



# 第23回 日本臨床化学会近畿支部総会

抄録集



日時・平成25年**2月24日**日

会場・天理医療大学 大教室B 4階

総会長・**米田 孝司** (天理医療大学)

副会長・**山本 慶和** (天理医療大学)

## 目 次

学会日程、会場および交通案内	1
参加者のお知らせ	2
学会プログラム	3, 4
-----	
特別講演	5, 6
企業シンポジウム	7-10
ランチオンセミナー	11-13
シンポジウム	14-19
一般演題	20-26
-----	
広告	

主催 日本臨床化学会近畿支部

# 第23回日本臨床化学会近畿支部総会

日 時：平成 25 年 2 月 24 日（日） 9:30～17:00

会 場：天理医療大学 大教室 B 4 階

〒632-0018 奈良県天理市別所町 80-1（天理駅より徒歩 15 分）

総会長：米田 孝司（天理医療大学）

副会長：山本 慶和（天理医療大学）

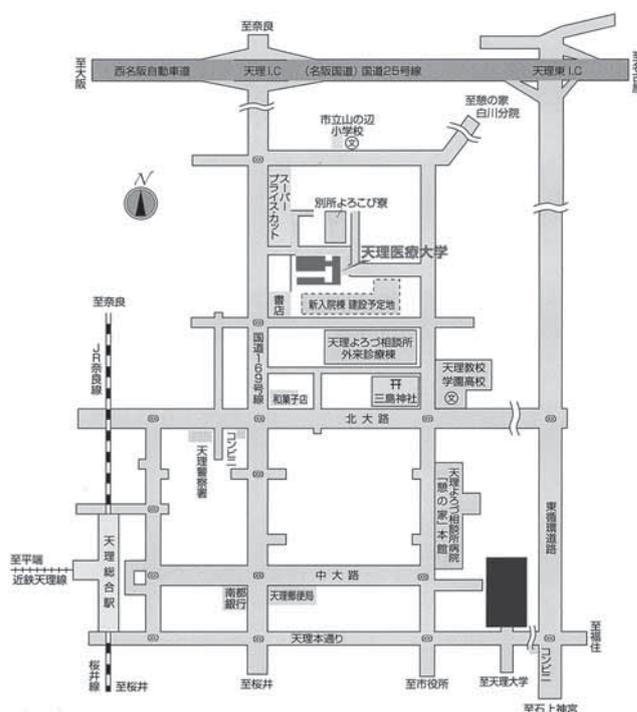
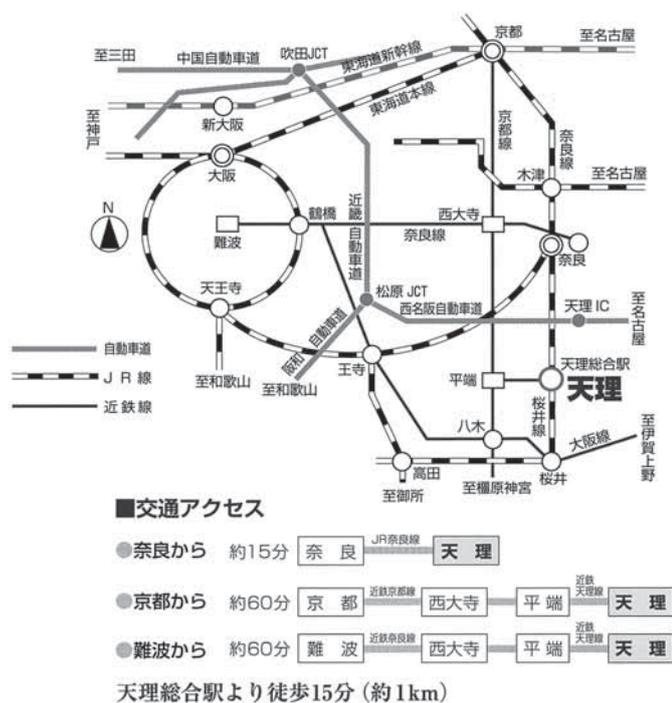
テーマ：動脈硬化における画像診断と検体検査の架け橋

～画像診断の基礎を学び、検体検査の技術と知識を習得～

会 費：無 料

運営事務局（天理医療大学・竹田 真由 E-mail：takeda@tenriyorozu-u.ac.jp）

## 会場のアクセスとキャンパス周辺地図



## 司会・座長・演者の先生方へ

1. 一般演題の発表時間は1演題10分（発表7分、質疑応答3分）です。
2. シンポジウムは1演題20分（発表17分、質疑応答3分）です。
3. 司会・座長・演者の先生はあらかじめ「演者等受付」をお済ませ下さい。
4. 次演者の先生は演台近くの「次演者席」でお待ち下さい。

## 学会参加の皆様へ：

1. 学会は天理医療大学内4階の大教室 B にて行います。看板又は案内係がいます。
2. 支部役員会は天理医療大学内4階の大教室 B の前の演習室14にて行います。
3. 参加受付は午前9：30より天理医療大学内1階の玄関にて開始いたします。
4. 敷地内は全面禁煙です。喫煙はご遠慮いただきますようお願いいたします。
5. 駐車場はございませんので、公共機関でお越し下さい。
6. 問い合わせ先：電話での問い合わせは不可能ですので、  
米田孝司（E-mail：kyonedas3333@gmail.com）までメールにてお知らせ下さい。

