

研究

LABOSPECT 003 によるシスタチンC測定法の
基礎的検討

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

松江赤十字病院 検査部

Evaluation on “LABOSPECT 003” for measurement of Cystatin C in blood.

要旨

血中シスタチンCの濃度は糸球体濾過率(GFR)と相関する。当院ではシスタチンCを外注していた(外注先測定法を比較対照法とする)が、院内導入を目的として2社の測定試薬について比較検討を行った。2試薬とも同時再現性、キャリブレーション後の安定性、希釈直線性、共存物質の影響、EDTA-2Kの影響、比較対照法との相関についてはすべて良好で、日常検査法としての条件を満たしていた。一方、基準値を上回ったものを陽性、基準値内または基準値を下回ったものを陰性とした場合、比較対照法との一致率はN-アッセイLAシスタチンC測定法で69%、ノルディアシスタチンC測定法で85%だった。不一致例はすべて比較対照法で陽性、検討試薬で陰性であったため、導入に際しては基準値の再設定も視野に入れる必要がある。

Yuki Iwata, et al : ISSN 1343-2311 Nisseki Kensa 49 : 27—31,2016(2015.11.2 受理)

KEYWORDS

シスタチンC, LABOSPECT 003

1. はじめに

シスタチンCは分子量13kDaの塩基性低分子蛋白質であり、全身の有核細胞からシステインプロテアーゼインヒビターとして産生され、生体内での酵素活性による細胞および組織の障害を抑制している^{1,2)}。炎症時に増加する急性相蛋白質としての性質は持たないため、細胞内外の環境変化の影響を受けず一定量が分泌される²⁾。細胞外に分泌されたシスタチンCは他の血漿蛋白質と複合体を形成することなく腎糸球体から濾過され、近位尿細管で再吸収・分解されてアミノ酸に代謝されることから基本的には血中には戻らない¹⁾。そのため、糸球体濾過率(glomerular filtration rate; GFR)と血中シスタチンCの濃度は

相関するとされている^{3,4)}。

現在、GFRを推測するにはイヌリンなど外因性物質を経静脈的に投与して腎クリアランスを求める方法がGold standardとされている⁵⁾。しかし、この検査法は侵襲的で、検査に時間がかかり、費用も高くなるという大きな問題点がある。このため、実際にはクレアチニンの血清濃度だけでGFRを推算するGFRマーカーが臨床的に広く代用されている。ただし、血清クレアチニン値は筋肉量の影響を受けることに加え、Jaffe法では酵素法による測定より0.2mg/dL程度高く出ることや、ある程度までGFRが低下しないと血清クレアチニン値が上昇しないとといった問題点がある。

シスタチンCは上記のような腎前性の影響が小さいことや、従来の腎機能検査マーカーに比べ、より早期に腎機能障害を反映することから、簡便に測定できるGFRの指標として注目されている⁵⁾。今回、2社のシスタチンC測定試薬について性能を比較検討する機会を得、若干の知見が得られたので報告する。

2. 機器・試薬および材料

2-1 機器・試薬

(1) N-アッセイ LA シスタチンC

(以下A法とする)

機器：LABOSPECT 003

(日立ハイテクノロジーズ)

試薬：N-アッセイ LA シスタチンC

(ニッポーメディカル株式会社)

シスタチンC標準液〔6濃度〕

(同社)

シスタチンCコントロールI, II

〔2濃度〕(同社)

基準値：男性：0.70~1.15 (mg/L)

女性：0.58~0.96 (mg/L)

(2) ノルディア シスタチンC

(以下B法とする)

機器：LABOSPECT 003

(日立ハイテクノロジーズ)

試薬：ノルディア シスタチンC

(積水メディカル株式会社)

シスタチンCキャリブレーターN

〔5濃度〕(同社)

シスタチンCコントロールN

〔2濃度〕(同社)

基準値：男性：0.58~0.98 (mg/L)

女性：0.52~0.88 (mg/L)

(3) 比較対照法 (株式会社SRLへ外部委託)

機器：JCA-BM8020

(日本電子株式会社)

試薬：ネスコート GC シスタチンC

(アルフレッサファーマ株式会社)

