

Study of a High-Sensitivity CRP Assay by Latex-Enhanced Immunonephelometry on a BN II Analyzer

Yoko IMAIZUMI¹⁾, Namiko TAKADA¹⁾, Kumiko OHKUBO¹⁾²⁾
Kazue IMAMURA¹⁾, Sadako HARADA¹⁾, Hironobu KAWASHIMA¹⁾
Hiroshi IDEGUCHI¹⁾²⁾ and Junko ONO¹⁾²⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratories, Fukuoka University Hospital

²⁾ Department of Laboratory Medicine, Fukuoka University School of Medicine

Abstract : Recently, owing to the development of a new method to perform high-sensitivity measurements of C-reactive protein levels, chronic inflammation has thus been found to be associated with various disease states. In this study, we assessed the accuracy of this high-sensitivity measurement method in order to evaluate the C-reactive protein levels based on nephelometry using the BN system (Behring) to make an accurate clinical diagnosis of chronic inflammatory disease. This method showed such a high degree of accuracy within-day and between-day, that the CV value was less than 3% at concentrations of around 0.1 mg/dl of CRP and the sensitivity was 0.02 mg/dl. These results were consistent with the criteria established for measuring the predictable factors recognized by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). The high-sensitivity measurement of the C-reactive protein levels could thus make it possible to diagnose infectious diseases at an early phase, while also being able to diagnose various inflammatory diseases in chronic states.

Key words : High-sensitivity C-reactive protein, FDA, BN system, Nephelometry, Chronic inflammatory diseases

ベーリングネフェロメーター II (BN II) による 高感度 CRP 測定の基礎的検討

今泉 陽子¹⁾ 高田乃美子¹⁾ 大久保久美子¹⁾²⁾
今村 一枝¹⁾ 原田 貞子¹⁾ 川島 博信¹⁾
井手口 裕¹⁾²⁾ 小野 順子¹⁾²⁾

¹⁾ 福岡大学病院臨床検査部

²⁾ 福岡大学医学部臨床検査医学

要旨 : 近年高感度 C 反応性蛋白 (CRP) 測定法の開発により, 慢性炎症が, 様々な病態に関連していることが明らかにされてきた. 今回我々は, ベーリングネフェロメーター (BN) システムによる高感度 CRP 測定法が, 精度および感度において臨床応用が可能か否かを検討した. 本測定法はネフェロメトリー法を原理とし, 同時再現性, 日差再現性は良好であり, CRP 濃度 0.1mg/dl 付近の変動係数 (CV) は 3% 以下, 測定感度は 0.02mg/dl であった. この結果は米国食品・医薬品局 (U.S. Food and Drug Administration ; FDA) の認定した冠動脈疾患予知因子測定法としての基準を満たしていた. 高感度 CRP 測定法の活用により, 新生児感染症の早期診断や様々な慢性炎症性疾患の病態把握に利用することが可能である.

キーワード：高感度 CRP, FDA, BN システム, ネフェロメトリー法, 慢性炎症性疾患

はじめに

生体に外傷や細菌感染、火傷などの傷害が加わると、発赤、腫脹といった炎症反応が惹起される。この時単球や平滑筋細胞から産生されるインターロイキン-6 (IL-6) は、肝細胞における急性相反応物質の合成を促進し、これらの蛋白が一過性に血中に増加する。なかでも C 反応性蛋白 (CRP) は半減期が 2~4 時間であり、炎症反応を反映しての増加や減少が速やかであることから疾患の経過、予後のモニタリングに広く応用されてきた。

近年低濃度域の CRP を優れた精度と感度で測定する方法が開発され、0.2mg/dl 程度の増減を判定することが可能になった。高感度測定でとらえられる程度の微量の CRP 上昇が慢性的に持続すると、高頻度に心筋梗塞が発症することが明らかにされ、冠動脈疾患の予知因子として注目されている。

FDA は、1999年10月に、デイドベアリング (DB) 社のラテックスネフェロメトリー法を原理とした高感度 CRP 測定法を、冠動脈疾患の予知因子の評価に有効として承認した。今回我々は、慢性炎症のモニタリングという新たな臨床応用を期待し、高感度 CRP 測定法について検討を行った。

対象と方法

1. 機器と試薬

機器は DB 社の全自動免疫化学分析装置ベアリングネフェロメーター II (BN II) を、試薬は DB 社の専用試薬を使用した (表 1)。

2. 対象

対象は CRP 濃度約 0.1mg/dl を示す血清をプールし (以下血清 A)、干渉物質の影響の検体は、IgM 濃度約 750mg/dl 以上の患者よりプールした血清 (IgM 試料)、およびリウマチ因子約 300IU/ml を示す血清をプールした血清 (RF 試料) を用いた。

