

●全自動シスタチンC測定試薬の開発

バイオサイエンス事業部 開発部 AIA試薬開発G

三澤 孝一
遠田 容子
新谷 晃司
井上 益男

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でシスタチンスーパーファミリーに属し、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。遺伝子はハウスキーピングタイプであり、炎症などによる細胞内外の環境変化に対する影響を受けることなく一定の割合で産生・分泌されている¹⁾。細胞外に分泌されたシスタチンCは、他の血清蛋白と複合体を形成することなく腎糸球体から濾過され、近位尿管で再吸収・分解される^{2)~3)}。そのため糸球体濾過量 (glomerular filtration rate : GFR) の悪化とシスタチンC濃度は相関するとされ^{4)~5)}、GFRの低下により血中のシスタチンC濃度が上昇すると報告されている⁶⁾。

現在、臨床的に用いられているGFR測定法は、内因性物質であるクレアチンを用いた24時間クレアチンクリアランスの測定がある。また、GFRを推定するための腎機能マーカーとして血清クレアチン値や β 2-マイクログロブリン値等が用いられている⁷⁾。クレアチンクリアランスの測定は、畜尿の煩雑さや時間の制約があり患者への負担が大きいという問題点がある。血清クレアチン値は筋肉量や食事の影響を受け、性差・年齢により変化することなど実際のGFRより過大に算出されることが指摘されている。また、 β 2-マイクログロブリン値は腎機能の低下に関わらず、悪

性腫瘍および自己免疫疾患の場合に高くなることがある。これらの問題に対しシスタチンCは血清または血漿を用いて測定することができる上に、前述のような腎前性の影響が小さいことなどから、GFRの指標として簡便に測定できる内因性腎機能マーカーとして腎機能の評価に有用とされている^{8)~13)}。

今回、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マーカーとして注目されているシスタチンCについて、新規にシスタチンC測定試薬のAIA試薬化を進め、全自動エンザイムイムノアッセイ装置AIAシリーズを用いた短時間、高感度な測定試薬の開発を行ったので報告する。

2. 測定原理と材料

シスタチンC測定試薬は抗原抗体反応を利用し、その反応に関与する物質が凍結乾燥体として試薬カップに封入されている。

本試薬の測定原理は1ステップサンドイッチ蛍光酵素免疫測定 (FEIA) 法であり、試薬カップに含まれるモノクローナル抗体は各々シスタチンC上の異なる部位 (エピトープ) を特異的に認識し結合することにより免疫複合体 (磁性単体結合抗体-抗原 (シスタチンC)-酵素標識抗体) を形成する (図1)。測定は、試薬カップに抗原を含む検体を分注することにより、凍結乾燥体は溶解し抗原抗体反応が開始する。37°C、10分間の反応後、未反応の抗原および酵素標識抗体を

