

研究

IMMULITE2000XPi による
ACTH 測定法の基礎的検討

錦織昌明, 森田明子, 小笠原愛, 佐野菜穂, 岩田祐紀, 北尾政光, 内田 靖

松江赤十字病院検査部

Evaluation of the Reagent "SIEMENS・IMMULYZE ACTH II"

by IMMULITE2000XPi Immunoassay System

要旨

化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) を原理とするシーメンス・イムライズ ACTH II を試薬とし, その専用機器である IMMULITE2000XPi による血漿中 ACTH 測定法について日常検査導入を目的に基礎的実験を行った。

今回の基礎的検討の結果は概ね良好であった。しかし, 比較対照法との相関で数例の乖離例を認めた。また, 全体的な相関性は良好であるが, バラツキも認められ, 使用抗体, 標準物質等の差によるものと思われた。また, 溶血による負誤差を認めたため, 測定に際しては溶血検体に注意を要すべきと考えた。

Masaaki nishikori, et al : ISSN 1343-2311 Nisseki Kensa 47 : 20—24,2014(2013.11.30 受理)

KEYWORDS

副腎皮質刺激ホルモン(ACTH), 化学発光酵素免疫測定法(CLEIA),
シーメンス・イムライズ ACTH II IMMULITE2000XPi

はじめに

副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) は 39 個のアミノ酸からなるポリペプチドで, 下垂体前葉から分泌され, その合成・分泌は主に視床下部から分泌される副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) により調節される。ACTH はすべての副腎皮質ホルモンの分泌を促進することから, 血漿中 ACTH の測定はコルチゾールとともに視床下部—下垂体—副腎皮質系の機能および病態の診断に不可欠である¹⁾。

今回, 化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) を原理とするシーメンス・イムライズ ACTH II を試薬とし, その専用機器である IMMULITE2000XPi による血漿中 ACTH 測定法について日常検査への導入を目的に基礎的実験を行ったので報告する。

【機器・試薬および材料】

1. 機器・試薬

1) CLEIA 法 (以下, 本法)

- 機器: 化学発光酵素免疫測定装置
IMMULITE2000XPi
(シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス)
- 試薬: シーメンス・イムライズ ACTH II
(シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス)

2) 比較対照法

ECLIA 法 (BML に依頼)

2. 試料

今回の実験には 2013 年 2 月 1 日～2013 年 3 月 27 日における当院外来受診患者および入院加療中患者より採取された EDTA2K 加血漿【採血管: インセパック II (SEKISUI)】を試料として用いた。また, 保存を要する場合には 20℃で凍結保存して 30 日以内²⁾に実験に供した。

3. その他

- 干渉チェック・A プラス (シスメックス)
- コントロール試料 [2 濃度]
(シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス)
- マルチ検体希釈液 2
(シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス)

- インセパック II EDTA2K 2ml 用
(SEKISUI)
- ベノジェクト II EDTA2Na 2ml 用
(テルモ)

【測定原理】

本法はビーズを固相とした2ステップサンドイッチ法に基づく化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)である。

検体中の ACTH は、ビーズに固相化した抗 ACTH マウスモノクローナル抗体と反応し複合体を形成する。洗浄後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗 ACTH ウサギポリクローナル抗体を加えると、2種の抗体で挟まれたサンドイッチ状の複合体が形成される。さらに洗浄後、4-メトキシ-4-(3-ホスフェートフェニル) -スピロ-(1,2-ジオキセタン-3,2'-アダマンタン) (PPD) を加えると PPD は複合体の ALP により加水分解されて発光する。この発光量を測定し、あらかじめ作成した検量線から検体中の ACTH 濃度を求めるものである。

	pooled plasma	
	sample 1	sample 2
1	7.6	205
2	8.3	207
3	8.5	219
4	7.8	200
5	7.7	219
6	7.8	208
7	8.2	216
8	8.0	195
9	7.6	202
10	8.4	208
mean (pg/ml)	7.99	207.9
SD (pg/ml)	0.34	8.1
CV (%)	4.3	3.9

(表 1 同時再現性)

【方法および結果】

1. 同時再現性

2 濃度のプール血漿を用いてそれぞれ 10 回同時測定により同時再現性を求めた。その結果 CV3.9~4.3%と良好であった。(表 1)

2. 日差再現性およびキャリブレーション後の安定性

凍結保存しておいた 2 濃度のコントロール試料および 1 濃度のプール血漿を 30 日間のうち 10 回測定した。この時、実験初日のみキャリブレーションを実施した。

測定結果は CV2.8~6.0%と良好であった。この間、コントロール試料はメーカー指定の許容範囲(図中破線)内の値であり、プール血漿においても一定の傾向を認めることなく安定していた。(表 2, 図 1)

