

LC-MS/MS用免疫抑制剤分析キットDOSIMMUNEの基本性能評価

©鈴木 瑛真¹⁾、村井 良精¹⁾、小林 亮¹⁾、田中 真輝人¹⁾、遠藤 明美¹⁾、浅沼 康一¹⁾、高橋 聡¹⁾²⁾
札幌医科大学附属病院 検査部¹⁾、札幌医科大学 医学部 感染制御・臨床検査医学講座²⁾

【目的】 cyclosporine(CSA)と tacrolimus(TAC)は、臓器移植後の拒絶反応抑制に用いられる薬剤であり、その効果予測および副反応を予防するために血中濃度モニタリングが必要な薬物である。従来これらの測定は、抗原抗体反応を原理とする免疫学的方法によって行われてきたが、代謝産物との交差反応が報告されていた。一方、LC-MS/MS法はその測定原理から、代謝産物による影響を受けず、特異的な測定が可能である。今回、高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMSTM-8060NX を用いた CSA および TAC 測定試薬 LC-MS/MS 用免疫抑制剤分析キット DOSIMMUNE の基本性能評価を行ったので報告する。

【対象および方法】 当院にて、CSA または TAC の血中濃度測定を実施した患者の残存 EDTA-2K 加血 80 例を用いた。検討試薬には LC-MS/MS 用免疫抑制剤分析キット DOSIMMUNE を用い、全自動 LCMS 前処理装置 CLAMTM-2030 と、高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMSTM-8060NX で測定した。対照試薬として、フレックスカートリッジシクロスポリン CSA およびフレックスカートリッジ

タクロリムス TAC を用い、Dimension EXL 200 で測定した。なお、基本性能は Validation-Support-V61 を用いて評価した。

【結果】 併行精度：CSA の変動係数 (CV) は 3.7~6.1%、TAC の CV は 4.2~7.3%であった。室内再現精度：CSA の CV は 8.5~12.0%、TAC の CV は 10.0~11.9%であった。定量限界：CSA の CV10 %値は 39.9 ng/mL、CV20 %値は 15.6 ng/mL であった。一方、TAC の CV10%値は 1.1 ng/mL、CV20%値は 0.5 ng/mL であった。直線性：CSA はキャリブレーター最高濃度である 2081.4 ng/mL まで、TAC は同じく 34.2 ng/mL まで直線性が保たれていた。相関性：CSA の相関係数 r は 0.99、標準主軸回帰式は $y=0.84x-8.29$ 、TAC の相関係数 r は 0.99、標準主軸回帰式は $y=0.69x+0.40$ であり、対照試薬で高値となる傾向を認めた。

【結語】 本試薬の基本性能は良好で、代謝産物と交差反応性を認めない測定法であることから、患者診断に有用であると思われる。また、ランニングコストは対照試薬と比較して安価であることから、検査コストの低減が期待できる。札幌医科大学附属病院検査部 - 0116112111 (内線 36460)

LC-MS/MS を用いた血中カフェイン濃度測定法の確立

©澁谷 斉¹⁾、林 泰弘¹⁾、梅森 祥央¹⁾、品川 雅明¹⁾
日本医療大学 保健医療学部 臨床検査学科¹⁾

【はじめに】

カフェインは、過剰に摂取すると、めまいや心拍数の増加などが起こる可能性があり、血中濃度測定法を確立することは意義のあるものと考えられる。我々は、LC-MS/MS を用いた血中カフェイン濃度測定法を確立し、その妥当性について検討したので報告する。

【方法および結果】

測定に用いた装置は、HPLC に ExionLC AC、MS に SCIEX QTRAP4500 (株式会社エービー・サイエックス) である。HPLC のカラムには、Kinetex2.6 μ m C18 2.1 \times 100mm を用い、移動相は A に 0.1M 酢酸水溶液、B を 0.1M 酢酸アセトニトリル溶液とした。MS は ESI および MRM モードにより検出を行った。尚、血清検体は、前処理として 4 倍量のメタノールにて除蛋白後の遠心上清を精製水で 20 倍希釈し、最終 100 倍希釈とした。