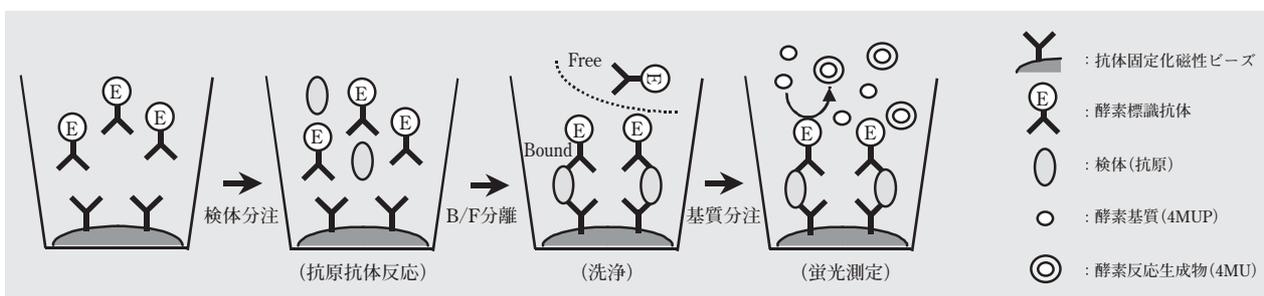


図1 シスタチンC測定の免疫複合体模式図

B/F分離により洗浄除去し、酵素基質である4-メチルウンベリフェリルりん酸 (4MUP) を分注後、経時的に蛍光強度を測定し単位時間あたりの4-メチルウンベリフェロン (4MU) の生成量を測定する。基質の蛍光強度は固定化された酵素量に依存し、さらにシスタチンC抗原量に比例する。したがって、あらかじめ既知濃度のシスタチンCを含む標準品を用いその蛍光強度とシスタチンC濃度による標準曲線を作成し、シスタチンC濃度未知の患者検体の蛍光強度に相当するシスタチンC濃度を標準曲線より算出することによりシスタチンCの定量が可能である。測定の際、検体のカップへの分注、一定時間下での抗原抗体反応、B/F分離、基質分注、蛍光強度の測定は全自動エンザイムイムノアッセイ装置により自動で行われ、各試薬ともに測定開始から約18分後に結果が得られる。(試薬の主な仕様を表1に、全自動エンザイムイムノアッセイ装置AIA-1800を使用したときに得られる検量線の例を図2に示す。)

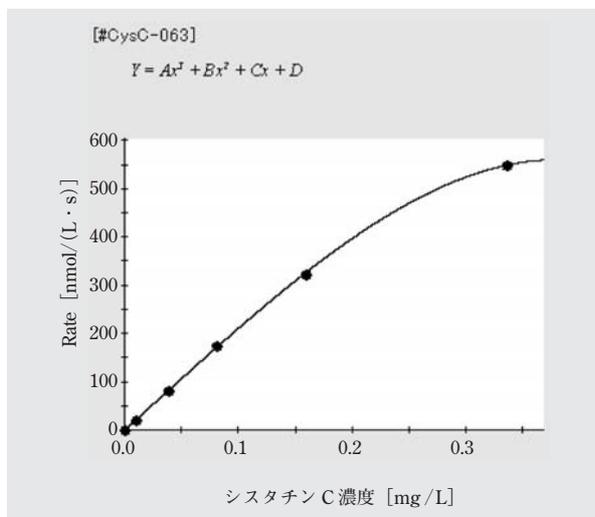


図2 シスタチンC測定試薬の検量線例

3. AIA試薬の開発

シスタチンCの測定試薬として短時間、高感度な測定試薬の開発をするためにシスタチンCへの親和性の高いマウスモノクローナル抗体を選定した。固定化抗体については固定化量等の条件を最適化し、酵素標識抗体については酵素を結合させる架橋試薬の使用量等を最適化し十分な感度を得られるようにした。

免疫反応液組成について、検体中に含まれる可能性のある異好性抗体 (Heterophilic Antibodies) との非特異的反応を抑えるためにブロッキング剤を添加し、また、安定性を向上すべく各種蛋白質を最適化した。

標準品について、シスタチンCは等電点が9.3の塩基性蛋白質であり、容器等に吸着しやすい性質を持ち合わせていることから、抗原の吸着を防ぐために各種蛋白質等を最適化した。他社キットでは凍結乾燥形態である標準品を、本シスタチンC測定試薬では液状形態とすることができた。

その結果、他社キットと同様の再現性を確保し、高感度な測定試薬を開発することができたので、評価結果を以下に報告する。

4. 基本性能評価

(1) 感 度

シスタチンC濃度0濃度の標準品および低濃度患者血清をシスタチンC濃度0濃度の標準品を用い8段階に希釈した試料を10重測定し、得られた蛍光量より最小検出限界を求めた結果、0濃度試料の平均値+2倍標準偏差 (SD) と希釈試料の平均値-2倍SDと重ならない点を最小検出限界値としたときの濃度は0.003 mg/Lであった。また、変動係数 (coefficient of variation : CV) が10%以内の理論値を実効感度として算出し

表1 シスタチンC測定試薬の主な仕様

測定項目	血中シスタチンC
測定原理	1ステップサンドイッチ蛍光酵素免疫測定法 (抗シスタチンCマウスモノクローナル抗体)
測定装置	全自動エンザイムイムノアッセイ装置 (AIA-1200シリーズおよびAIA-600は除く)
免疫反応温度・時間	37℃・10分
酵素反応温度・時間	37℃・5分
測定対象検体	血清または血漿 (ヘパリン, EDTA)
測定範囲	0.01~8.00 mg/L
検体量/分注水量	10 μL (希釈済)/140 μL
検体希釈倍率	25倍希釈
標準品形状	液状品
濃度単位	mg/L