## 第 23 回日本臨床化学会近畿支部総会プログラム

9:38~9:40 開会の辞

9:40~10:25 一般演題 I 座長:池本正生(天理医療大学)

1) 質量分析装置を用いた病原細菌の迅速同定について

小松 方、近藤 明、松尾収二

天理医療大学医療学部

2) 医療従事者における臨床化学に関わる教育の深化の必要性

神崎秀嗣<sup>1) 2)</sup>、菅原良<sup>3)</sup>、藤田洋一<sup>4)</sup>、石田洋一<sup>5)</sup>

1) 京都大学ウイルス研究所細胞生物学部門 2) 大阪大学大学院医学研究科分子病態内科学 3) 北海道文教大学外国語学部国際言語学科 4) 京都保健衛生専門学校 5) 京都保健衛生専門学校臨床検査学科

3) PD-1 遺伝子の機能的多型及び発現強度と自己免疫性甲状腺疾患の病因

川端麻友美<sup>1)</sup>、渡邊幹夫<sup>1)</sup>、小林彩香<sup>1)</sup>、井上直哉<sup>1) 3)</sup>、日高洋<sup>2) 3)</sup>、岩谷良則<sup>1)</sup>

1)大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻生体情報科学講座、2)大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学講座、3)大阪大学医学部附属病院臨床検査部

4) CMV 定量 PCR 法の自家検査法の評価

藤山啓美<sup>1)2)</sup>、太田直孝<sup>1)2)</sup>、仲宗根出<sup>1)</sup>、佐野道孝<sup>1)</sup>、宮本恵宏<sup>2)3)</sup>

1)国立循環器病研究センター臨床検査部、2)国立循環器病研究センター臨床検査部遺伝子検査室、3)国立循環器病研究センター予防健診部

10:25~11:00 一般演題 II 座長:浅田高至(国立循環器病研究センター)

5) 生化学分析装置におけるトラブル(ピペティング不良)の新たな原因究明手順

猪田猛久、嶋田昌司、畑中徳子、岡山幸成、中村文彦

天理よろづ相談所病院 臨床病理部

6) BNP 測定における問題点(機種間での差異について)

原 克子<sup>1)</sup>、澤 夏海<sup>1)</sup>、小宮山 豊<sup>1) 2)</sup>、平城 均<sup>1)</sup>、正木浩哉<sup>1) 2)</sup>

1) 関西医科大学附属滝井病院 臨床検査部、2) 同 臨床検査医学講座

7) HPLC による分子量解析での BNP, Pro, NT-pro の濃度比較

澤 夏海<sup>1)</sup>、原 克子<sup>1)</sup>、小宮山 豊<sup>1) 2)</sup>、平城 均<sup>1)</sup>、正木 浩哉<sup>1) 2)</sup>

1) 関西医科大学附属滝井病院臨床検査部 2) 同 臨床検査医学講座

11:00~12:20 企業シンポジウム 司会:片山善章(神戸常盤大学)

上田一仁(市立芦屋病院)

1) 動脈硬化発症の予知マーカーsLOX-1, LAB, LOX-index 測定

内田景博(株式会社 バイオマーカーサイエンス)

2) 電気泳動法による脂質分画解析でここまでわかる

中里 功(株式会社 ヘレナ研究所)

3) アディポネクチンとメタボリックシンドローム

佐久間 誠(栄研化学株式会社)



### 疫学研究からみた循環器病のバイオマーカー

宮本恵宏<sup>1)</sup>、清水渉<sup>2)</sup>、斯波真理子<sup>3)</sup>

1) 国立循環器病研究センター 予防健診部、予防医学・疫学情報部

2) 国立循環器病研究センター 心臓血管内科

3) 国立循環器病研究センター 病態代謝部

バイオマーカーとは、正常状態での経過（変化）や病的状態での経過（変化）、あるいは治療に対する薬理学的な反応の指標として客観的に測定され評価される項目（事項）であると定義される。しかし、さまざまな役割をもって活用されており、バイオマーカーを理解する上で、その役割を考えることが重要である。例えば、心筋梗塞の診断に用いられる心臓トロポニン<sup>1</sup>は診断用バイオマーカーであるが、心不全の経過をみるにはBNP<sup>2</sup>などなどの重症度を判断するバイオマーカーが必要であり、将来の糖尿病性網膜症を予測するバイオマーカーとしてHbA1c<sup>3</sup>をとらえることもできる。また、単に血液中に測定されるものだけがバイオマーカーではなく、イメージング検査や血圧や心電図などの生理機能検査で測定され、定量されるものもバイオマーカーと考えることができる。

循環器病の予防や診断、治療をおこなうためには様々なバイオマーカーを必要とするが、その意義や役割を理解するためには根拠となるエビデンスが必要である。そのためにはコホート研究や横断研究、臨床試験が必要であり、その積み重ねがバイオマーカーの意義と役割の理解につながる。