カフェイン高濃度水溶液を用いた直線性は、1000ppb まで良好な直線性を示した。ブランク上限 (LOB) は、ブランク試料の+3SD 点としたところ、0.12ppb であり、 \pm 2SD に

おける検出限界 (LOD) は、0.28ppb であり、定量限界

(LOQ) は、CV10%点とした場合、2.1ppb であった。カフェイン負荷したヒト血清検体を用いた 10 回連続測定の並行精度は 3.5~4.1% (4.82~10.54 μ g/mL) であり、10 日間の室内再現精度は、4.6~6.0% (5.16~10.39 μ g/mL) であった。添加回収試験における回収率は、92.0~100.9% であった。干渉チェック A プラス (シスメックス社製) を用いた干渉物質の影響については、ビリルビン F、ビリルビン C、ヘモグロビン、乳びいずれも影響を認めなかった。

【考察】

今回の検討結果から、2.1~1000ppb まで精確性よく干渉物質の影響を受けない測定系を確立することができた。この測定範囲を血清検体に置き換えた場合は、0.2~100 μ g/mL となり、間瀬らの報告で缶コーヒー 400mL 接種後のカフェイン濃度のピークが 10 μ g/mL 程度であることから、この測定系による血中カフェイン濃度測定は充分妥当性のあるものと考察された。

(連絡先:011-351-6100)

LC-MS/MS を用いたジギタリス由来中毒物質の測定

◎魚住 諒¹⁾、品川 雅明¹⁾
日本医療大学 保健医療学部 臨床検査学科¹⁾

【はじめに】ジギタリス属の植物にはジゴキシンやジギトキシンといった中毒物質が含まれる。ジゴキシンには強心作用があり慢性心不全の予防や治療に使用される。ジギトキシンは同様に強心作用を持つが、現在ジギトキシン製剤は販売中止となっている。ジギタリスは食用の野草と外観が類似しており、誤食による中毒の報告がある。その報告件数は極めて少ないため、実際には確定まで至っていない潜在症例も存在すると考えられる。確定診断には中毒物質の検出が必須であるが、現在ジギトキシン測定試薬は販売されていない。そこで今回我々は近年注目されている高速液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた測定法を検討した。

【方法】市販のプール血清にジゴキシンおよびジギトキシンを溶解し、数種類の濃度の疑似検体を調整した。固相抽出による前処理を行い、逆相カラムによる LC-MS/MS 解析を行った。移動相には 0.1%ギ酸を含む 10mM ギ酸アンモニウム水溶液 (A 液) とアセトニトリル (B 液) を用い、A 液 B 液の比率に直線的に勾配をかけて分離した。検出は

ポジティブイオンモードにおける選択反応検出 (SRM) 法を用いた。定量は内部標準法を用いた。

【結果】今回の測定系ではジゴキシンは 0.5~5 ng/mL の範囲で直線性を認め、良好な定量性が示された。ジギトキシン 5~50 ng/mL の範囲で直線性を認めた。

【考察】ジゴキシンの治療域は 0.5~2 ng/mL、中毒域は 2.5~3 µg/mL であり、ジギトキシンの中毒域は 30 ng/mL 以上とされる。今回得られた結果は LC-MS/MS によるジゴキシンおよびジギトキシン測定が治療域のモニタリング、および中毒域の判断に使用可能であることを示唆している。また、今回の前処理法では検体を最大 10 倍程度まで濃縮して測定することが可能であることを確認している。これは一般に市販されている抗原抗体反応を原理としたジゴキシン測定試薬の測定範囲 (0.2~5ng/mL) よりも高感度かつ広範囲である。その他ジギタリス由来中毒物質の代謝産物との交差反応がないことや有効期限がある測定試薬が不要であることもメリットであるといえる。

(011-351-6100)