たときの濃度は0.004 mg/Lとなり、良好な結果が得られた (図3)。

(2) 再現性

測定内再現性、測定間再現性試験を濃度の異なる3種のプール血清およびプール血漿 (ヘパリン) を用いて行った。使用した3種 (Low、Middle、High) は1回の測定分を小分け分注し使用まで凍結保存した。5重同時測定による測定内再現性試験の結果、各試料の測定値のCVは1.49~2.86 %であった。1日2回各2重測定し、試薬、装置を変えずに20回繰り返して行った測定間再現性試験の結果 (検量線作成後91日間)、各試料の測定値のCVは1.37~3.41 %であった (表2)。

(3) 希釈直線性

希釈直線性試験を濃度の異なる3種の血清検体およびヘパリン血漿検体を用い4重測定にて行った。各々の検体を専用希釈液で5段階の希釈系列を作製し測定した結果、血清検体、ヘパリン血漿検体ともに原点に収束する良好な希釈直線性性能を有していることが認められた (図4)。

(4) 共存物質および抗凝固剤の影響

検体中に含まれる可能性のある各物質を高濃度でプ

ール血清およびプール血漿 (ヘパリン) へ添加し、測定値への影響を確認した。共存物質としてはヘモグロビン、遊離型ビリルビン、抱合型ビリルビン、脂質、ヒト血清アルブミン、アスコルビン酸を、抗凝固剤としてはクエン酸、ヘパリン、EDTAを各々表3に記載の濃度まで添加し測定した結果、未添加に対して測定値はいずれも±10%以内であり、これら物質による影響は添加量上限まで認められないと判断した。

(5) 健常者の濃度分布

健常者192例 (男性：157例、女性：35例) について、血清中のシスタチンC濃度を測定した結果のヒストグラムを図5に示す。ノンパラメトリック法による95%基準範囲を求めた結果、0.56~0.97 mg/Lであった。また、男女別の比較においては、男性：0.61~0.97 mg/L、女性：0.49~0.88 mg/Lであり、女性の方が若干低値傾向を示した。

(6) 他社キットとの相関性

血清検体を使用し本シスタチンC測定試薬 (y) と他社A法 (x) および他社B法 (x) で測定し、測定値の比較を行った結果 (図6)、他社A法に対して相関係数 (r) 0.997、回帰係数0.979、y切片0.087、他社B

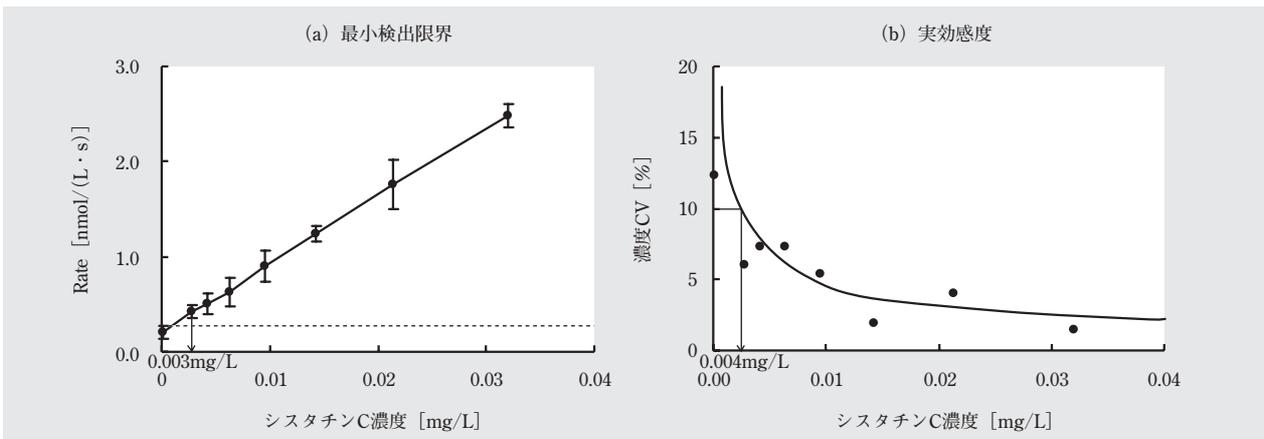


図3 感度：(a) 最小検出限界、(b) 実効感度

表2 測定内および測定間再現性

	シスタチンC濃度 [mg/L]					
	Pooled serum			Pooled heparinized plasma		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High
測定内再現性 (n=5)						
mean	0.71	2.23	4.78	0.69	2.22	4.85
SD	0.01	0.05	0.14	0.02	0.04	0.07
CV [%]	1.51	2.09	2.86	2.25	1.79	1.49
測定間再現性 (n=20)						
mean	0.70	2.15	4.69	0.69	2.08	4.69
SD	0.02	0.03	0.16	0.02	0.04	0.16
CV [%]	2.59	1.37	3.41	2.30	1.83	3.40