基準値：男性：0.63~0.95 (mg/L)

女性：0.56~0.87 (mg/L)

(4) その他

干渉チェック・Aプラス

(シスメックス株式会社)

干渉チェック・RFプラス

(シスメックス株式会社)

2-2 試料

本検討には2014年10月22日~2015年1月16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血された血清【採血管：インセパックII (SEKISUI) 生化学・血清学検査用, 凝固促進剤・分離剤入り】, EDTA-2K加血漿【採血管：インセパックII (SEKISUI) 血液学的検査用, EDTA-2K入り】を試料として用いた。また、保存を要する場合には-80°Cで凍結保存した。

3. 測定原理

(1) A法

検体に抗ヒトシスタチンCヤギポリクローナル抗体感作ラテックス粒子を添加すると、抗原抗体反応により凝集が起こる。このとき生成した凝集物の量を吸光度変化量として測定し、検体中のシスタチンCを定量する。

(2) B法

検体に抗ヒトシスタチンCマウスモノクローナル抗体感作ラテックス粒子を添加すると、抗原抗体反応により凝集が起こる。このとき生成した凝集物の量を吸光度変化量として測定し、検体中のシスタチンCを定量する。

(3) 比較対照法

検体に金コロイド標識抗ヒトシスタチンCウサギポリクローナル抗体を添加すると、抗原抗体反応により金コロイド粒子が凝集する。この色調の変化を光学的に測定することで、検体中のシスタチンCを定量する。

4. 方法

4-1 同時再現性

2濃度のコントロールと2濃度のプール血清を用いてそれぞれ10回同時測定により、同時再現性を求めた。

4-2 日差再現性およびキャリブレーション後の安定性

2濃度のコントロールと冷蔵保存しておいた2濃度のプール血清を33日間のうち11回測定した。このとき、実験初日にのみキャリブレーションを実施した。

4-3 希釈直線性

プール血清を生理食塩水で10段階希釈して測定した。

4-4 共存物質による影響

プール血清に干渉チェック・Aプラスおよび干渉チェック・RFプラスを9:1の割合で添加してその影響を観察した。最終濃度が非抱合型ビリルビン:18.5mg/dL, 抱合型ビリルビン:21.0mg/dL, 溶血ヘモグロビン:490mg/dL, 乳び:1450ホルマジン濁度数(FTU), リウマトイド因子:500IU/mLとなるように調整した。

4-5 EDTA-2Kの影響

血清と同時にEDTA-2K入り採血管での採血があった患者に対しては、血漿を保存してシスタチンCを測定した。

4-6 方法間の相関

26例の患者血清を用いて今回検討した2種類の試薬と比較対照法との相関を求めた。さらに、比較対照法については現在使用している基準値、検討試薬については試薬添付文書記載の基準値をそれぞれ上回ったものを陽性、基準値内または基準値以下のものを陰性として判定の一致率を求めた。

5. 結果

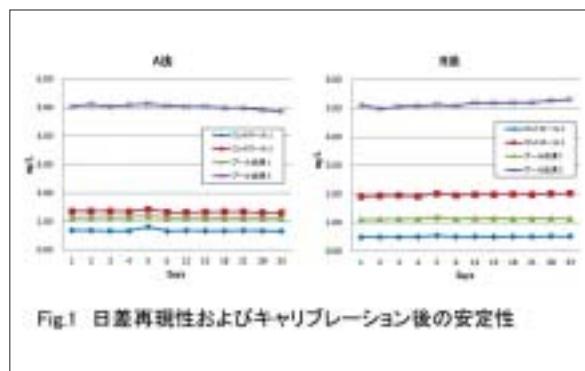
5-1 同時再現性

結果をTable 1に示す。A法によるコントロール、プール血清の変動係数(CV)は0.83~1.39%であった。B法によるコントロール、プール血清のCVは0.91~1.48%であった。

