

第47回 国臨協関信支部学会
《学会企画》学術委員による分科会（血清部門）

免疫検査の基礎とピットフォール

NHO相模原病院 臨床検査科

田中 暁人

井田 貴明

本日の内容（基礎編）

- 測定原理と測定法の種類
- 各メーカーの測定技術紹介（アニメーションあり）
- メーカー別測定値の違い
- 各メーカー別測定項目の違い
- まとめ

標識免疫高感度測定法変遷



RIA IRMA

EIA CLEIA

放射性免疫測定法（RIA法） 1957年

酵素免疫測定法（EIA法） 1972年

蛍光免疫測定法（FIA法） 1975年

発光免疫測定法（LIA法） 1982年

CLIA

ECLIA

- ✓ **CLEIA法**：化学発光酵素免疫測定法
- ✓ **CLIA法**：化学発光免疫測定法
- ✓ **ECLIA法**：電気化学発光免疫測定法

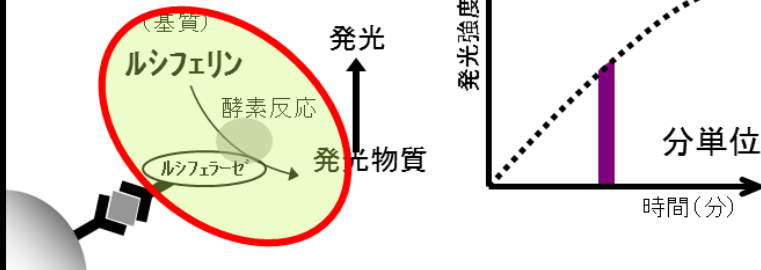
化学発光測定法の種類

間接測定

測定対象を間接的に反映

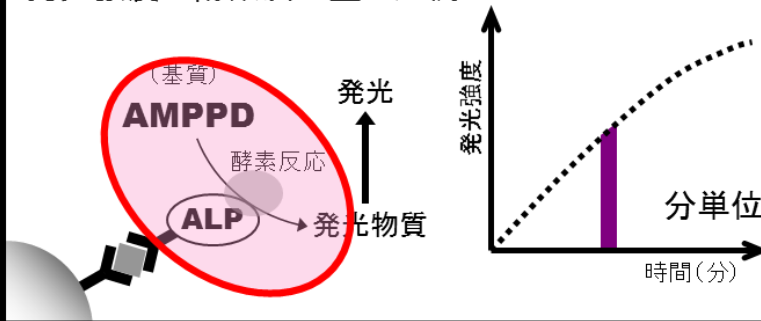
BLEIA

発光強度は酵素反応量に比例



CLEIA

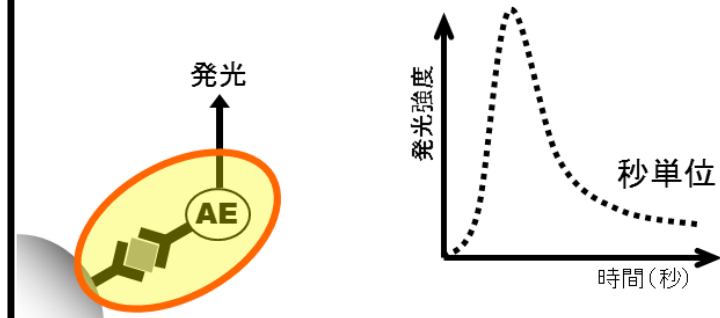
発光強度は酵素反応量に比例



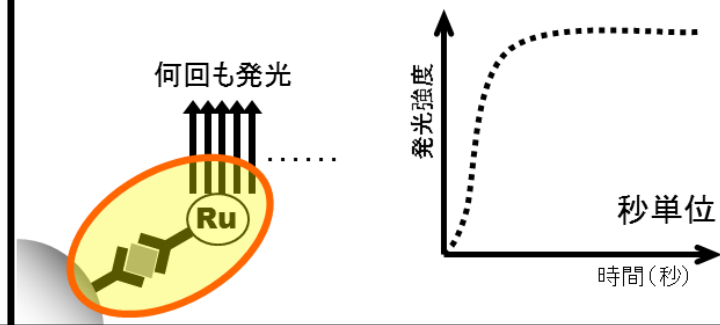
直接測定

測定対象を直接に反映

CLIA



ECLIA



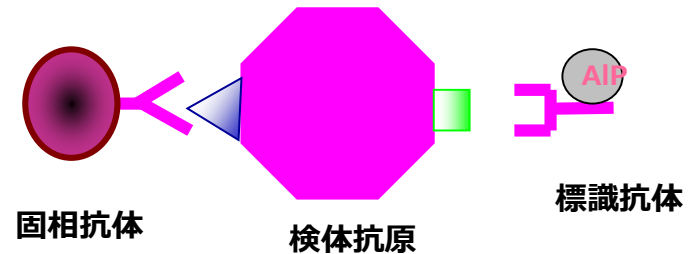
サンドイッチ法、競合法

✓ サンドイッチ法

2種類以上の抗体(抗原)を用いて、測定抗原(抗体)をサンドイッチして測定する方法

1ステップ(B/F分離が1回)