日本は欧米に比べ脳血管疾患の死亡率の占める割合が高くリスク因子の影響が欧米と異なることから日本での循環器疾患の疫学研究が必要である。また、高血圧の治療の普及や平均血圧の減少は日本の脳血管疾患の低下をもたらしているが、脂質異常症や肥満、糖尿病などの増加が動脈硬化性疾患の発症を増加させていると考えられ、都市部での研究が重要であると考えられている。我々は1989年から、吹田市の住民基本台帳から年齢階級と性別に無作為抽出した30～79歳の6,485名を対象とした吹田研究をおこなっている。吹田研究は循環器病のリスクを解明する目的でおこなわれている日本では唯一の都市部におけるコホート研究であり、これまでに様々な古典的バイオマーカーである血圧や血糖値などの意義を明らかにしてきた。そこで、吹田研究を紹介しながらコホート研究の手法について紹介し、予後バイオマーカーの意義について述べる。

また、近年様々なイメージング検査がバイオマーカーとして、用いられているが、循環器病の発症リスクを予想するバイオマーカーとして冠動脈の石灰化スコアが用いられている。我々は、冠動脈CT検査による冠動脈内腔狭窄・動脈壁性状指標と関連する性別の危険因子を明らかにすることを目的とする全国規模のコホート研究であるNADESICO研究（Nationwide Gender-based Atherosclerosis Determinants Estimation and Ischemic Cardiovascular Disease Prospective Cohort Study）をおこなっている。本年3月末で症例登録が終了し、追跡が開始されるが、既に収集された症例に基づく横断研究を紹介しながらイメージングを活用したバイオマーカーについて述べたい。

最後に、有効で副作用の少ない治療をおこなうためには遺伝子情報をバイオマーカーとして活用することが有用である。国循で行われている致死性不整脈や家族性高コレステロール血症の遺伝子検査を紹介しながら、遺伝子検査のバイオマーカーとしての意義を紹介したい。

## 宮本恵宏 先生のご略歴

### 氏名

宮本 恵宏（みやもと よしひろ）

### 職務

国立循環器病研究センター 予防健診部長

国立循環器病研究センター 研究開発基盤センター 予防医学・疫学情報部長

国立循環器病研究センター バイオバンク副バンク長

### 略歴

平成元年 3月 京都大学医学部医学科卒業

平成元年 6月 京都大学医学部附属病院内科研修医

平成 2年 6月 静岡県立総合病院内科研修医

平成 4年 4月 京都大学医学部附属病院第二内科医員

平成 9年 3月 京都大学大学院医学研究科博士課程修了

平成 12年 12月 国立循環器病センター動脈硬化代謝内科医員

平成 17年 11月 国立循環器病センター動脈硬化代謝内科医長

国立循環器病センター臨床研究開発部医長（併任）

平成 22年 10月 国立循環器病研究センター予防健診部長

同 研究開発基盤センター予防医学・疫学情報部長（併任）

平成 24年 4月 国立循環器病研究センターバイオバンク副バンク長（併任）

### 所属学会

日本内分泌学会代議員、日本心血管内分泌代謝学会評議員、日本肥満学会評議員、日本糖尿病学会評議員、日本内科学会評議員、日本性差医学・医療学会評議員

### 教育活動

京都大学医学部非常勤講師、滋賀医科大学客員教授、東北大学大学院客員教授

### 社会活動

大阪府循環器疾患予防推進協議会委員、吹田市健康づくり推進事業団理事、日本心臓血管医療フォーラム理事

### 動脈硬化性疾患と血栓症（微小循環恒常性における影響）

山下 勉

神戸学院大学 栄養学部 臨床検査学部門 臨床検査学研究室

#### 【はじめに】

微小循環の恒常性維持には様々な因子、メカニズムが関与している。微小循環の恒常性破たんは血栓症につながり、動脈硬化性病変においてはこの微小循環が障害を受けることが報告されている。動脈硬化性病変の発症進展また、血栓形成に関与する要因は活性酸素種 (ROS) をはじめとして種々報告され注目されている。

今回はこれら微小循環の恒常性に影響する因子として ROS 並びに一酸化窒素 (NO)、血栓形成に直接的に関与するトロンビンの作用並びに抗血小板剤としてのアスピリンの動脈硬化性病変の発症、進展への影響と微小循環への影響を調べた成績を紹介させていただく。

#### 【方法】

インビトロにおける微小循環の評価は生物顕微鏡に共焦点レーザーキャナー、ピエゾ、EMCCD カメラを組み込んだ Bioimaging モデルを用いて観察を行った。血栓形成は He-Ne レーザーを Bioimaging モデルに導入し、顕微鏡下で血栓を形成させて評価を行った。動脈硬化性病変の進展は LDL 受容体とアポ-E タンパクを欠損したダブルノックアウトマウスを用いて、心臓から大腿動脈までの血管を取り出し、Enter Aouter 法にて評価を行った。免疫染色はクリオスタットで切り出した Cross Section 標本を用いた。

#### 【結果】

1) NO に対する特異的な蛍光プローブを用いることにより腸間膜微小血管の走行に一致した NO 由来の蛍光を捉えることができ、微小循環恒常性維持に NO が持続的に放出されていることを認めた。ROS をラジカルスカベンジャーで消去することによりこの蛍光が増強することから、ROS が自発的な NO 放出を阻止するものと考えられた。