ワクチン接種における新型コロナウイルス抗体産生の推移について

◎金子 紀子¹⁾、最上 久美子¹⁾、赤塚 れい子¹⁾
山形県立河北病院¹⁾

【はじめに】当院検査部職員のワクチン接種前後の血清を用いて、新型コロナウイルス(以下、SARS-CoV-2)のスパイクタンパク質に対する抗体(以下、S-IgG 抗体)の推移について調査を行った。なお、本調査は山形県立河北病院倫理委員会の承認を得ている(R03003)。

【対象および方法】対象は検査部職員で、調査に同意を得られた15名(男性:2名、女性:13名)。採血は、ワクチン接種前、1回目ワクチン接種1週間後、2週間後、3週間後、2回目ワクチン接種1週間後、2週間後、3週間後、2ヶ月後、5ヶ月後、8ヶ月後(3回目ワクチン接種直前)、3回目ワクチン接種1週間後、2週間後、3週間後、2ヶ月後、5ヶ月後に実施し、S-IgG 抗体測定を行った。検査試薬は(研究用)HISCLTM SARS-CoV-2 S-IgG を使用し、Sysmex 社(抗体受託測定サービス)に依頼した。ワクチンは3回ともファイザー社の新型コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン(SARS-CoV-2)を接種した。

【結果】カットオフ値 20.0BAU/mL(以下単位省略)。抗体価の中央値は、ワクチン接種前 1.0、1回目ワクチン接種1週

間後 0.7、2週間後 177.5 で抗体の産生を認め、3週間後 196.3 と抗体価はわずかに上昇した。2回目ワクチン接種1週間後 3327.0 で上昇のピークを認め、2週間後 2956.0、3週間後 2383.7、2ヶ月後 1173.3 でピーク時の35.5%に低下し、5ヶ月後 328.2 でピーク時の9.9%に低下、8ヶ月後(3回目ワクチン接種直前) 186.9 まで低下した。3回目ワクチン接種1週間後 5580.7、2週間後 5828.4 で上昇のピークを認め、2ヶ月後 4295.6 でピーク時の73.7%に低下し、5ヶ月後 1668.3 でピーク時の28.6%に低下した。

【まとめ】ワクチン接種前のS-IgG 抗体はいずれもカットオフ値以下だったため接種前の非感染が示唆された。ワクチン接種により全ての職員で抗体獲得が認められた。1回目接種の抗体価よりも2回目接種の抗体価は有意に高値を示し、さらに3回目接種の抗体価は大幅な上昇を認め、ブースター現象が見られた。連絡先 0237-73-3131

新型コロナウイルスワクチン追加接種必要性の検証

◎松本 晋¹⁾、堀 春奈¹⁾、小黒 千架子¹⁾
医療法人 北光会 朝里中央病院¹⁾

【はじめに】昨年度本学会において、ワクチン2回目接種後迄の抗体価を測定し、影響を与える因子の検討を行い発表した。スパイクタンパク質(SP)抗体は、年齢・喫煙・全身症状を伴う副反応で有意差を認め、免疫応答に関与すると考えられた。接種間隔延長者では、接種間隔が3週間の通常群と比較するとSP抗体は有意に上昇し、接種間隔の違いにより、3回目接種後抗体価も高い数値が得られると推測した。また検査課職員3名の2回目接種後抗体価は、経時的速やかに低下した。そこで今回我々は、2回目接種5か月後と、3回目接種5か月後抗体価を測定し、推移を観察すること、喫煙歴や、厚労省が4回目接種対象とした接種後期間・年齢・基礎疾患・BMIと抗体価の関連性を比較することで、今後のワクチン接種の必要性を検討した。

【対象・方法】BNT162b2-mRNA ワクチンを3回接種した職員及び透析患者を対象とした。2回目接種4週後は職員115名、2回目接種5か月後は職員83名を対象とした。3回目接種5か月後は職員305名と外来透析患者30名を対象とした。喫煙歴・接種回数・年齢・基礎疾患・BMI・既