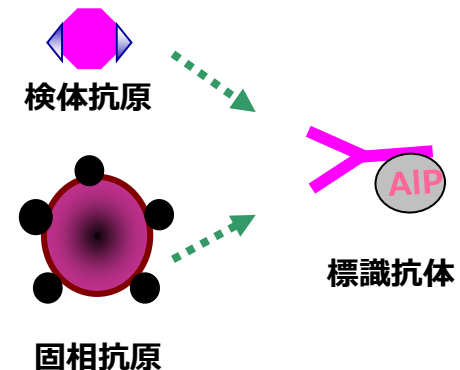
2ステップ(B/F分離が2回)



✓ 競合法

測定対象にエピトープが一つしかない抗原、または抗体をサンドイッチすることが難しい低分子物質を測定する場合に原則用いられる。

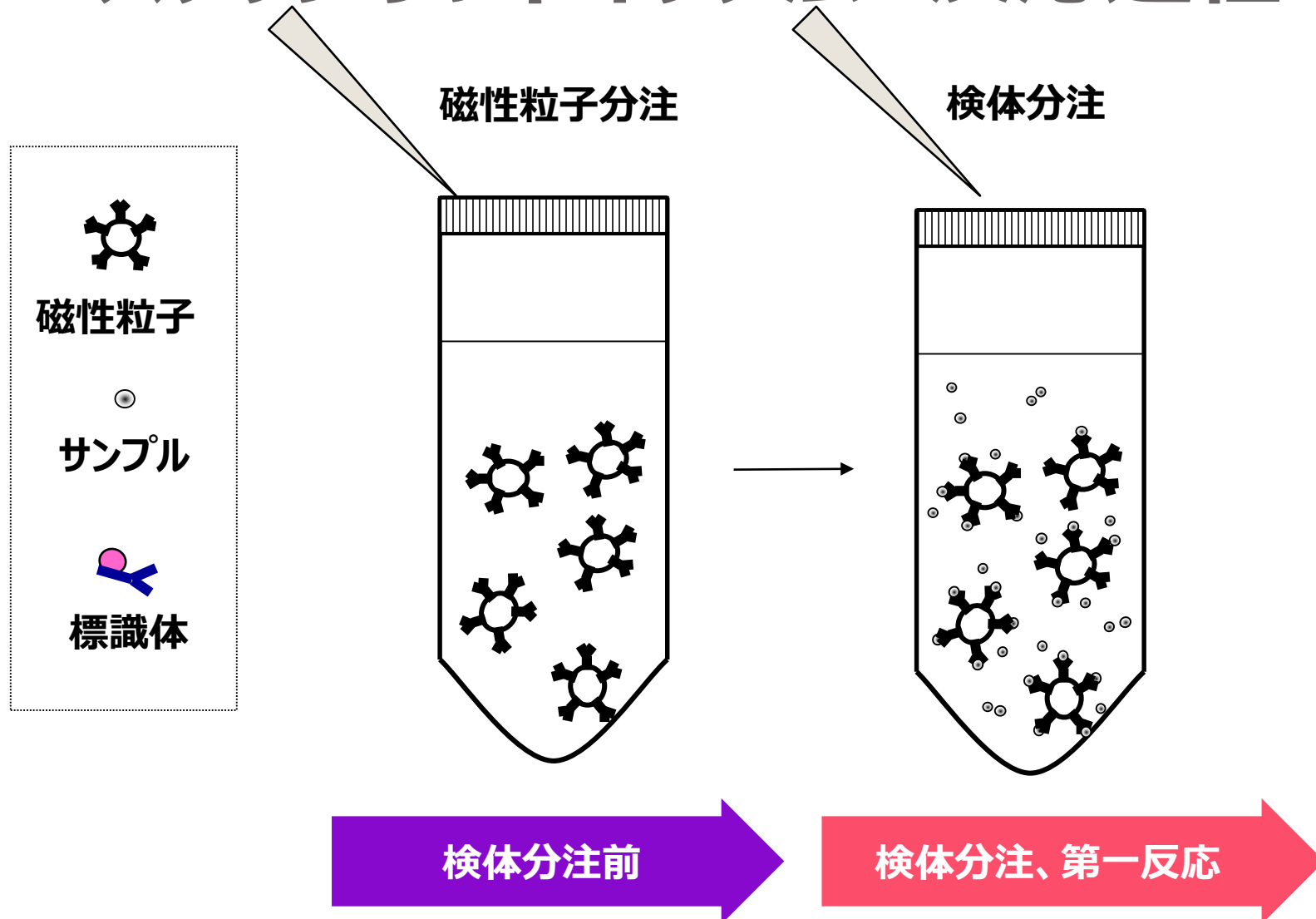
固相抗原(抗体)、標識抗原(抗体)、
検体中の抗原(抗体)による競争反応を
利用して測定する方法