A法				
	コントロール1 (0.7±0.2 mg/L)	コントロール2 (1.4±0.2 mg/L)	プール血清1 (mg/L)	プール血清2 (mg/L)
mean	0.692	1.352	1.140	5.042
SD	0.006	0.019	0.009	0.025
CV (%)	1.14	1.39	0.83	1.09
B法				
	コントロール1 (0.5±0.2 mg/L)	コントロール2 (2.0±0.4 mg/L)	プール血清1 (mg/L)	プール血清2 (mg/L)
mean	0.480	1.910	1.103	5.114
SD	0.007	0.021	0.016	0.046
CV (%)	1.38	1.08	1.46	0.91

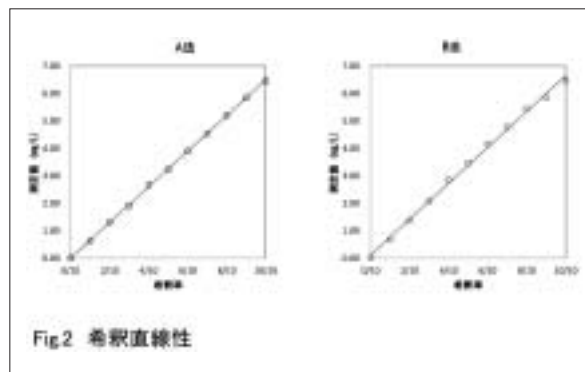
5-2 日差再現性およびキャリブレーション後の安定性

結果をFig.1に示す。A法はキャリブレーション後33日目までコントロールでCV 2.33~5.93%, プール血清でCV 1.49~1.93%であった。高濃度のプール血清ではわずかに測定値が低下していく傾向がみられた。一方、B法はキャリブレーション後33日目までコントロールでCV 1.82~2.96%, プール血清でCV 1.79~2.07%であった。高濃度のプール血清ではわずかに測定値が上昇していく傾向がみられた。



5-3 希釈直線性

A法, B法ともに6.47 mg/Lまで原点に収束する直線性を認めた (Fig. 2)。



5-4 共存物質による影響

非抱合型ビリルビン:18.5mg/dL, 抱合型ビリルビン:21.0mg/dL, 溶血ヘモグロビン:490mg/dL, 乳び:1450 FTU, リウマトイド因子:500IU/mLまで添加濃度に依存した測定値の変動は認めなかった。

5-5 EDTA-2Kの影響

結果をFig.3に示す。血清と同時にEDTA-2K加血漿が得られたのは16例であった。A法については回帰式 $y = 1.039x - 0.015$, 相関係数 0.996 だった。B法については回帰式 $y = 1.050 - 0.029x$, 相関係数 0.988 だった。

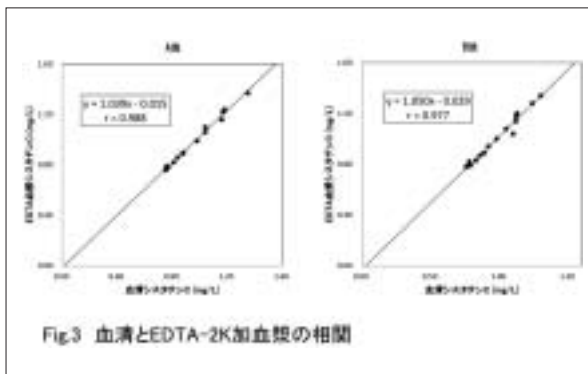


Fig3 血清とEDTA-2K加血漿の相関

5-6 方法間の相関

比較対照法と検討試薬との相関を調べたところ、A法については回帰式 $y = 0.933x - 0.015$ 、相関係数 0.989 だった。B法については回帰式 $y = 0.958x - 0.011$ 、相関係数 0.978 だった。A法とB法の相関については回帰式 $y = 1.017x + 0.013$ 、相関係数 0.980 だった (Fig. 4)。また、比較対照法との判定一致率を Table 2 に示す。比較対照法と A 法の一致率は 69%、比較対照法と B 法の一致率は 85% であった。