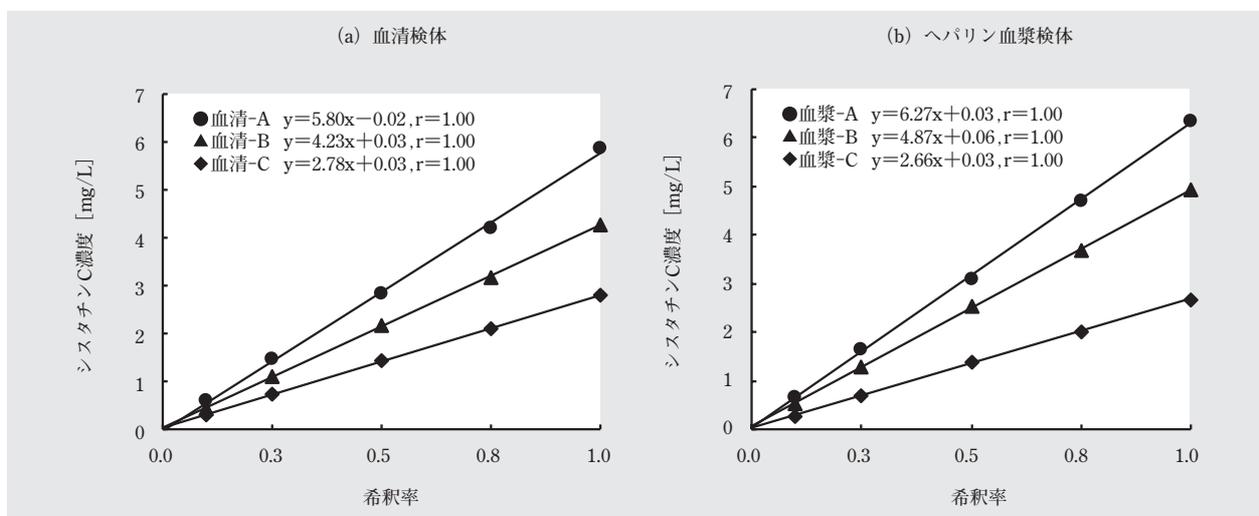


図4 希釈直線性：(a) 血清検体、(b) ヘパリン血漿検体

表3 共存物質および抗凝固剤影響

		プール血清	プール血漿
ヘモグロビン	[mg/dL]	471	471
遊離型ビリルビン	[mg/dL]	19	19
抱合型ビリルビン	[mg/dL]	18	18
脂質	[mg/dL]	1,666	1,666
ヒト血清アルブミン	[mg/mL]	50	50
アスコルビン酸	[mg/dL]	20	20
クエン酸	[mg/dL]	20	20
ヘパリン	[U/mL]	100	100
EDTA	[mg/mL]	10	10

法に対して相関係数 (r) 0.997、回帰係数0.980、y切片-0.004と良好な相関性が認められた。

(7) 血清検体と血漿検体の相関性試験

血漿は血液凝固を伴わないためサンプル調製に要す

る時間の短縮、被検体回収量などの点から血清より優れている。そこで、血漿検体（ヘパリン血漿、EDTA・2Na）へ対応可能であるか検討した。同時に同一人物から採取した血清とヘパリン処理採血から得られた血漿との相関性試験を行った結果（血清 (x)、ヘパリン血漿 (y)）、106例での相関係数 (r) 0.999、回帰係数0.980、y切片0.018、また、同様に採取した血清とEDTA・2Na処理採血から得られた血漿との相関性試験を行った結果（血清 (x)、EDTA・2Na血漿 (y)）、99例での相関係数 (r) 0.999、回帰係数1.010、y切片-0.004といずれの結果も良好な相関性が認められた（図7）。したがって、本シスタチンC測定試薬は血清、血漿のマトリックスの違いによる測定値の差は認められずいずれの検体種にも同等な測定値を与える試薬であることが明らかとなった。