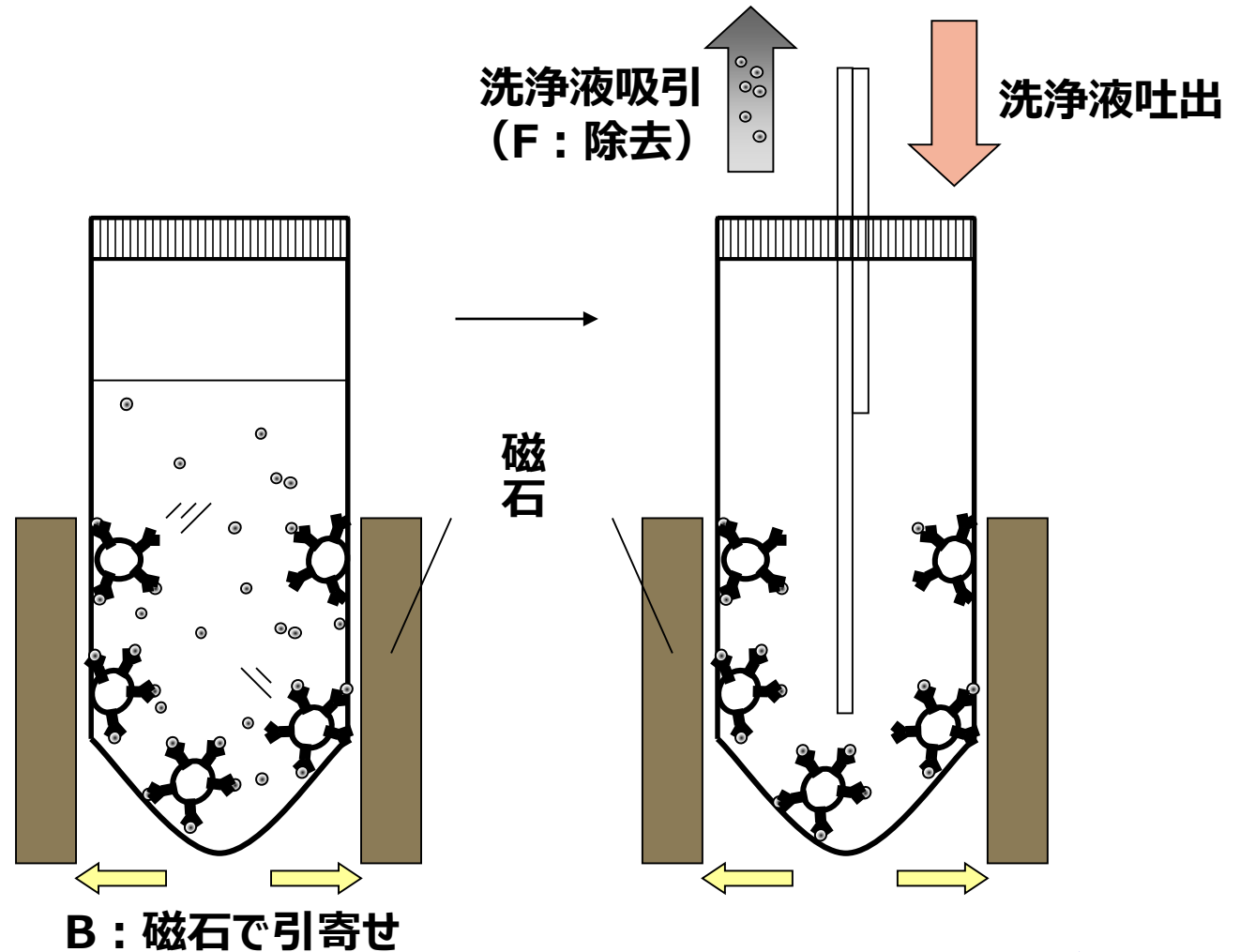
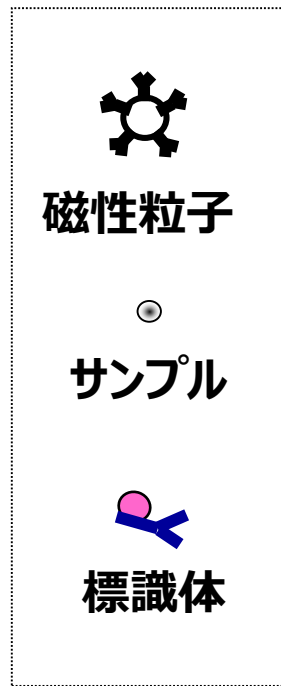
高分子はサンドイッチ法、低分子は競合法で測定される

項目	サンドイッチ法	項目	競合法
腫瘍	CEA,AFPⅡ,CA199XR,CA125Ⅱ,CA15-3 PSA, FreePSA、SCC,ProGRP,シタラ,PG1/2,	甲状腺 ホルモン	FreeT4/T3 TotalT4/T3
肝炎	HBsAgQT, HBsAb,HBcAb,HBcIgM, HBeAg/Ab, HCV.HAVAbIgM/G, HIVAg/Ab, TPAb,HTLV,CMV	性ホルモン	テストステロン プロゲステロン エストラジオール
心筋	トロポニンI,CK-MB,ミオグロビン, BNP・JP		
内分泌	LH,FSH, プロラクチン, β-HCG		
代謝	フェリチン, インスリン,コルチゾール		