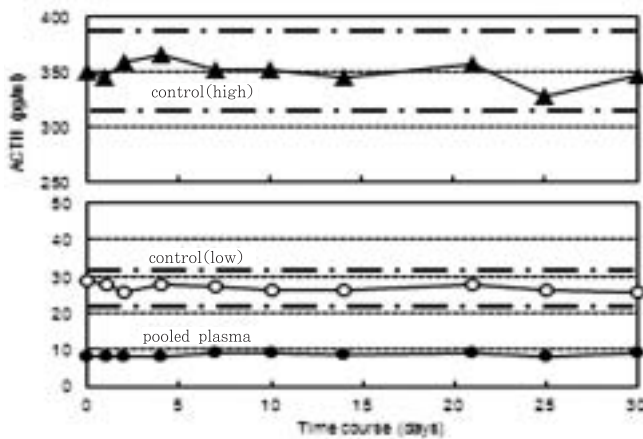
3. 希釈直線性

2 濃度のプール血漿を段階的に希釈して測定した。この時、取扱説明書に従いマルチ検体希釈液 2 を 2.5 倍に精製水で希釈した溶液を検体希釈液として用いた。

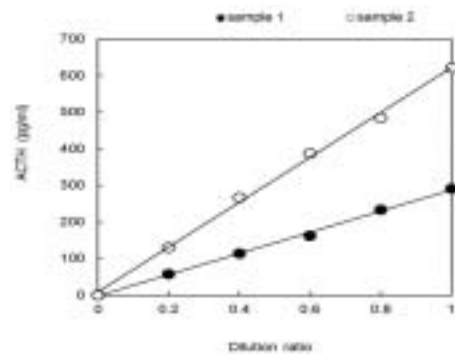
その結果、原点に収束する良好な直線性を認めた。(図 2)

after the calibration (days)	control samples		pooled plasma
	low	high	
0	29.0	349	8.0
1	28.0	345	7.9
2	25.5	358	8.3
4	27.7	365	8.2
7	27.1	351	8.9
10	26.3	351	9.2
14	26.0	344	8.5
21	27.8	357	9.2
25	26.2	328	8.0
30	25.5	347	9.0
n	10	10	10
mean (pg/ml)	26.91	349.5	8.52
SD (pg/ml)	1.19	9.96	0.51
CV (%)	4.4	2.8	6.0

(表 2 日差再現性)



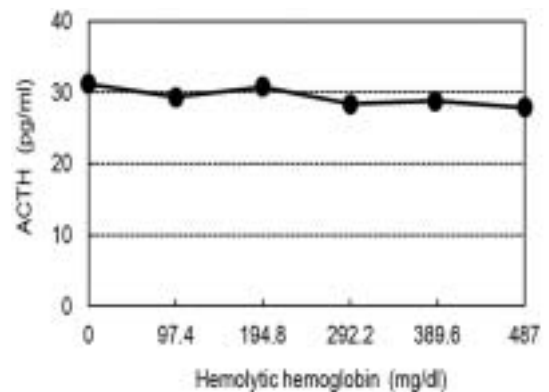
(図1 日差再現性 [キャリブレーション後の安定性])



(図2 希釈直線性)

4. 共存物質による影響

プール血漿に干渉チェック・A プラスを9:1の割合に添加して測定した。添加した最高濃度は非抱合型ビリルビン: 18.3mg/dl, 抱合型ビリルビン: 20.6mg/dl, 溶血ヘモグロビン: 487mg/dl および乳び: 1420 ホルマジン濁度数とした。その結果, 今回の添加濃度範囲ではいずれも概ね影響を認めなかった。(図3)



(図3 溶血ヘモグロビンの影響 [干渉チェック使用])

5. EDTA2K と EDTA2Na 含有採血管を用いた溶血影響の比較

実験4における干渉チェックの溶血ヘモグロビン添加実験結果は同じ試薬・機器を用いた水本らの報告³⁾と明らかに異なっていた。

	EDTA 2 K		EDTA 2 Na	
	added physiological saline solution	added hemolytic solution	added physiological saline solution	added hemolytic solution
	ACTH (pg/ml)	ACTH (pg/ml)	ACTH (pg/ml)	ACTH (pg/ml)
case 1	15.0	13.1 (87.3%)	15.6	12.8 (82.1%)
case 2	22.1	19.0 (86.0%)	22.1	19.7 (89.1%)
case 3	20.5	14.2 (69.3%)	20.3	15.6 (76.8%)

(added hemolytic solution/added physiological saline solution × 100)