感染における抗体価の比較を行った。抗体試薬はAIA-CL用SARS-CoV-2-SP-IgG抗体試薬、AIA-CL用SARS-CoV-2-SP-Total抗体試薬、AIA-CL用SARS-CoV-2-NP-Total抗体試薬を用いた。機器は全自動化学発光酵素免疫測定装置:AIA-CL1200(東ソー社製)を用いた。

【結果】2回目接種4週後抗体価と比較すると、2回目接種5か月後は有意に低下したが、3回目接種5か月後はSP-IgGは同程度、SP-Totalは10倍以上高値であった。喫煙歴・年齢・基礎疾患・BMIは、3回目接種5か月後では影響を認めなかった。既感染者であるヌクレオカプシドタンパク質(NP)抗体陽性群は陰性群と比較すると有意に上昇した。3回目接種後抗体価推移は、2回目と比べ緩やかな低下であった。

【考察】厚労省が掲げる4回目接種対象者の抗体価数値は、健常者と比較し優位差は認められなかった。抗体価数値がCOVID-19重症化に関係するのであれば、個人の抗体価が低いものを接種対象者とする検討も必要だと考えられた。連絡先:0134-51-2315

ワクチン接種後の SARS-CoV2 抗体価について

◎三上 英子¹⁾、手代森 隆一¹⁾、瀬川 恵¹⁾、田中 孔明¹⁾、佐藤 優子¹⁾
 青森県立中央病院¹⁾

【はじめに】

昨年の北日本学会で新型コロナウイルスに対するワクチン接種後の抗体価について報告した。今回我々はその後の抗体価と3回目ワクチン接種による抗体価の推移、及び中和抗体について検討したので前回分もふまえ報告する。

【対象及び方法】

採血検査の同意が得られた臨床検査部/病理部、薬剤部、感染管理室の職員 101 人を対象とし、ビトロス SARS-CoV-2 S1 IgG quant 抗体試薬：オーソ（以下 IgG 抗体）、Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S RUO：ロシュ（以下 Total 抗体）、STACIA SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Test：MBL（以下中和抗体）を使用し抗体価及び中和抗体を測定した。測定は、①2回目接種3カ月後、②2回目接種6カ月後、③2回目接種約8カ月（3回目接種直前）、④3回目接種1カ月後、⑤3回目接種3カ月後の計5回であり、これに前回の報告に使用したデータを加え検討した。なおこの検討は青森県立中央病院倫理審査委員会の承認を得て行った。

【結果】

抗体価のピークはそれぞれ IgG 抗体：2回目接種1週間後、Total 抗体：3回目接種1か月後、中和抗体：3回目接種1か月後であった。中和抗体は3回目接種後3カ月で2回目接種3カ月後の5.6倍であった。また、3回目接種後では各抗体ともに上昇がみられた。

平均値	接種前	1回目接種 1ヵ月後	2回目接種 1ヵ月後	2回目接種 6ヵ月後	2回目接種 8ヵ月後	2回目接種 6ヵ月後	2回目接種 8ヵ月後	3回目接種 1ヵ月後	3回目接種 3ヵ月後
IgG抗体	2.0	2.1	2917.5	2014.7	409.5	178.9	119.5	2461.3	1425.2
Total抗体	0.4	0.4	2997.6	1763.0	1052.6	754.4	650.4	11434.0	7582.0
中和抗体					4.7	2.9	2.5	38.9	26.1

【まとめ】

3回目接種直前の抗体価は、2回目接種後のピークである1週間後と比べ、IgG抗体で約1/25、Total抗体で約1/5まで低下していた。3回目ワクチン接種1ヵ月後では2回目ワクチン接種1ヵ月後の抗体価と比べ高値であり、3回目接種で大幅な抗体価の上昇がみられた。