2ステップサンドイッチ法 反応過程

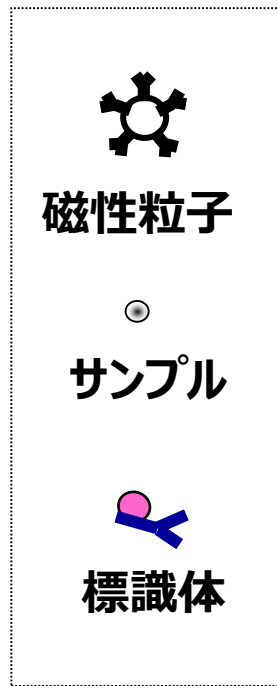


2ステップサンドイッチ法 反応過程

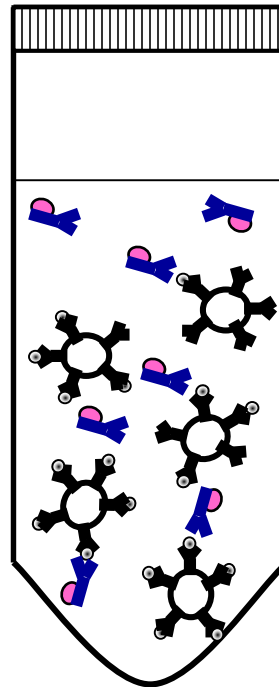


第一洗浄 (B/F洗浄)

2ステップサンドイッチ法 反応過程

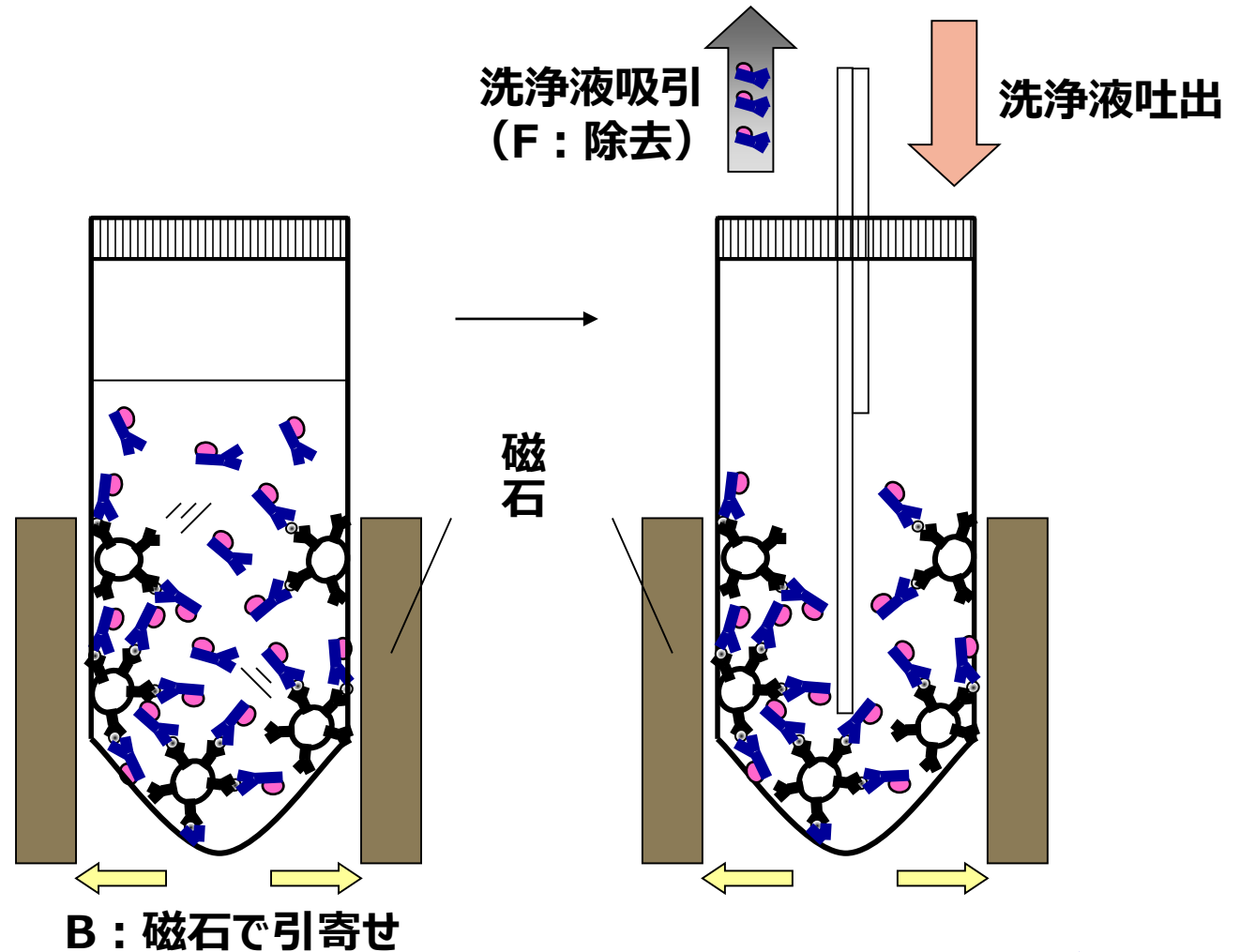
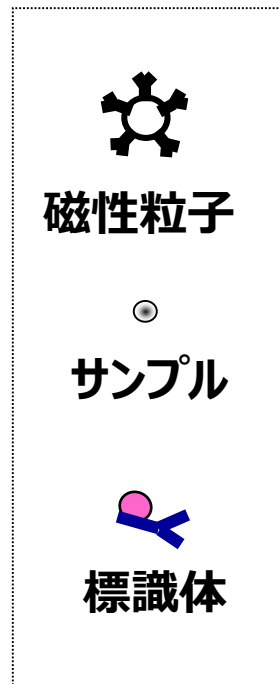