3. 同時再現性の検討

血清 A を 10 重測定し、得られた測定値から平均値、標準偏差 (SD)、変動係数 (CV) を求めた。

4. 日差再現性の検討

血清 A の 2 重測定を連続した 8 日間行い、得られた測定値から平均値、SD、CV を求めた。

5. 希釈直線性

血清 A を N-希釈液 (表 1) で 10 段階に希釈したものをそれぞれ 10 重測定し、得られた測定値から平均値、SD、CV を求めて直線性とばらつきを検討した。

6. クロスコンタミネーション試験

クロスコンタミネーションについては高濃度 IgM 試料と RF 試料を対象にした。IgM は測定時の希釈率が他項目に比べて低く、キュベット内で高濃度となるので選択し、また RF は電氣的に測定キュベットに付着しやすいので選択した。血清 A を 10 重測定後、IgM 試料を全キュベットを使用して 60 重測定した。その後キュベット洗浄を行わずに再度血清 A を 10 重測定して、得られた測定値から平均値、SD、CV を求めた。RF 試料についても同様に行った。対象試料の測定前後での血清 A 測定値について、有意水準 5% の条件で t 検定を行なった。

表 1 試薬名称と組成

N-ラテックス CRP II	抗ヒト C 反応性蛋白 (CRP) マウスモノクローナル抗体吸着ポリスチレン粒子
N-補助試薬	リン酸緩衝液 (0.05mol/l) + 塩化ナトリウム (NaCl, 8.5g/l) + ポリオキシエチレン9-ラウリルエーテル (Thesit, 50g/l)
N Rheumatology Standard SL	CRP, 抗ストレプトリジン O (ASL), リウマチ因子 (RF) が精製されたヒト血清混合物
N-反応緩衝液	リン酸緩衝液 + ポリエチレングリコール (PEG)
N-希釈液	リン酸緩衝液
洗浄液	蒸留水

N: ネフェロメトリーの略

表 2 同時再現性及び日差再現性

表 2-A 同時再現性 単位：mg/dl		表 2-B 日差再現性 単位：mg/dl	
1	0.092	1月22日	0.098
2	0.089		0.098
3	0.090	1月23日	0.095
4	0.088		0.095
5	0.089	1月24日	0.094
6	0.089		0.094
7	0.090	1月27日	0.095
8	0.088		0.095
9	0.091	1月28日	0.096
10	0.091		0.095
		1月29日	0.102
			0.098
平均値	0.0897	1月30日	0.098
SD	0.0013		0.093
CV (%)	1.5	2月4日	0.097
			0.103
		平均値	0.0966
		SD	0.0028
		CV (%)	2.9

結 果

1. 同時再現性について

血清 A を10重測定すると平均値は 0.0897mg/dl, SD は 0.0013mg/dl, CV は1.5%であった (表 2-A)。

2. 日差再現性について

血清 A を 8 日間測定した結果, 平均値は 0.0966mg/dl, SD は 0.0028mg/dl, CV は2.9%であった (表 2-B)。

3. 希釈直線性

血清 A の各希釈系列の10重測定値を表 3-A と図 1-A に示した。各希釈系列の CV は0.9%~3.6%であり, 0.02mg/dl 付近まで, 直線性が確認された。機器の設定上, この時の検量線では 0.016mg/dl 未満の測定値は 0.000mg/dl と示されるため, 表 3-A の測定値を実測値である散乱光強度に換えて表 3-B に示し, 各希釈系列の散乱光強度平均値±3SD の範囲が重ならないことを

表 3 希釈直線性

表 3-A N-希釈液で10段階希釈した患者プール血清の10回連続 CRP 濃度測定結果

単位：mg/dl

希釈率	0/10	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10	10/10
1	0.000	0.000	0.020	0.030	0.040	0.049	0.057	0.067	0.075	0.086	0.095
2	0.000	0.000	0.019	0.029	0.039	0.048	0.058	0.067	0.075	0.082	0.093
3	0.000	0.000	0.019	0.030	0.040	0.048	0.058	0.066	0.075	0.085	0.093
4	0.000	0.000	0.018	0.030	0.040	0.049	0.057	0.066	0.074	0.084	0.091
5	0.000	0.000	0.020	0.028	0.040	0.049	0.057	0.066	0.076	0.084	0.092
6	0.000	0.000	0.020	0.030	0.039	0.049	0.059	0.065	0.076	0.084	0.092
7	0.000	0.000	0.019	0.030	0.040	0.049	0.057	0.066	0.076	0.084	0.093
8	0.000	0.000	0.019	0.029	0.039	0.049	0.058	0.066	0.075	0.084	0.094
9	0.000	0.000	0.020	0.029	0.039	0.049	0.058	0.065	0.076	0.086	0.094
10	0.000	0.000	0.020	0.029	0.040	0.049	0.056	0.066	0.076	0.086	0.093
平均値	0.0000	0.0000	0.0194	0.0294	0.0396	0.0488	0.0575	0.0660	0.0754	0.0845	0.0930
SD	0.0000	0.0000	0.0007	0.0007	0.0005	0.0004	0.0009	0.0007	0.0007	0.0013	0.0012
CV (%)	—	—	3.6	2.4	1.3	0.9	1.5	1.0	0.9	1.5	1.2