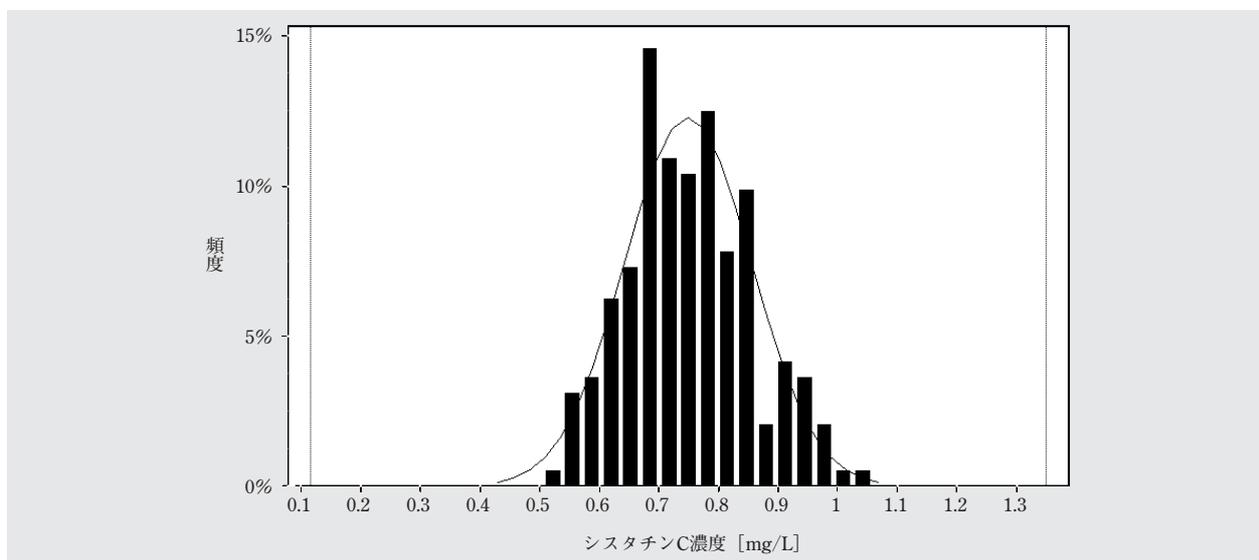


図5 健常者の濃度分布

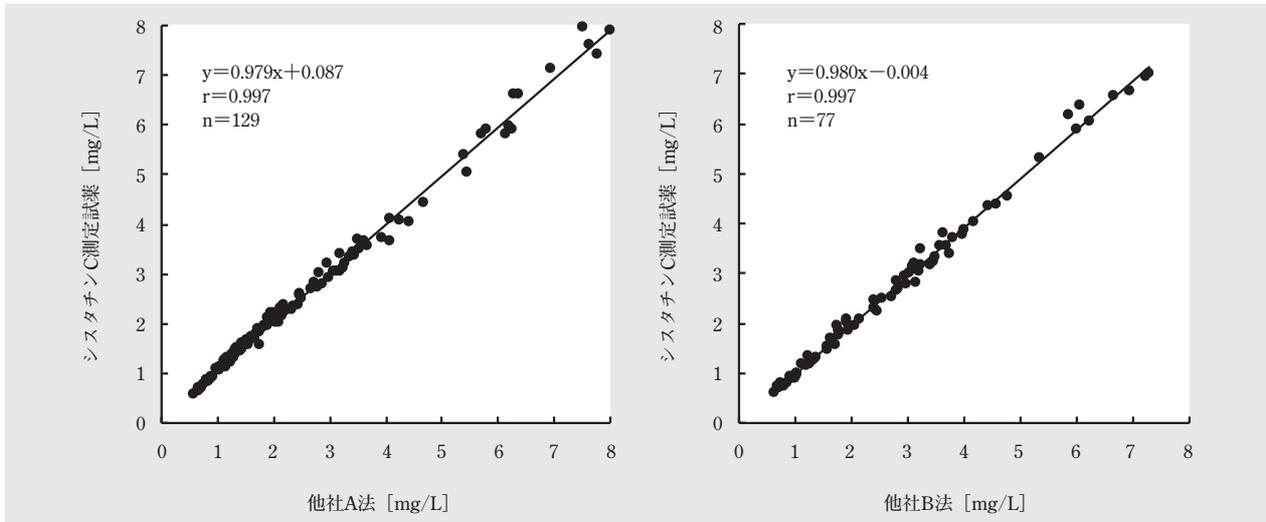


図6 シスタチンC測定試薬と他社キットとの相関性

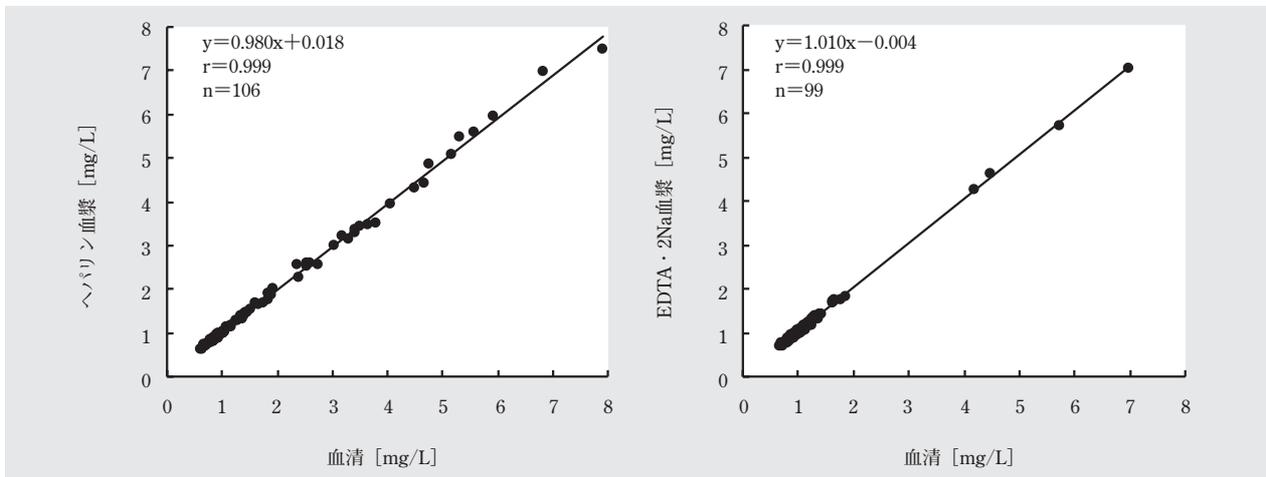


図7 血清検体と血漿検体の相関性

5. 臨床上的の有用性確認

(1) 腎機能検査項目との相関性

従来、腎機能障害の指標に用いられている血清クレアチニン (x) と本シスタチンC測定試薬 (y) との相関性について、100例の血清検体を使用し検討した結果 (図8)、血清クレアチニンに対して相関係数 (r) 0.851、回帰係数1.281、y切片0.057となり、両測定間で正の相関性が認められた。

(2) 24時間クレアチンクリアランスとの関係

血清シスタチンC値および血清クレアチニン値の24時間クレアチンクリアランス (数値低下は腎機能低下を意味する) との関係を検討した結果 (図9)、24時間クレアチンクリアランスに対する相関係数 (r) は血清クレアチニンの-0.806に対し血清シスタチン