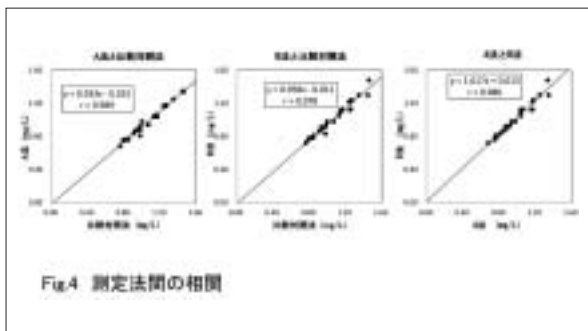


Fig4 測定法間の相関

Table 2 比較対照法と検討試薬の判定一致率

		比較対照法			
		-	+		
検出結果	-	8 (31%)	8 (31%)		
	+	0 (0%)	10 (38%)		

		比較対照法			
		-	+		
検出結果	-	8 (31%)	4 (15%)		
	+	0 (0%)	14 (54%)		

6. 考察

同時再現性は A 法、B 法ともにコントロールとプール血清の両方で CV が 2% 以下と良好な結果を示した。日差再現性およびキャリブレーション後の安定性については、A 法の低濃度コントロールにおいて CV 5.93% と若干のばらつきがみられた。これは低濃度コ

ントロールを測定した平均値が 0.68 mg/L (表示値 0.7 ± 0.2 mg/L) だったのに対し、第 5 日に 0.81 mg/L という値が測定されたためと考えられる。その他のコントロールとプール血清については CV 3% 以下と良好な結果が得られた。また高濃度プール血清において、A 法では測定値がわずかに低下していく傾向が、B 法では測定値がわずかに上昇していく傾向がみられた。これらの現象は試薬の劣化が影響していると推測される。

A 法、B 法ともに 6.47 mg/L まで原点に収束する希釈直線性を認めた。添付された説明書によれば測定上限は両試薬とも 10 mg/L とされているが、クレアチニンが 19.66 mg/dL と極めて高値の血清でもシスタチン C 濃度は 5 mg/L 程度にとどまっており、シスタチン C が 10 mg/L 以上の試料を入手することは困難であったため、これ以上の検討は行えなかった。

共存物質は両試薬とも今回添加した濃度範囲では概ね影響を認めず、日常検査で共存物質の影響を受ける可能性は低いと考えられる。

血清と EDTA-2K 加血漿を試料として測定値の相関を調べたところ、両試薬とも良好な相関性が認められ、血清が得られなかった場合の代替試料として EDTA-2K 加血漿を用いることが可能である。

各方法間の比較ではいずれの試薬とも良好な相関が得られた。その他の検討項目に関してもおおむね良好な結果が得られており、日常検査法としての条件を満たしているといえる。しかし、各試薬の基準値を用いた判定の一致率は A 法で 69%、B 法で 85% であった。A 法で判定一致率がやや低い原因としては、比較対照法での基準値が男性：0.63~0.95 mg/L、女性：0.56~0.87 mg/L であるのに対し、A 法は男性：0.70~1.15 mg/L、女性：0.58~0.96 mg/L と上限が高めに設定してあることが考えられる (B 法は男性：0.58~0.98 mg/L、女性：0.52~0.88 mg/L)。それに加えて、比較対照法と A 法を比較した回帰式が $y = 0.933x - 0.015$ と A 法の方がやや低値となることも一因であろう。いずれの試薬も不一致の内容は、比較対照法で陽性、検討試薬で陰性であったため、導入に際しては基準値の再設定も視野に入れなくてはならないと考えられる。

【文献】

- 1) Simonsen O, Grubb A, Thysell H :
The blood serum concentration of
cystatin C (gamma-trace) as a measure
of the glomerular filtration rate.
Scand J Clin Lab Invest. 45(2) : 97-
101 ; 1985.
 - 2) Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir
A, et al. : Structure and expression
of the human cystatin C gene. Biochem
J. 268(2) : 287-94 ; 1990.
 - 3) Grubb A : Diagnostic value of analysis
of cystatin C and protein HC in
biological fluids. Clin Nephrol. 38 : 20-
27 ; 1992.
 - 4) Coll E, Botey A, Alvarez L, et al. :
Serum cystatin C as a new marker
for noninvasive estimation of glomerular
filtration rate and as a marker for
early renal impairment. Am J Kidney
Dis. 36(1) : 29-34 ; 2000.
 - 5) 日本腎臓学会編 : CKD 診療ガイド 2012.
第1版, 18, 小黒正榮, 東京医学社, 2012
-