2) 高脂肪食 (Warfarin:167  $\mu$ g/kg/day 含有) で飼育した動脈硬化発症マウスの動脈硬化進展度は Placebo 群と比較し有意に抑制された。プラーク近傍部位において、内皮細胞に eNOS、LOX の発現を認め、プラーク全体に iNOS の発現、並びに PAR-1 発現を認めた。トロンビン関連酵素阻害は動脈硬化発症進展を阻止するものと考えられた。

3) アスピリンの少量投与により動脈硬化進展は Placebo 群と比較して有意に抑制され。また、アセチルコリン惹起性の NO 放出量は有意に増加した。これは eNOS 発現の増強と一致し、アスピリン少量投与が動脈硬化性病変進行と血栓形成を抑制すると考えられた。

#### 【結語】

これら成績は、動脈硬化性病変の発症、進展を抑制する種々因子は、総合的には微小循環の恒常性維持をもたらして血栓形成を抑制すると考えられた。

### 質量分析装置を用いた病原細菌の迅速同定の精度向上のための工夫

小松 方、近藤 明、松尾収二

天理医療大学 医療学部 臨床検査学科

#### 【はじめに】

新しい細菌同定手法である matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)を用いて、尿や血液培養から迅速に細菌を検出する方法が報告されている。今回我々は、尿中に含まれる病原細菌を直接同定する目的で、生体内の細胞と細菌をセルロースフィルターで分画し、検体提出から 30 分以内に同定する手法の開発を試みた。

#### 【対象および方法】

測定機器は MALDI Biotyper Ver. 3.0 (Bruker Daltonik)を使用した。検出感度の検定は *E. coli* ATCC25922 を使用した。臨床検体は膿尿かつグラム染色で細菌を確認した 59 件 (単独菌感染のみ) を使用した。尿中炎症細胞と細菌分画の分離は低遠心法と、今回我々が独自に作成したフィルター法の 2 法を検討した。尿は両方とも 4ml を使用した。低遠心法は尿を 2000 g、30 秒間遠心後、上清を 15000g、5 分間遠心し、沈渣をイオン交換水で洗浄した。フィルター法は孔径 5.00  $\mu$ m のセルロースフィルター (Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany) に尿を通過させてヒト由来細胞を除去し、その濾液を回収し、15000g、5 分間遠心後、その沈渣をイオン交換水で洗浄した。抽出後の細菌分画は両方法とも 75% エタノールで洗浄、ギ酸-アセトニトリル抽出法を実施し、MALDI-TOF MS を行った。両方法の成績は、分離培養法で分離した株の MALDI-TOF MS の同定結果と比較した。

#### 【結果および考察】

MALDI-TOF MS の検出感度は尿 1mL あたり 106CFU であった。尿 59 件のうち、MALDI-TOF MS を用いた分離株の同定は、グラム陰性桿菌で 44 株、グラム陽性球菌で 15 株同定された。尿を用いた MALDI-TOF MS では、species-level で同定 (score $\geq$ 2.000) され分離株の同定菌名と一致したのは、グラム陰性菌で低遠心法 73% (32/44)、フィルター法 77% (34/44) であり、グラム陽性菌で低遠心法 20% (3/15)、フィルター法 13% (2/15) であった。同様に、Genus-level (score1.7~1.999) での一致は、グラム陰性菌で低遠心法 84% (37/44)、フィルター法 89% (39/44) であり、グラム陽性菌で低遠心法 73% (11/15)、フィルター法 33% (5/15) であった。フィルター法は尿を直接濾過するだけで細菌分画を抽出でき操作方法は極めて簡便であり、低遠心法と同等の成績を示した。しかし、グラム陽性菌の中で過剰にクラスターや連鎖形成をする細菌フィルターを通過しないことや、低遠心で一部沈殿することからグラム陰性菌と比較して同定精度は不良であった。改良としてクラスターや連鎖形成を壊す操作の追加が必要であると考えられた。

【まとめ】我々が考案したフィルター法は低遠心法と比較して、より簡便で短時間に処理を行う事が可能であった。今回考案した方法はさらに改良する必要があるが、新しい感染症迅速診断法として位置づけられる新手法となると判断した。

### 医療従事者における臨床化学に関わる教育の深化の必要性

神崎秀嗣<sup>1) 2)</sup>、菅原良<sup>3)</sup>、藤田洋一<sup>4)</sup>、石田洋一<sup>5)</sup>

1) 京都大学ウイルス研究所細胞生物学部門 2) 大阪大学大学院医学研究科分子病態内科学  
3) 北海道文教大学外国語学部国際言語学科 4) 京都保健衛生専門学校 5) 京都保健衛生専門学校臨床検査学科

#### 【はじめに】

第一筆者は、臨床検査技師養成校において化学<sup>1)</sup>、数学、生化学、情報科学<sup>2)</sup>、遺伝子検査学<sup>3)</sup>教育に携わっているが、学生の数学、化学、ICTの知識の欠落に驚くことが多い。ゆとり教育の影響と思われるが、数学や化学に全く興味を持たない学生も少なくない。このような状況では、社会人全体の数学力の低下が否めず、社会人向けのリメディアル教育も必要であろう。医療従事者としてのみならず、一社会人として社会生活を行う上で必要な「割合や割引率」等を求めるなどの数学力の低下が顕著である。