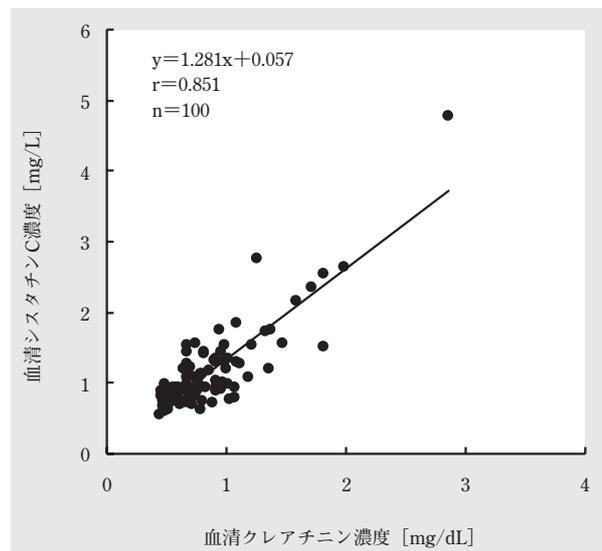


図8 血清クレアチニンと血清シスタチンCの相関性

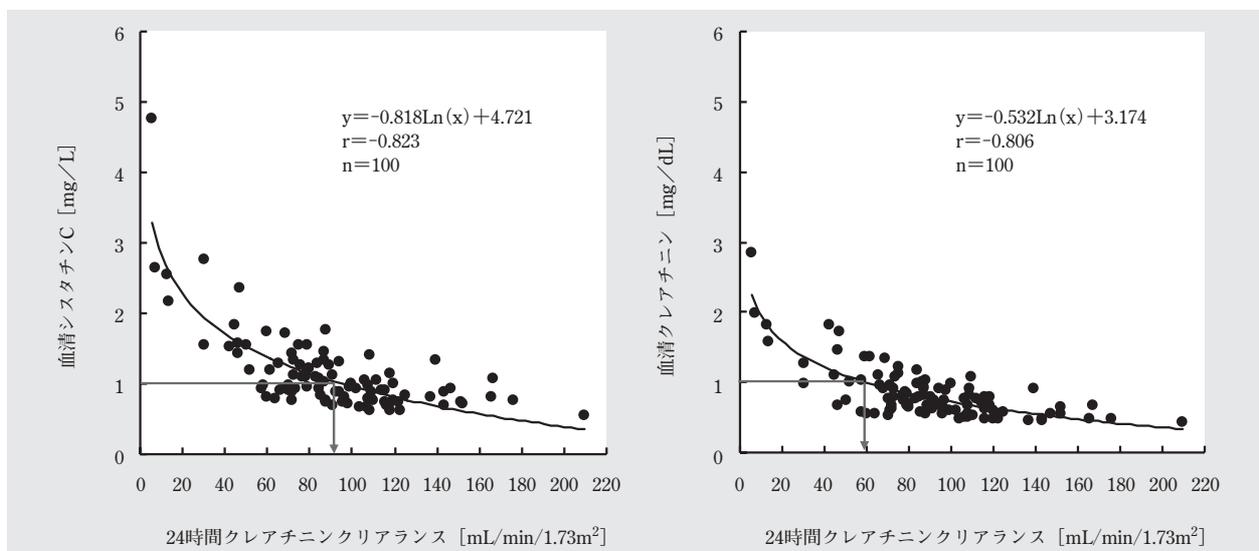


図9 24時間クレアチンクリアランスに対するシスタチンCとクレアチニンの散布図

Cは-0.823となり、血清シスタチンCの方が若干強い負の相関が認められた。血清シスタチンC値および血清クレアチニン値の基準値上限をそれぞれ1 mg/Lおよび1 mg/dLとした時、それぞれの回帰曲線が基準値上限を通過する点は、血清クレアチニン値の約60 mL/min/1.73m²に対し血清シスタチンC値は約90 mL/min/1.73m²と高い糸球体濾過値に相当する点で高値化していることが明らかであり、血清シスタチンCの方が腎機能の低下をより強く反映していることが認められた。

(3) ROC解析による比較

血清シスタチンCと血清クレアチニンについて、GFRの測定法である24時間クレアチンクリアランスで91 mL/min未満(表4に示すように日本腎臓学会ガイドラインでは、91 mL/min未満から、腎機能障害を示す。)を腎機能低下群としたときのROC解析の結果を図10に示す。それぞれのArea Under the Curve (AUC)は血清シスタチンCが0.84、血清クレアチニンが0.79となり、血清シスタチンCの方が良好な結果を示した。これは血清シスタチンCが血清クレ