表 3-B 散乱光強度

単位：bit

希釈率	0/10	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10	10/10
1	3	88	224	337	463	589	716	884	1017	1208	1377
2	-8	101	216	328	451	579	726	878	1022	1136	1328
3	10	102	213	340	462	586	728	870	1006	1191	1329
4	6	93	207	332	469	595	722	861	1002	1177	1306
5	-6	95	220	315	465	596	718	859	1030	1176	1324
6	-9	105	224	337	454	588	740	852	1033	1179	1323
7	2	99	210	340	461	598	721	855	1032	1170	1340
8	3	106	211	327	457	588	731	868	1013	1172	1358
9	-1	105	219	329	448	594	734	850	1025	1202	1350
10	3	105	221	325	471	601	707	869	1034	1199	1327
平均値	0.3	99.9	216.5	331.0	460.1	591.4	724.3	864.6	1021.4	1181.0	1336.2
SD	6.2	6.1	6.0	7.9	7.5	6.6	9.6	11.2	11.5	20.7	20.5
CV (%)	—	6.1	2.8	2.4	1.6	1.1	1.3	1.3	1.1	1.8	1.5
+3SD	18.6	118.3	235.0	354.7	482.5	610.8	752.8	898.6	1055.5	1243.1	1397.5
-3SD	-18.6	81.7	199.0	307.3	437.5	571.2	695.2	831.4	986.5	1118.9	1274.5

— : 計算不能

表4 IgM と RF の高濃度プール血清を対象にしたクロスコンタミネーション試験 単位：mg/dl

	IgM 測定前	IgM 測定後	RF 測定前	RF 測定後
1	0.095	0.094	0.094	0.095
2	0.096	0.088	0.095	0.096
3	0.095	0.091	0.095	0.097
4	0.094	0.088	0.096	0.097
5	0.094	0.090	0.096	0.096
6	0.094	0.088	0.093	0.096
7	0.094	0.090	0.095	0.096
8	0.095	0.089	0.095	0.095
9	0.095	0.091	0.094	0.097
10	0.094	0.091	0.095	0.097
平均値	0.0946	0.0900	0.0948	0.0962
MIN	0.094	0.088	0.093	0.095
MAX	0.096	0.094	0.096	0.097
R	0.002	0.006	0.003	0.002
SD	0.0007	0.0019	0.0009	0.0008
CV (%)	0.7	2.1	1.0	0.8

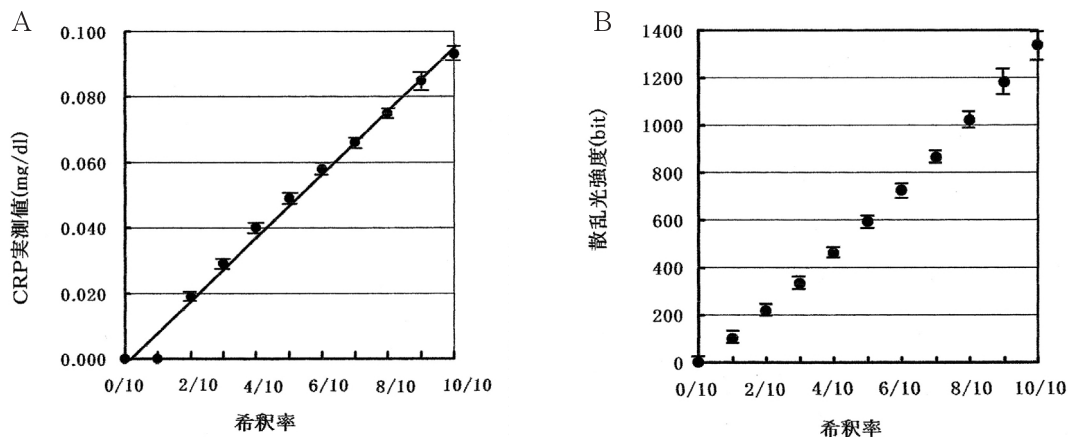


図1 希釈直線性
 A：CRP 濃度約 0.1mg/dl のプール血清（血清A）を N-希釈液で10段階に希釈したものをそれぞれ10重測定しグラフに示した。
 B：散乱光強度に換算して平均値±3SD で表し、各希釈段階での反応レベルを示した。