#### 【ICTリメディアルの必要性】

スマートフォン、タブレットは医療現場にも使用され始めており、インフォームドコンセント<sup>4)</sup>には便利である。医師が病室を訪れなくても、検査結果を患者に分かりやすく説明することが出来る。また医療従事者が集まらなくても意見交換が可能である。また音声エージェントが今年になって急速に発達したことによって、それまでは困難であった音声インターフェイスが実用可能になっており、医療従事者の教育や現場の医療従事者の研修、医療現場や介護の場面でも有用であることが明らかになってきている。染色体遺伝子検査、臨床化学の基礎となる科目への適用も期待される。ただし、現場の医療従事者や教職員がこのような新しい技術を使いこなせるようになるためには、教える方に様々なストレスがかかり、時間もかかる。また導入に際して抵抗を受けることも考えられる。学生だけでなく、現場の医療従事者や教職員が受け入れやすく、容易に使いこなせるようにするためのリメディアル教育プログラムが必要であろう。

近時、染色体遺伝子検査、臨床化学に対応したアプリケーションソフトも供与されている。演者は急速に進んでいるICT化、英語化の染色体遺伝子検査、臨床化学への対応と幾つかの試みを紹介する。

#### 【参考文献】

- (1) Kohzaki, H. : "A proposal of chemistry education for medical technologist/paramedics in Japan." *Chemical Education Journal* 14, 3, 2011.  
(<http://chem.sci.utsunomiya-u.ac.jp/v14n1/kohzaki/kohzaki.html>)
- (2) 神崎秀嗣、菅原良：臨床検査技師養成における ICT リテラシー教育の問題点と提言、*Computer & Education*, 33, 104-105, 2012.
- (3) 神崎秀嗣：“臨床検査技師養成過程における染色体遺伝子検査学教育と臨床検査技師国家試験問題に対する一提言。”、日本染色体遺伝子検査学会誌、30, 68-74, 2012.
- (4) Kohzaki H. : "A proposal regarding English education at schools to train paramedics/medical technologists in Japan." , *J.Med.English Edu.*, 11(1), 7-14. 2012.

### PD-1 遺伝子の機能的多型及び発現強度と自己免疫性甲状腺疾患の病因・病態との関連

川端麻友美<sup>1)</sup>、渡邊幹夫<sup>1)</sup>、小林彩香<sup>1)</sup>、井上直哉<sup>1) 3)</sup>、日高洋<sup>2) 3)</sup>、岩谷良則<sup>1)</sup>

1) 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻生体情報科学講座、2) 大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学講座、3) 大阪大学医学部附属病院臨床検査部

#### 【背景と目的】

T細胞上の programmed cell death 1 (PD-1) 分子は、抗原提示細胞上の PD-1 ligand 1 (PD-L1) 及び PD-L2 と結合することにより、T細胞の炎症性サイトカイン産生は抑制され、アポトーシスが誘導される。本研究では、自己免疫性甲状腺疾患の病因・病態と PD-1 遺伝子 (*PDCD1*) -606G/A 及び +7558C/T 多型との関連を解析し、さらに抑制性及びエフェクターT細胞の細胞表面と細胞内の PD-1 発現との関係を調べた。

#### 【対象と方法】

甲状腺マイクロゾーム抗体 (McAb) またはサイログロブリン抗体 (TgAb) 陽性で、50歳未満で甲状腺低下症を発症し、甲状腺ホルモン剤を内服している橋本病患者を重症群とし、50歳以上でも未治療で甲状腺機能が正常である患者を橋本病軽症群とした。TSH レセプター抗体 (TRAb) 陽性で甲状腺中毒症を発症した病歴を持つバセドウ病患者で、5年以上抗甲状腺剤治療で FT3、FT4、TSH が正常にコントロールされていても、TRAb が陽性で投薬が中止できないものを難治群とし、TRAb が陰性化し、投薬中止後2年以上甲状腺機能が正常のものを寛解群とした。ゲノタイピングは、末梢血単核球から抽出したゲノムDNAを用いて PCR-RFLP 法で行った。さらに末梢血 CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> 制御性 T細胞 と CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> エフェクターT細胞における PD-1 発現比率と強度をフローサイトメトリーで解析した。

#### 【結果】

*PDCD1* -606AA 及び +7558 TT ゲノタイプの頻度は、橋本病及びバセドウ病と健常人の間には差がなかったが、橋本病重症群で軽症群に比べて高かった。*PDCD1* -606AA ゲノタイプの個体では、エフェクターT細胞の細胞質内及び細胞表面 PD-1 陽性細胞比率が低下し、-606A キャリアーの個体では、制御性 T細胞における細胞内 PD-1 陽性細胞比率が低下していた。一方バセドウ病難治群はバセドウ病寛解群よりもエフェクターT細胞における細胞表面 PD-1 陽性比率と細胞内 PD-1 発現強度が高かった。

#### 【結語】

橋本病の重症群では *PDCD1* -606AA ゲノタイプが多く、抑制性及びエフェクターT細胞の PD-1 発現が低下していたが、バセドウ病難治群ではエフェクターT細胞における PD-1 発現が高かった。

