと自施設の結果が異なる場合であり、その際は紹介元と自施設のCEA測定試薬を確認する必要がある。

1) 黒木政秀. CEAの抗原性とその測定法. 検査と技術1995; 23: 845-852.

図) 福岡大学医学部 医学部部長 黒木 政秀 教授 CEA文献より引用

ピットフオール事例



問6.この検査結果をどう考えますか？

氏名：進次郎さん

性別：男性

年齢：16歳

診療科：救急科

現病歴：部活中に転倒、骨折疑いで受診、その際の感染症検査でHCVAbが**弱陽性**

既往歴：特になし

S/CO:陽性と陰性を判定するために用いる数値
⇒カットオフ値
1.0以上を陽性と判定

項目名	結果	判定
HCVAb	1.9 S/CO	(+)
AST	22 U/L	
ALT	20 U/L	



感染している？若年だが過去の感染？？
抗体価は低いので偽陽性かな？？？



問7.この検査結果をどう考えますか？

初回妊娠の30代女性（産科）

妊婦検診の際、院内HIV検査**陽性**

3年前、中国に1年間在住。出国前後でHIV検査を実施し陰性
輸血歴なし、不特定多数・同性との性交なし、刺青・薬物なし

C.O.I：陽性と陰性を判定するために用いる数値
⇒カットオフインデックス
1.0以上を陽性と判定

測定項目	結果
HIV Ag/Ab	>15.0 C.O.I (+)
HBsAg	陰性
HCVAb	陰性
HTLV-1/2	陰性



産科で陽性？しかもレンジオーバー！
医師に確認したところ、HIV感染特有の症状はないとのこと。あやしいな。

問8.この検査結果をどう考えますか？

90代男性

心不全治療目的で循環器内科に入院

初診時はNT-proBNPは<5.0 pg/mL(感度以下)、BNPは697.5 pg/mLで2つの心不全マーカーが乖離していると、主治医より問合せ

測定項目	結果
NT-proBNP	<5.0 pg/mL
BNP	697.5 pg/mL



心不全で心エコーでも心機能はかなり悪いことがわかる。
主治医もNT-proBNPがおかしいと言っている。
どんなことが考えられますか？

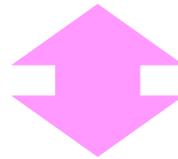


ピットフォール(異常反応)を発見するために

臨床検査技師の知識・経験による力量



この検査結果おかしくない？



- ✓ 免疫検査の限界と非特異反応のリスクを認識すること
- ✓ 問題発生時には適切な対処がスムーズにできるよう試薬組成、試薬原理、分析機の動作原理などを理解し、解析手段をマニュアル化し関係者に周知
- ✓ 各検査項目に特有なピットフォール事例を把握
- ✓ 『非特異、異常反応の可能性が有り現在原因究明中』主治医へ直接連絡〔臨床医、主治医との日頃のコンタクト強化〕

Agenda

- ◆ 抗原抗体反応
- ◆ 免疫検査の歴史と種類および原理
- ◆ 免疫血清検査の自動化
- ◆ 免疫血清検査のピットフォール
- ◆ 免疫血清検査の精度管理



免疫血清検査の精度管理

• 内部精度管理

目的：測定装置、試薬の状態を把握する。複数回測定することで日内・日間の精密さを維持管理すること。

測定回数：自動分析装置で測定する項目は1日2回以上測定し、 \bar{x} -R管理図等で管理することが原則。免疫血清検査の試薬は高価なことから、検体測定前に1回測定し、試薬の安定性を考慮して管理血清の測定を追加するのが実践的である。

管理試料の追加測定が必要な場合

- 日内でしばらく測定していない場合
- 校正をした時
- 新しい試薬を搭載した時
- エラーが出現した時
- 関連項目とのバランスが悪い時
- 患者検体の平均値が異常と思われた時
- エラーが出現した時

当院検査部の内部精度管理手順の例 (ISO 15189:2022 7.3.7.2内部精度管理に対応できるよう手順を整備しています)