連絡先：017-726-8270（直通）

新型コロナウイルスワクチン接種後の抗体価推移と副反応について

◎林 泰弘¹⁾、磯辺 正道¹⁾、澁谷 斉¹⁾、浅沼 広子¹⁾、梅森 祥央¹⁾、徳永 祐一¹⁾、品川 雅明¹⁾
日本医療大学 保健医療学部 臨床検査学科¹⁾

【目的】新型コロナウイルスに対する mRNA ワクチンは、ウイルス表面に存在するスパイク蛋白質に対する抗体（S 抗体）を誘導する。S 抗体は、ウイルスとヒト細胞との結合を阻害するため中和抗体としての活性を有し、感染予防効果を発揮すると考えられている。そこで今回、ワクチン接種後の S 抗体価の推移、および副反応との関連について調査した。【対象】BNT162b2-mRNA ワクチンまたは mRNA-1273 ワクチンを 2 回接種し、書面同意が得られた大学生、病院・高齢者施設職員、高齢者施設入所者を対象とした。2 回目ワクチン接種 2 週間後の抗体価測定は男性：125 名、女性：242 名（年齢：18-104 歳、中央値 23 歳）の計 367 名であった。また、6 か月後の抗体価測定は上記 367 名のうち、男性：40 名、女性：165 名（年齢：18-101 歳、中央値 57 歳）の計 205 名であった。【方法】抗体価測定は、測定機器：VITROS XT 7600、測定試薬：ビトロス SARS-CoV-2 IgG 抗体試薬（オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社）を用いた。また、性別・年齢・各副反応の有無に関するアンケート調査を行った。

【結果】2 回目ワクチン接種 2 週間後の抗体陽性率は全体で 97.8%であったのに対し、6 か月後は 82.0%まで低下した。特に 70 歳以上では 92.2%から 56.6%となり、他年代と比べて低下が顕著であった。年代別の抗体価で比較すると、ワクチン接種 2 週間後の中央値（BAU/mL）は、18-29 歳：4,610、30-49 歳：3,100、50-69 歳：2,235、70 歳以上：993 であった。一方、ワクチン接種 6 か月後では、18-29 歳：364、30-49 歳：79.0、50-69 歳：76.3、70 歳以上：23.4 であった。抗体残存率（6 か月後抗体価/2 週間後抗体価）は、18-29 歳：8.8%、30-49 歳：2.7%、50-69 歳：3.4%、70 歳以上：1.5%であった。副反応と抗体価の関連性については、出現率の高い上位 5 項目（疼痛、体温、倦怠感、頭痛、悪寒）において、ワクチン接種 2 週間後の抗体価との相関を調べたところ、疼痛の有無でのみ有意差が認められた。【結論】各年代において、6 か月後の抗体残存率は極めて低値となった。また、年齢が上がるにつれて、その減少は顕著に認められた。この結果より、追加のワクチン接種は有益と考えられる。連絡先：011-351-6100

臨床症状および抗核抗体パターンと矛盾した各種自己抗体陽性を認めた1症例

◎菊地 菜海¹⁾、山下 直樹¹⁾、安田 慶子¹⁾、渡邊 千秋¹⁾
北海道大学病院¹⁾

【はじめに】抗核抗体（ANA）の検査は主に自己免疫疾患のスクリーニングに用いられる。また、疾患特異自己抗体の検査はANA陽性の場合に実施され、診断等に用いられる。今回我々は、臨床所見およびANAパターンと矛盾し各種自己抗体陽性を認めた症例を経験したので報告する。

【症例】20歳代女性。発熱および乾性咳嗽の精査のため当院紹介となった。ANAは320倍・均質型（フルオロHEPANA-2テスト）、各種自己抗体は抗RNP抗体・抗Jo-1抗体・抗SS-A抗体・抗SS-B抗体・抗Scl-70抗体・抗Sm抗体・抗CENP-B抗体が陽性、抗ds-DNA IgG抗体・抗CCP抗体・MPO-ANCA・PR3-ANCAが陰性となった（いずれもステイシアMEBLuxTMテスト）。発熱以外には積極的に自己免疫疾患を疑う所見は無く、画像および病理所見から最終的に悪性リンパ腫の診断となった。ANAの染色型と自己抗体陽性パターンの不一致、複数の自己抗体陽性結果から非特異反応を疑い、精査を実施した。