CMV 定量 PCR 法の自家検査法の評価

藤山啓美<sup>1)2)</sup>、太田直孝<sup>1)2)</sup>、仲宗根出<sup>1)</sup>、佐野道孝<sup>1)</sup>、宮本恵宏<sup>2)3)</sup>

1) 国立循環器病研究センター臨床検査部、2) 国立循環器病研究センター臨床検査部遺伝子検査室、3) 国立循環器病研究センター予防健診部

【目的】

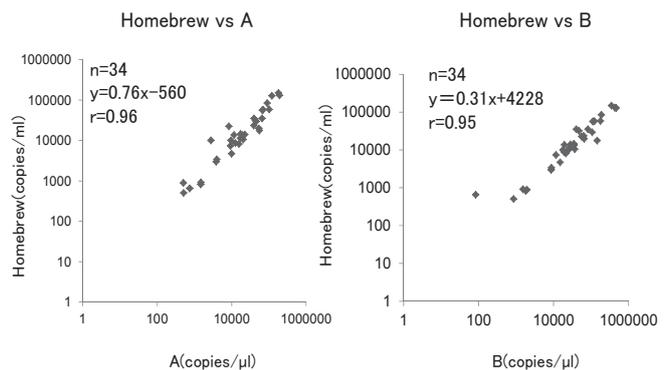
臓器移植患者におけるサイトメガロウイルス（以下 CMV）感染症は、移植の予後を左右する感染症の 1 つである。我が国の成人の CMV 抗体陽性率は高く、臓器移植後には免疫抑制化にドナー、レシピエント、輸血由来の CMV が再活性化され、重篤な感染症に至る可能性が高く、顕性化前の早期診断・治療が重要である。

当センターでは心臓移植後患者および CMV 感染症が疑われた患者に対して定量 PCR 法を用いた CMV DNA 定量値モニタリングを行い、CMV DNA が検出された場合、抗原血症検査である Antigenemia 法により CMV 抗原の確認を行っている。近年、定量 PCR 法の有用性が明らかになってきたが、自施設で設計したもので行われていることが多く、市販されているものも標準化されていないのが現状である。今回我々は、自家検査法 (Homebrew) と市販試薬セットを用いた方法を比較し、標準化の可能性を検討したので報告する。

【方法】対象として、当センター心臓移植患者 8 名より抽出した 34 名の DNA および市販の基準物質 CMV AD169 quantitated DNA PCR control (ADVANCED BIOTECHNOLOGIES INC 社; AD169) を用いた。(7, 70, 700, 7000 の 4 濃度)。試薬は Homebrew と市販試薬セット A,B の 3 種類を使用し、TaqMan 法にて CMV コピー数を測定した。測定機器として 7900HT Fast RealTime PCR System (Applied Biosystems 社) を用いた。

【結果】Homebrew 法、A 法、B 法の試薬を用いて AD169 の 4 濃度の試料について測定した結果、AD169 の表示値に対するそれぞれの回帰式は、Homebrew 法;  $y=0.93x-23$ 、A 法;  $y=0.21x+15$ 、B 法;  $y=0.22x+69$  であった。CMV 陽性の患者検体を測定した結果、Homebrew 法と A 法では相関係数  $r=0.96$ 、Homebrew 法と B 法では  $r=0.95$  となり、良好な相関性が認められた。心臓移植後に CMV 陽性を認めた症例にお

患者検体を用いた試薬A,Bとの相関性



いて、それぞれの経時的変化について比較検討を行った結果、同様の推移を示していた。

【結語】Home-brew 法は試薬 A 法、B 法と同等の有用性が認められた。標準化の可能性については、標準物質の必要性が示唆されたが、その他の要因について（試薬のデザイン等）、更なる検討が必要と考えられた。

### 生化学分析装置におけるトラブル（ピペティング不良）の新たな原因究明手順

猪田猛久、嶋田昌司、畑中徳子、岡山幸成、中村文彦  
天理よろづ相談所病院 臨床病理部

現在生化学自動分析装置の多くはピペッター方式の分析装置が普及している。従ってサンプルノズル、試薬ノズル、光源ランプ等が共通であり、一旦トラブルが生じた場合、自動分析装置の原因究明に苦勞するのが現状である。今回比較的高頻度に起こる場合（ピペティング不良）の原因究明手順を考案したので報告する。

#### 【装置および方法】

分析装置は日立 7600 形自動分析装置とし、項目は ALT および試料はプール血清とした。吸光度波長は第 1 反応液では 415nm、第 2 反応液では 340nm を用いた。以下に吸光度の測定方法を述べる。

- 1) 第 1 反応液吸光度 (R1ab) は第 1 試薬 (R1) 添加 5 分とした。試薬ブランクの吸光度を差し引き、補正された吸光度とした。
- 2) 第 2 反応液吸光度 (R2ab $\Delta$ ) は第 2 試薬 (R2) 添加 36 秒後の吸光度 (吸光度の低下) から容量補正した R1 添加 5 分後の吸光度 (340nm) の差とした。