● コントロール測定タイミング

◇ 当日立ち上げ装置 (翌日まで稼働する装置)

始業時の検体測定前に1回、dailyセット実施後に1回測定し、検査結果を保証する。

また、メンテナンス前後必要に応じて (キャリブレーションや測定系に影響のあるメンテナンスを実施した場合) 測定を行う。

◇ 前日から24時間稼働装置 (当日停止する装置)

朝の病棟検体測定が終了した時点で1回、END実施前に1回測定し、検査結果を保証する。

また、メンテナンス前後必要に応じて (キャリブレーションや測定系に影響のあるメンテナンスを実施した場合) 測定を行う。

● コントロール試料の管理基準

コントロール試料のロット変更時は5日間 $n=2$ で測定を行い、平均値を決定する。

該当項目の過去1年分のQCデータから計算したCV%と新Lotの平均値を用いてSDを算出し設定する。

この時必ずメーカー推奨の管理幅内であることを確認する。

● 内部精度管理方法

Xbar-R管理図の $\pm 2SD$ を警告限界、 $\pm 3SD$ を管理限界とする。

● シフト・トレンドの管理

Xbar-R管理図において測定結果が、片側に偏在して7点出た場合や、連続して上昇または下降が7点続いた場合は、技術管理者に報告し、指示を仰ぐ。また、Xbar-R管理図に対処内容を記録する。対処したが生シフト・トレンドが続いた場合は「是正・予防処置計画/報告書」に記録し、部門責任者に報告する。

● コントロール値が警告限界 ($\pm 2SD$) または管理限界 ($\pm 3SD$) を外れた場合の対処法

管理試料の結果が警告限界 ($\pm 2SD$) を超えた場合は、再度測定を行い、改善されれば測定を開始する。改善されない場合は注視し、連続して $\pm 2SD$ を超える場合は、技術管理者に報告し、指示を仰ぐ。対処内容があればXbar-R管理図に記録する。

当院検査部の異なる機材の結果の互換性の検証の例

(ISO 15189:2022 7.3.7.4検査結果の比較可能性に対応できるよう手順を整備しています)

● 検査項目を複数の検査機器で測定している場合、該当項目に対して少なくとも毎年1回（12月）以上結果の互換性を検証する。測定結果一覧、実測分布図及び検証方法を「機種間差確認記録」または「機器間差確認記録」として残す。書式は特に問わない。なお、測定にあたっては同一日で可能な限り同一時間帯で測定する。

1) 実験用試料

検査済みの患者検体を用いる。

分析測定範囲を網羅するために最低20検体を用いる。

2) 評価方法（以下のいずれかによる）

a)2群間のt-検定を実施し、 $P > 0.05$ であることを確認する。

b)3群間の場合は、分散分析により $P > 0.05$ であることを確認する。

c)回帰直線を求め、あわせて相関係数も求める。次の範囲内であるか確認する。相関係数： $0.95 <$ 傾き： $0.95 \sim 1.05$

3) 確認頻度は年に1回（12月）とする。

結果を確認し、レビューし、必要に応じて是正処置を講じる。これらの検証結果は記録として保管する。

免疫血清検査の精度管理

• 外部精度評価

目的：検査室間の誤差の実態を調査する。自施設の精度（精確さ）が全国的にどのレベルにあるか把握し、日常検査法を見直す指標となる。

項目：実臨床では多くの項目が測定されているが、外部精度評価として設定されている項目は少ない。その理由は目標値が平均値となることが多く、参加数が多くなると信憑性が乏しくなり評価できないこと、測定法や測定試薬が多種多彩なため、すべての試薬と反応性が同一の試料を供給することが困難であることなど。全国規模で実施していない項目はメーカーサーベイを活用し試薬・機器の異常の発見につなげる。

代替アプローチ：参加サーベイに含まれない検査項目については以下の方法等により実施する。

- ① 試料を委託施設あるいはその他の検査室と分割して分析する
- ② 試料を分割して自施設で確立された方法で分析する
- ③ 検査済み試料，プール試料，などをブラインドで分析する
- ④ カルテのレビューにより臨床的妥当性確認を行う
- ⑤ その他の適切かつ文書化された方法を採用する