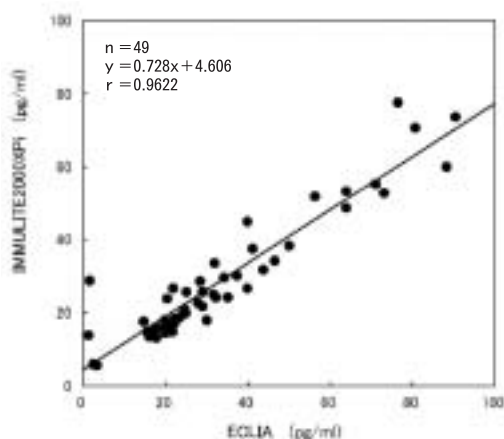
(表3 溶血の影響 [抗凝固剤による比較])

すなわち、干渉チェックを用いた水本らの報告では500mg/dlの溶血ヘモグロビン添加により-46.9%の負誤差を認めていた。両実験の違いは採血管に含まれる抗凝固剤の違いだけであった。そこで、EDTA2K【インセパックⅡ(SEKISUI)】とEDTA2Na【ベノジェクトⅡ(テルモ)】を含有する2種類の採血管を用いて溶血影響を比較した。3人の検査部職員ボランティアについて同時に2種類の採血管で採血し、遠心分離後の血漿をそれぞれ500 μ lずつ2本に分注した。そして、残った血球部分を凍結融解して溶血液を作成した。血漿500 μ lに対し生理食塩水を10 μ l添加したものを対照とし、もう一方の血漿500 μ l

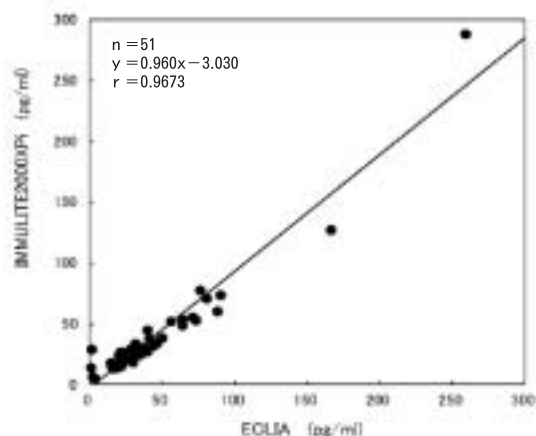
には溶血液を10 μ l添加（最終ヘモグロビン濃度は約400mg/dlとなる）してから両試料ともに30分間室温放置後に測定した。その結果、どちらの採血管においても溶血液を添加した方のACTH値が約20~30%程度低下した。（表3）

6. 比較対照法との相関

51例の患者血漿を用いて本法と比較対照法との相関関係を求めた。その結果、100pg/ml以下の低濃度域では本法がやや低値傾向を認めた。（図4）全体的な相関関係は概ね良好であったが、バラツキも認められ、30%以上の差を認める例が散見された。（図5）



（図4 比較対照法との相関（100pg/ml以下））



（図5 比較対照法との相関（全症例））

【まとめ】

今回の基礎的検討の結果は、再現性、安定性および希釈試験などにおいて概ね良好であった。比較対照法との相関では、数例の乖離例を認めた。また、全体的な相関性は良好であるもののバラツキも認められた。他法との相関において今回と同様な傾向が報告されており、標準物質が統一されていないことや使用する抗体の違い、あるいは高分子型ACTHに対する反応性の違いなどが原因であると指摘している^{3,4)}。

溶血の影響については、同じ試薬・機器を用いた水本らの報告³⁾で、干渉チェック・A

プラスの500mg/dl溶血ヘモグロビン添加実験で-46.9%の明らかな負誤差を認め、この現象は赤血球由来のプロテアーゼによる分解に起因するとしている。

今回の結果では干渉チェック・Aプラスの溶血ヘモグロビン487mg/dlまで添加したが、最大-3%程度の誤差であった。両者の実験における相違の原因は明らかではない。そこで、採血管の抗凝固剤が異なること（EDTA2NaとEDTA2K）が原因である可能性が考えられるため比較実験を試みた。この比較実験では3例ともに溶血液添加血漿では約20~30%の負誤差を認めた。また、この

現象はいずれの抗凝固剤でも同様であった。
以上の結果と一般的に溶血検体では負誤差を認める^{1,2)}とされていることから、やはり

実際の測定に際しては溶血検体に注意を要すべきと考えた。

【文献】

- 1) 奈須下亮：副腎皮質刺激ホルモン(ACTH). 日本臨牀 68:223-226, 2010
 - 2) 中井利昭. 副腎皮質刺激ホルモン. 臨床検査項辞典, 医歯薬出版:520, 2003
 - 3) 水本好美, 渡邊奈緒美, 永友利津子ほか. イムライト 2000XPi を用いた ACTH, コルチゾールおよびインタクト PTH の基礎的検討. JJCLA 37:327-332, 2012
 - 4) 戸来孝, 川崎理一, 遠藤繁之ほか. 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 測定試薬 E テスト「TOSOH」II (ACTH) の基礎的検討および高分子 ACTH に対する反応性について他法との比較. JJCLA 37:21-28, 2012
-