標識体分注



標識体分注、第二反応

2ステップサンドイッチ法 反応過程



第二洗浄 (B/F洗浄)

2ステップサンドイッチ法 反応過程

基質液分注

磁性粒子

サンプル

標識体

AMPPD

AMPPD

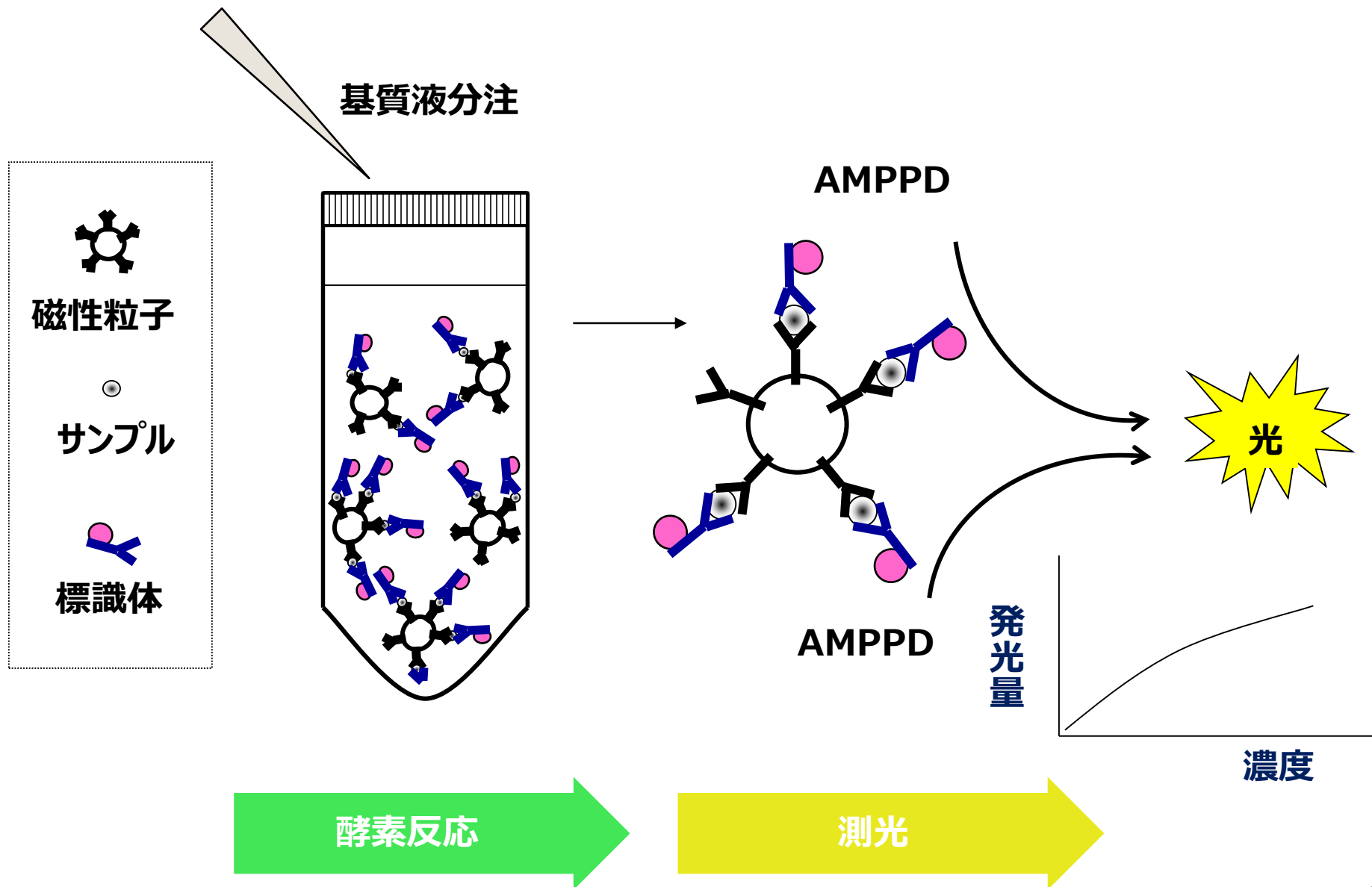
発光量

濃度

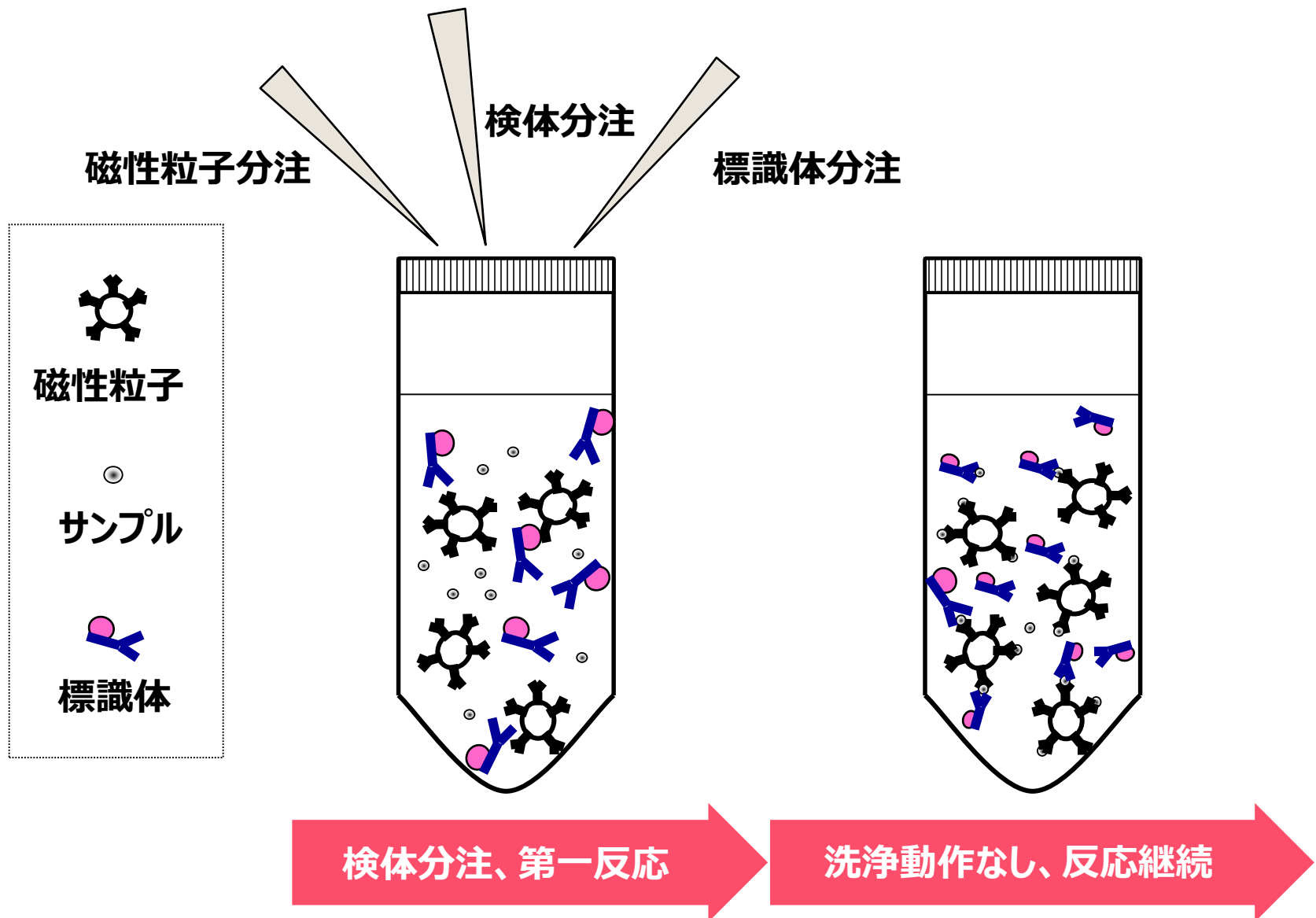