検討方法は、サンプル、R1 および R2 の規定量はそれぞれ  $8\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$  および  $80\mu\text{l}$  とし、ピペティング不良条件としてサンプル量では  $2\sim 8\mu\text{l}$  (R1, R2 は規定量, 以下同様)、R1 量では  $40\sim 200\mu\text{l}$  および R2 量では  $40\sim 80\mu\text{l}$  それぞれ変えてプール血清 (n=20) を測定した。判定は規定量を基準に  $\pm 3\text{SD}$  から外れた場合、ピペティング不良を疑うこととした。

#### 【結果および考察】

規定量における試料 (n=20) の R1ab および R2ab $\Delta$  はそれぞれ平均吸光度 0.0399, SD 0.0006 (415nm) および 0.179 (SD 0.0007) であった。

次に R1ab を求めた場合のピペティング不良条件として、サンプル量を  $6\mu\text{l}$  (R1ab) とすると 0.030 (SD 0.0004) および R1 を  $160\mu\text{l}$  (R1ab) とすると 0.051 (SD 0.0005) となった。

2 条件とも規定量における R1ab  $\pm 3\text{SD}$  から外れ区別された。

R2ab $\Delta$  は NADH の吸光度 (340nm) の変動が R1 量または R2 量に依存していることに基づいて評価した。R2ab $\Delta$  を求めた場合のピペティング不良条件として、R1 量を  $160\mu\text{l}$  (R2ab $\Delta$ ) とすると 0.162 (SD 0.0013) および R2 量を  $70\mu\text{l}$  (R2ab $\Delta$ ) とすると 0.188 (SD 0.0012) となった。

2 条件とも規定量における R2ab $\Delta$   $\pm 3\text{SD}$  から外れ区別された。サンプル量を変えた場合 (R1, R2 量は規定量) では R2 から R1 の吸光度を差し引くためサンプルの吸光度の影響は認められなかった。

このようにサンプル量または R1 量の異常が生じたとき R1ab をチェックすることで検出できる。R2ab $\Delta$  から R1 量または R2 量の異常が検出できる。さらに、R1ab と R2ab $\Delta$  異常の組合せによって、サンプル量、R1 量および R2 量異常を判別することが可能であった。

従って日頃管理試料の R1ab および R2ab $\Delta$  を管理し、管理試料の測定値が管理外となった時はまずタイムコースを確認し反応槽や光源ランプの異常を確認する。タイムコースで異常が認めなければ管理試料で R1ab および R2ab $\Delta$  をチェックすることで、サンプリング、R1 または R2 のいずれの異常かを検出できると考えられる。

#### 【まとめ】

反応液の R1ab および R2ab $\Delta$  によるピペティング不良の判定方法を報告した。日頃管理試料の R1ab および R2ab $\Delta$  を管理しておき、トラブル時、まずタイムコースを確認し、異常を認めなければ管理試料で R1ab および R2ab $\Delta$  をチェックすることで、ピペティングのどの部位の不良かを判別可能であることを示した。

### BNP 測定における問題点 ～機種間差と測定系の蛋白濃度～

原 克子<sup>1)</sup>、澤 夏海<sup>1)</sup>、小宮山 豊<sup>1),2)</sup>、平城 均<sup>1)</sup>、正木浩哉<sup>1),2)</sup>

1) 関西医科大学附属滝井病院 臨床検査部、2) 同 臨床検査医学講座

#### 【はじめに】

BNP と N 末端 proBNP (NT-proBNP) は心筋ストレスマーカーであり、負荷がかかると心筋細胞内で proBNP が産生され、血中分泌過程で NT-proBNP と BNP に分裂し 1:1 の比で離脱するが、負荷が大きければ proBNP も血中に放出する。BNP の測定原理では C 端と冠状部分にそれぞれ抗体を結合し検出するため、N 端長に関係なく BNP として認識し、BNP と proBNP を検出する。また NT-proBNP の測定系も、抗体認識部位に糖鎖結合していると正しく測定できないとの報告がある。国産の BNP 測定試薬は共に同一の抗体 (塩野義) を用いているが、パースファスト BNP 測定試薬 (三菱化学メディエンス: 以下 M) が、E テスト「TOSOH」II BNP (東ソー: 以下 T) に比べ高値傾向にある。一方、欧米のアボット社の測定系は認識部位の異なる抗体 (ハイサイト) を用い低値傾向と報告されている。

今回私達はその原因について、校正剤と標準液の蛋白濃度に着目し、種々の検討を行い、知見を得た。

#### 【対象と方法】

対象は、パースファスト BNP 測定用校正剤 1, 2, コントロール、E テスト「TOSOH」II BNP 標準品、ARCHITECT BNP-JP 標準品 (アボットジャパン: 以下 A), エルシス試薬 NT-proBNP II 標準品 (ロシュタ イグノスティクス, 以下 R) と、当院で BNP 依頼の患者 13 検体を用いた。測定は上記校正剤および各標準品に該当試薬を用いた。測定機器は、M: PATHFAST, T: AIA-360, A: ARCHITECT i2000SR。方法は、M の校正剤 2 とコントロールおよび検体で、各々の蛋白濃度 (TP) を変化させ測定値を比較し、検体は相互比較した。蛋白濃度変化は、校正剤 1 と M 希釈液 (生食) と 5%BSA/PBS および人アルブミン (シグマ) を用いた。尚 5%BSA/PBS は、測定に影響を認めなかった。