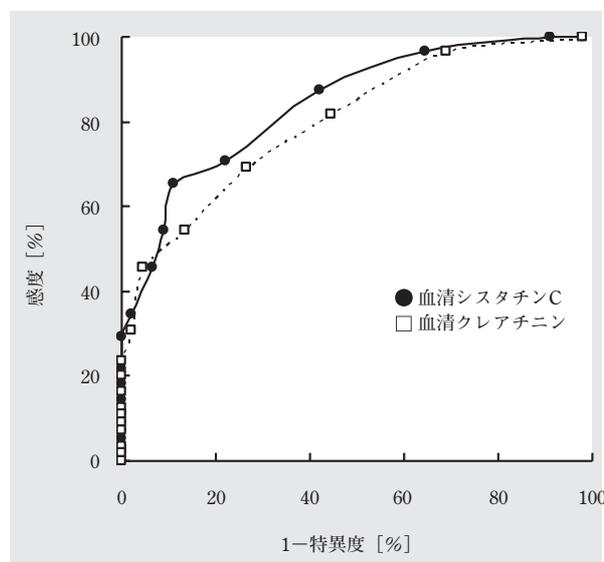


図10 血清シスタチンCと血清クレアチニンのROC曲線

アチニンよりもGFR 91 mL/min未満を察知する感度・特異度がともに優れていることを意味する。

6. まとめ

今回開発したシスタチンC測定試薬について、基本性能および臨床の有用性を確認した。

基本性能において、測定内、測定間再現性は4%以内と良好であり、検体の希釈直線性も良好であった。検体中の共存物質や抗凝固剤の影響がないこと、血清、血漿(ヘパリン, EDTA・2Na)両検体を同等に測定可能なことが確認された。他社キットとの相関性試験においても他社2法と良好な相関性を示した。

表4 腎機能ステージ

日本腎臓学会ガイドライン	腎機能 GFR: mL/min
尿毒症群	10以下
腎不全(腎臓の働きのなし)	11~30
腎機能重度障害群	31~50
腎機能中度障害群	51~70
腎機能軽度障害群	71~90
腎機能正常群	91以上

* GFR: 腎糸球体濾過能

临床上の有用性については、従来、腎機能障害の指標に用いられている血清クレアチニンと相関性が良好であり、また、24時間クレアチニンクリアランスとの関係において、血清シスタチンCは血清クレアチニンに比べ腎機能障害軽度の段階から高値化することが認められた。従来、GFRを推測するための血清クレアチニン値はGFRが正常の1/2程度 (50 mL/min) に低下しないと上昇しない、いわゆるCreatinine blind rangeが存在するが、本シスタチンC測定試薬ではより早期に上昇することが認められた。このことから今後、血清クレアチニンに代わりシスタチンCがGFRの指標になることが期待された。さらにROC解析の結果からGFR (糸球体濾過値) が91 mL/min 前後の軽症腎機能障害において血清クレアチニンより診断感度・診断特異度ともに高いことが確認された。

以上から、本シスタチンC測定試薬は、早期腎機能障害のマーカーとしてスクリーニング、モニタリング目的の検査の両方に有用であることが示された。クレアチニンクリアランスのような煩雑さがなく、全自動で測定できることから外来での腎機能検査など利便性を生かした運用も期待される。また最近シスタチンCの新たな可能性として、心血管系疾患の発症に関係する予後因子となることが報告されており、心血管系疾患のリスクファクターとしても有用性が期待される。

7. 謝 辞

本開発において臨床的有用性の確認に対してご協力していただいた各先生方に厚く御礼申し上げます。

旭川医科大学臨床検査医学講座：伊藤 喜久 教授
旭川医科大学病院臨床検査・輸血部生化学検査室
：新関 紀康 先生

文 献

- 1) Abrahamson, M., et al, *Biochem. J.*, **1**, 287-294 (1990)
- 2) Simonsen, O., et al, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **45**, 97-101 (1985)
- 3) Randers, E., et al, *Clin. Lab. Med.*, **37**, 389-395 (1999)
- 4) Grubb, A., *Clin. Nephrol.*, **38**, 20-27 (1992)
- 5) Coll, E., et al, *Am. J. Kidney. Dis.*, **36**, 29-34 (2000)
- 6) Newman, DJ., *Ann. Clin. Biochem.*, **39**, 89-104 (2002)
- 7) Filler, G., et al, *Clin. Chem.*, **43**, 1077-1088 (1997)
- 8) Grubb, A., et al, *Acta Med Scand*, **128**, 499-503 (1985)
- 9) Frans J. Hoke, et al, *Nephrol Dial Transplant*, **18**, 2024-2031 (2003)
- 10) Pucci, L., et al, *Clin. Chem.*, **53**, 480-488 (2007)
- 11) 佐藤弘恵、他、*モダンメディア*、**52**、184-192 (2006)
- 12) 堀田修、他、*日腎会誌*、**41**、797-803 (1999)
- 13) 平田明彦、他、*日本臨床*、**60**、515-519 (2002)
- 14) 金子拓志、他、*医学検査*、**56**、955-963 (2007)