酵素反応

測光

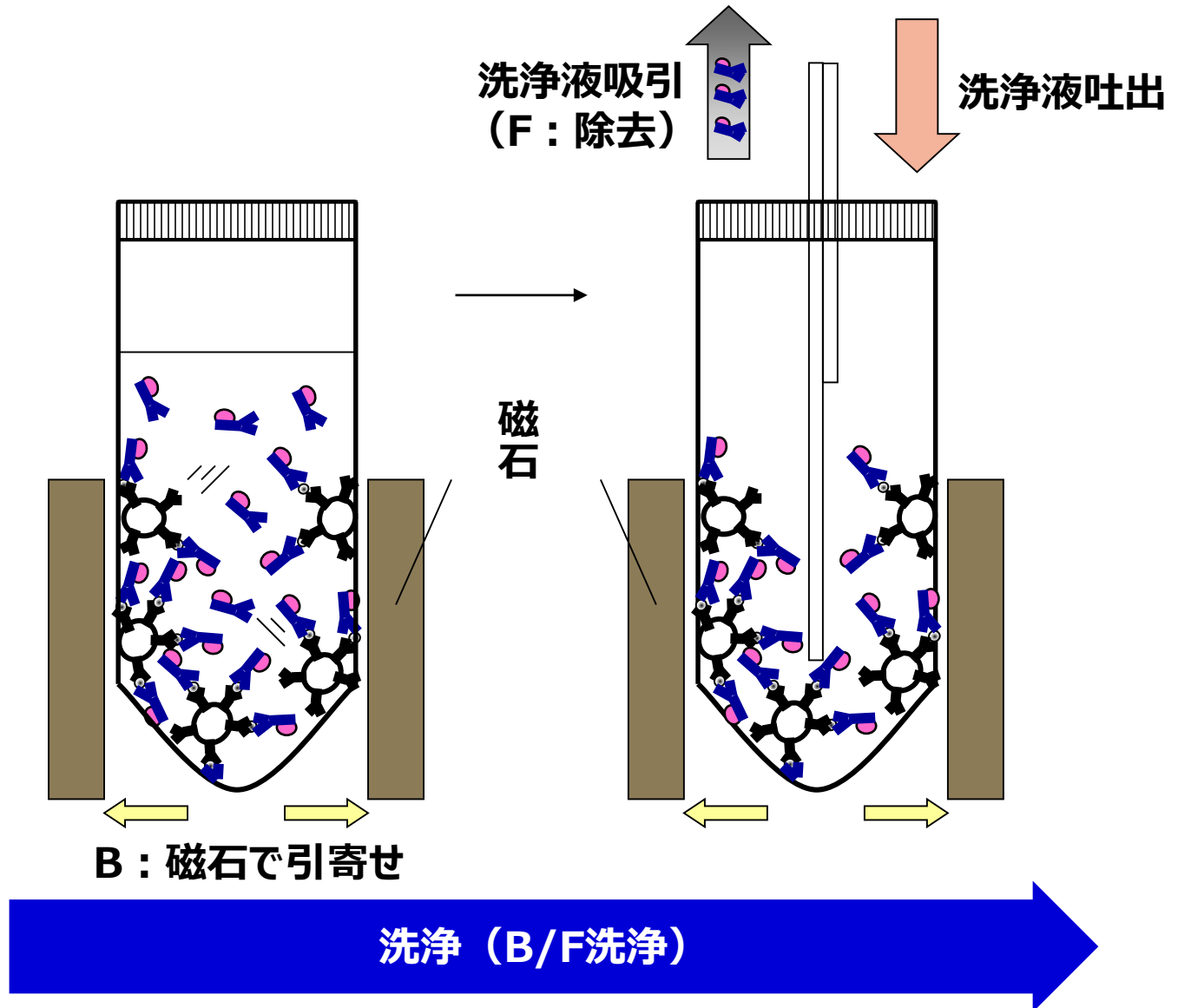
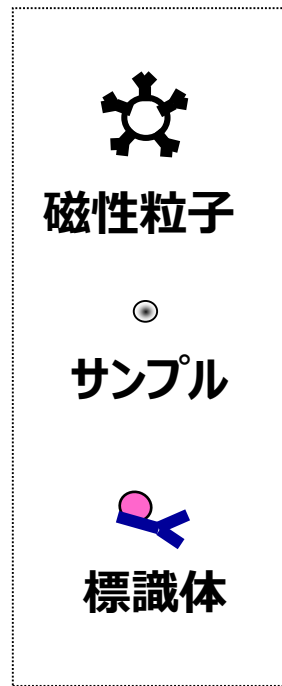
光