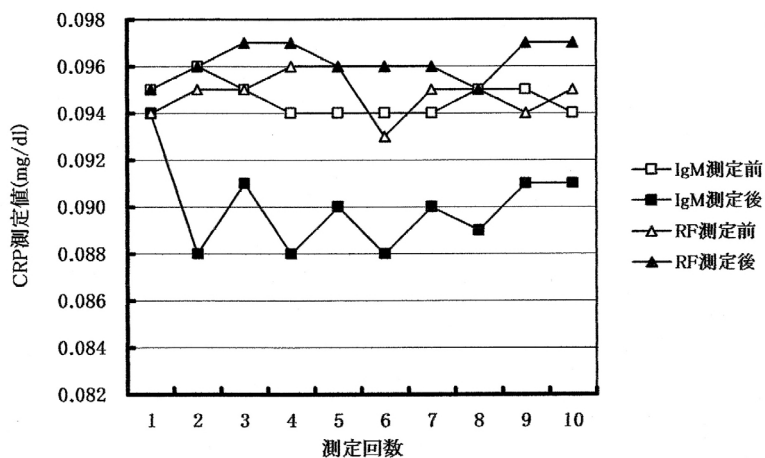


図2 IgM と RF の高濃度プール血清を対象にしたクロスコンタミネーション試験
 高濃度 IgM 試料および高濃度 RF 試料の測定前後に、CRP 濃度約 0.1mg/dl プール血清（血清A）を10重測定した。

図1-Bで確認した。

4. クロスコンタミネーション試験について

IgM 試料に関しては、IgM 試料測定前の血清 A の CRP 値は 0.094~0.096mg/dl, IgM 試料測定後は 0.088~0.094mg/dl であり、IgM 試料測定後は有意に低下した ($p < 0.001$)。RF 試料に関しては RF 試料測定前 CRP 値が 0.093~0.096mg/dl, 測定後が 0.095~0.097 mg/dl であり、CRP 値は RF 試料測定後に有意に高値を示した ($p < 0.002$) (表 4, 図 2)。以上より、IgM や RF 高値の検体が測定された時の影響は否定できなかった。しかし、各測定間にキュベット洗浄を行なった場合は CRP 測定値に有意差はみられなかった (結果省略)。

考 察

FDA は、1999年10月、CRP を 0.02mg/dl まで定量的に測定可能であり、かつ約 0.1mg/dl での CV が 3%以下の性能を有した CRP 測定法を高感度 CRP 測定法として、冠動脈疾患予知因子の評価に有効であるとして承認した。

今回の検討で、CRP 濃度約0.1mg/dl のプール血清を用いた同時再現性は CV 1.5%、日差再現性は2.9%と良好であった。希釈直線性の検討より、約 0.02mg/dl まで定量的に測定できることを確認し、本測定法が FDA

の承認した性能を満たしていることを確認した。IgM および RF 高値の試料を用いたクロスコンタミネーション試験の結果より、いずれも CRP 測定に干渉し、CRP は IgM 試料測定後には低値を示し、RF 試料測定後は高値を示すことが判明した。しかしキュベットプランクの測定を実行することで影響は除去された。また、現行では研究検体が主であり、他項目との連続測定は行なわず CRP 単独で測定しているため、問題は生じていない。

以上から、本キットを用いた高感度 CRP 測定が心筋梗塞の予知や新生児感染症の診断、その他の慢性炎症の管理などに応用されることを期待する。

文 献

- 1) 亀子光明, 青木義政, 阿藤 泉: CRP 高感度測定法とその基準範囲. 検査と技術, 30: 1201-1206, 2002.
- 2) 斎藤憲祐: 高感度 CRP (hsCRP) の定義と今後の動向. 生物試料分析, 26: 235-240, 2003.
- 3) 桑 克彦, 飯塚儀明, 池上 潔, 斎藤憲祐: BNII ネフェロメーターによる CRP 高感度測定法の性能評価. 日本臨床検査自動化学会誌 別冊, 25: 661-669, 2000.
- 4) 竹村 譲, 石田 博: 高感度 CRP 測定法の臨床的意義とその系統的再評価. BN NEWS, 6: 2-5, 2000.
(平成18. 5.10受付, 18. 6.29受理)