#### 【結果】

校正剤と各標準品の蛋白濃度は、M: 1, 2 共に 2.4g/dl, T: 4.1, A: 1.9, R: 5.8 と差を認めた。M のコントロール (BNP 767pg/ml) を、M 希釈液で TP 0.6g/dl とした値は 323 pg/ml、5%BSA/PBS で TP 4.5 では 572 と低値を認めた。

M 校正剤 2 (1922 pg/ml) を、人アルブミンで TP 6.7g/dl にすると 1478 を示した。TP 6.5g/dl の検体 (M: 1286pg/ml, T: 1294) を M 希釈液で TP 1.6g/dl とした値は、M: 982, T: 1159、また、5%BSA/PBS で TP 5.4 とすると、M: 788pg/ml, T: 1092 を示した。

12 検体 (TP 6.8-7.4g/dl) の M と T の相関関係は、 $y=0.74X-0.35$  であったが、M のみ検体を希釈液で 2 倍希釈 (TP 3.4-3.7g/dl) すると、 $y=0.93X-0.87$  と相関は良好化した。

#### 【まとめ】

以上から、私達は M 社が高値を示すことに、校正剤と標準品の蛋白濃度と値付けに関与していると考え M 社に提示したが否定的であり、希釈液を蛋白溶液に変更するとの報告であった。現在、反応性の違いについても検討を進めている。

### HPLCによる分子量解析でのBNP、pro、NT-proの濃度比較

澤 夏海<sup>1)</sup>、原 克子<sup>1)</sup>、小宮山 豊<sup>1),2)</sup>、平城 均<sup>1)</sup>、正木 浩哉<sup>1),2)</sup>

1) 関西医科大学附属滝井病院臨床検査部 2) 同 臨床検査医学講座

#### 【目的】

Brain Natriuretic Peptide (BNP) の測定値に差異が生じる原因の一つに反応性の違いがあると考え、proBNP, NT-proBNP, BNP を HPLC で分子量 (MW) 別に分取して各々の解析を試みた。

#### 【方法と対象】

対象は、当院で BNP 測定依頼があった高値患者 17 検体 (139 pg/ml ~ 6310 pg/ml) とした。HPLC での各 MW 溶出時間の確認には、シグマ社の L-BNP トリフルオロacetate 塩 (MW: 3200, 溶出時間: 26 分), アプロチニン (6500, 20 分), リゾチム (14300, 10 分) を用いた。

各検体の抽出と濃縮には、MonoSpinC18 (ジエールサイエンス社) を使用し、2-プロパノール / 0.1% TFA (80:20) で溶出した各試料を減圧乾固後、0.1% TFA で溶解し HPLC で MW 別にピークを分取した。分析条件は、溶離液: 0.6M リン酸 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ) + 0.5N NaCl (pH 7.0), カラム: GS-220HQ7.5mm I.D. × 300mmL, 波長: 210nm, 流速: 0.4ml/min, 温度: 40°C とした。

MW 別に分取した試料は減圧乾固後、全試料を同一量の 5% BSA/PBS で溶解した。12 分に溶出したピークは proBNP (MW: 11930, 以下 A), 16 分は NT-proBNP (8460, 以下 B), 27 分は BNP (3470, 以下 C) を含むと考え、A, B, C の BNP を PATHFAST (三菱化学メディアエンス, 以下 M 社) と AIA-360 (東洋, 以下 T 社) で、NT-proBNP をモジュラーアナリティクス (ロシュダイアグノスティクス, 以下 R 社) で測定した。

試薬はパースファースト BNP, E テスト「TOSOH」II BNP, エクルス試薬 NT-proBNP II を使用した。尚、A, B, C で得られた BNP, NT-proBNP の値は合計値を 100% として、A, B, C の占める割合を % 表示で比較した。

#### 【結果】

MW が異なる A, B, C 共に BNP, NT-ProBNP の測定値が得られた。BNP 4930 pg/ml の症例 1 での各比率は、M 社: A 51.3%, B 40.2, C 9.5, T 社: A 50.2%, B 31.2, C 18.6 を示した。

BNP 735pg/ml の症例 2 では、M 社: A 47.3%, B 36.2, C 16.5, T 社: A 31.3%, B 33.7, C 35.0 を示した。また R 社の NT-proBNP では、症例 1: A 88.9%, B 9.2, C 1.9、症例 2: A 91.7%, B 5.6, C 2.8 であった。

M 社, T 社共に BNP を含む C 比率は A, B に比べ低いが、M 社の C 比率は T 社の約 1/2 を示し、A, B が T 社より高比率であった。R 社では A 比率が約 90% を示した。

#### 【まとめ】

BNP, NT-proBNP の測定試薬は、認識部位が存在すると分子量に関わらず値を認めた。特に proBNP 比率が多く、BNP 高値症例では多量の proBNP が存在していると思われる。また、M 社は T 社に比べ、分子量が大きい proBNP や NT-proBNP との反応性が高い傾向にあった。これが測定値の差異の一つの要因と示唆される。

今後さらに臨床症例を対象として経過推移も踏まえて解析を進めたい。