可能な場合，他の検査室との間で検体を相互に交換して測定するような外部由来の検体を利用する。

是正：±2SDIまたは±3SDIを超える項目、不満足な結果となった項目がある場合は、是正処置を講じる必要がある。

外部精度評価の是正処置事例

項目	試料 No.	報告値	SDI	定性評価	試薬		
					ルミパルスプレストオーソHCV		
					平均	SD	CV (%)
HCV抗体	21	0.10		A	0.100	0.000	0.0
	22	5.20	-2.0* ¹	A	5.563	0.179	3.2

【内容】

2022年度日臨技臨床検査精度管理調査において、試料22 HCV抗体定量でSDIが-2.0（計算すると-2.03）となり、-2SDIを外れた。（なお、定性値は評価Aだった。）

【緊急処置内容】

本件発生日の内部精度管理は問題なく、患者検体の測定には影響ないと判断し、検査業務を継続した。

【原因】（潜在的な原因の調査過程を含む）

①試料が発送されてから到着するまでの試料の状態・到着後の保存状態

試料は液状試料であり、到着後すぐに冷蔵保存した。溶解不要の試料であり、他の項目については評価範囲を外れていないため、試料に問題があるとは考えにくい。

②試薬Lot

試薬Lot：HU3012（試薬期限：2023年1月）

当院と同じ測定装置、試薬を使用している施設は127件あり、その中で同じ使用期限を使用していたと考えられる施設が86件で全体の約2/3を占めていることから、当院の測定値が低値傾向にあるのは試薬Lotとの組み合わせによるものではないと考えられた。

③分析装置・試薬の状態

測定前に試薬の期限・残量・開封日の日数を確認しており、劣化など試薬に問題があるとは考えにくい。また、装置について試料測定日前後の内部精度管理を確認しても管理範囲内であり、装置に異常があったとは考えにくい。

1号機は試料測定日の2週間前、2号機は2日前に今回使用したLotに切り替わっていた試料測定に使用した検量線の発光カウントは、1号機と2号機で大きな差はなく、コントロールの結果においても大きな差はなかった。試料の測定について、1号機と2号機の再現性は良好で、どちらも全国平均よりも低値傾向であった。よって、測定装置・試薬には問題がないと判断した。

測定日前後1ヶ月の内部精度管理を確認すると、2濃度のコントロールのどちらもメーカー参考値と比較してわずかに低めに推移していることを確認した（表示値8.3が平均8.1、表示値18.4が18.2）。この傾向は1号機、2号機どちらでも見られた。測定日前後にキャリブレーションが実施されているが、低めの傾向は変わらなかった。しかし、2台ともに見られた傾向だったこともあり、問題ないと判断し検査を継続していた。

これら総合的に判断すると、許容範囲であるものの検量線がコントロール及び日臨技サーベイ試料の低値傾向の原因と推察された。

【改善計画】（根本原因の排除）

本件に関して、3SDIを超えているわけではないので、原因追及のみとする。

講義のまとめ

- 免疫学的測定法は時代とともに進化し、高感度化されてきた。
- 自動分析装置の開発が進み、測定者の負担が軽減され、誰でも簡便に操作できる時代である。
- 一方で異常反応は頻度こそ多くないが一定数発生しており、異常反応に遭遇した際の気づく能力が求められる。
- 装置の原理、特徴、試薬組成に関する知識、異常反応事例や検査項目の学習は原因究明の一助となる。
- 異常反応の原因に的確にアプローチするためにフローチャート作成し準備する。
- 異常反応の解析は臨床化学のピットフォール症例解析マニュアルが参考になる。
- 医療法改正やISO 15189など、免疫血清検査においても精度管理の重要性が増している。

異常反応の解析や精度管理で外れた場合など、しっかりと原因を探ってください。
原因追及に費やす時間が、免疫血清検査全般の知識・技量のレベルアップに繋がるはずです。