【方法】自己抗体検査について①二重免疫拡散法（DID法）との比較、②抗原添加試験、③試薬成分との反応確認試験、

④抗体クラス別の非特異反応の確認試験を実施した。

【結果】①DID法は全て陰性となった。②いずれも反応性の阻害を認めなかった。③磁性粒子としてブランク粒子を用いたところ反応を認めた。さらに、バッファだけで反応させたところ同等の反応を認めた。④バッファのみでの条件下でIgG・IgM・IgA抗体いずれも反応性を示したが、特にIgM抗体が反応していた。

【考察】本症例はバッファのみでも反応性を認め、IgMが相対的に強く反応したことから、IgM抗体による非特異反応の可能性が高いことが確認された。

本症例で陽性となった抗体の試薬は、標識抗体に抗ヒトイムノグロブリン抗体を用いているが、陰性となった抗体の標識抗体には抗ヒトIgG抗体を使用しているため、標識抗体に用いられる抗体クラスの違いで発光量に差が生じたと考えられた。

ANAの染色型と矛盾した自己抗体陽性を認めた場合、他の検査や所見等も確認しながら慎重に判断する必要がある。
連絡先：011-706-5710（DI）

自己抗体により心筋トロポニン I と T が極端に乖離した小児 2 症例

◎中野 恵一¹⁾、安田 慶子¹⁾、渡邊 千秋¹⁾
北海道大学病院¹⁾

【背景】心筋トロポニン(cTn)I と cTnT は心筋に特異的な構造を持つことから、心筋障害を反映するバイオマーカーとして利用されている。しかし我々は両者が必ずしも平行に推移しないことを報告した(中野ら. 臨床化学. 2019)。今回、cTnI と cTnT が極端に乖離した小児 2 症例を経験し、その原因を解析したので報告する。

【症例】10 代男児(症例 1)と 10 代女児(症例 2)。症例 1, 2 ともに呼吸苦・胸痛を自覚し、近医を受診。心電図・心エコー検査では明らかな心筋虚血を疑う所見ないものの、高感度(hs)-cTnI は高値であり、当院紹介。cTnI について精査依頼時、症例 1 は hs-cTnI: 495 pg/mL、hs-cTnT: <5 pg/mL、症例 2 の hs-cTnI: 4420.0 pg/mL、hs-cTnT: 5 pg/mL であった。

【方法】

1. Protein G を用いた吸収試験
2. ゲルろ過 HPLC による溶出ピーク確認

【結果】

1. 吸収後、症例 1 は hs-cTnI: <4.0 pg/mL、cTnT: <5 pg/mL、症例 2 は hs-cTnI: 7.4 pg/mL、cTnT: <5 pg/mL であった。

2. 症例 1、2 ともに cTnI のゲルろ過 HPLC 溶出ピークは、cTnI や cTnI-C 複合体よりも大きい位置に確認された。

【考察】吸収試験の結果から、IgG が hs-cTnI の測定に関与していること、ゲルろ過分析の結果から、IgG と cTnI が結合していることが示唆された。さらに IgG, A, M に一致する位置に hs-cTnI の溶出ピークが確認されず、異好抗体の関与は示唆されなかった。以上より、cTnI に IgG が結合し血中クリアランス遅延により、cTnI と cTnT に極端な乖離が生じていると考えられた。

cTnI や cTnT に対する自己抗体は、試薬の抗体とエピトープ競合により偽低値化したり、半減期上昇により高値化したりする症例が報告されている。つまり、心筋障害を伴う慢性疾患では、自己抗体の産生が示唆され、cTnI と cTnT の乖離が生じると考えられるが、本症例のように小児例での報告はない。したがって、小児においてもこのようなトロポニン測定のパットフォールが潜んでいることを認識しておくことが必要であると考えられた。

連絡先 011-706-5712