1ステップサンドイッチ法 反応過程



1ステップサンドイッチ法 反応過程



1ステップサンドイッチ法 反応過程

基質液分注

磁性粒子

サンプル

標識体

AMPPD

AMPPD

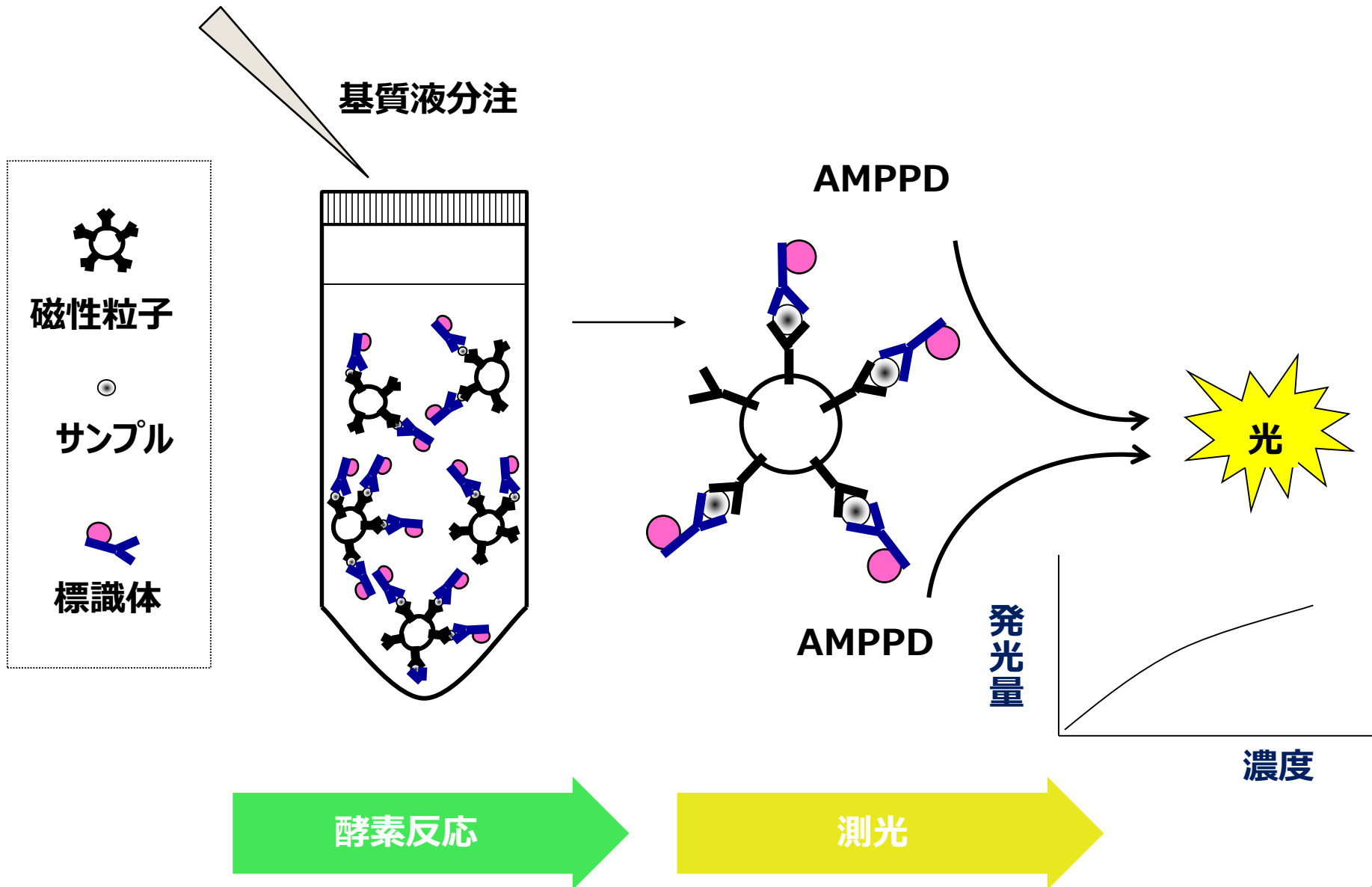
発光量

濃度

酵素反応

測光

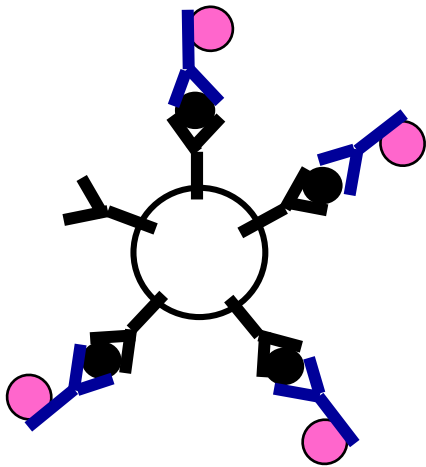
光



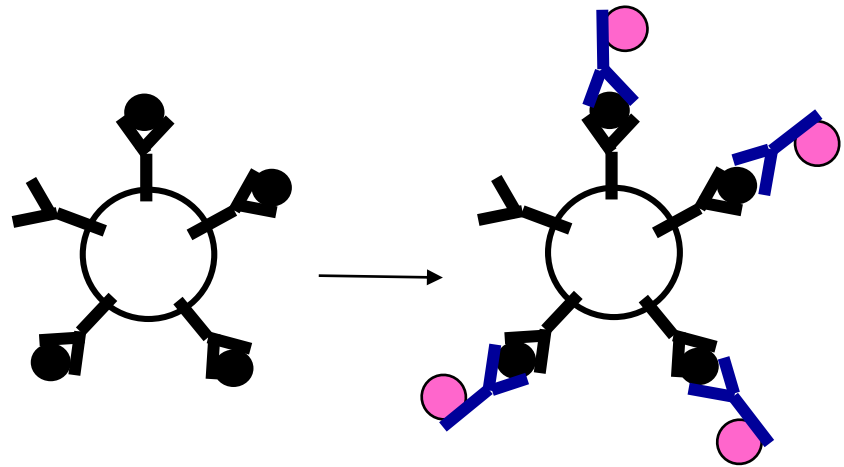
1ステップサンドイッチ法 メリット

✓ 1ステップ サンドイッチ法

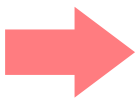
メリット: 2ステップ法に対し、抗原抗体反応時間を長く設定できるため、高感度し易い



1ステップ サンドイッチ法



2ステップ サンドイッチ法

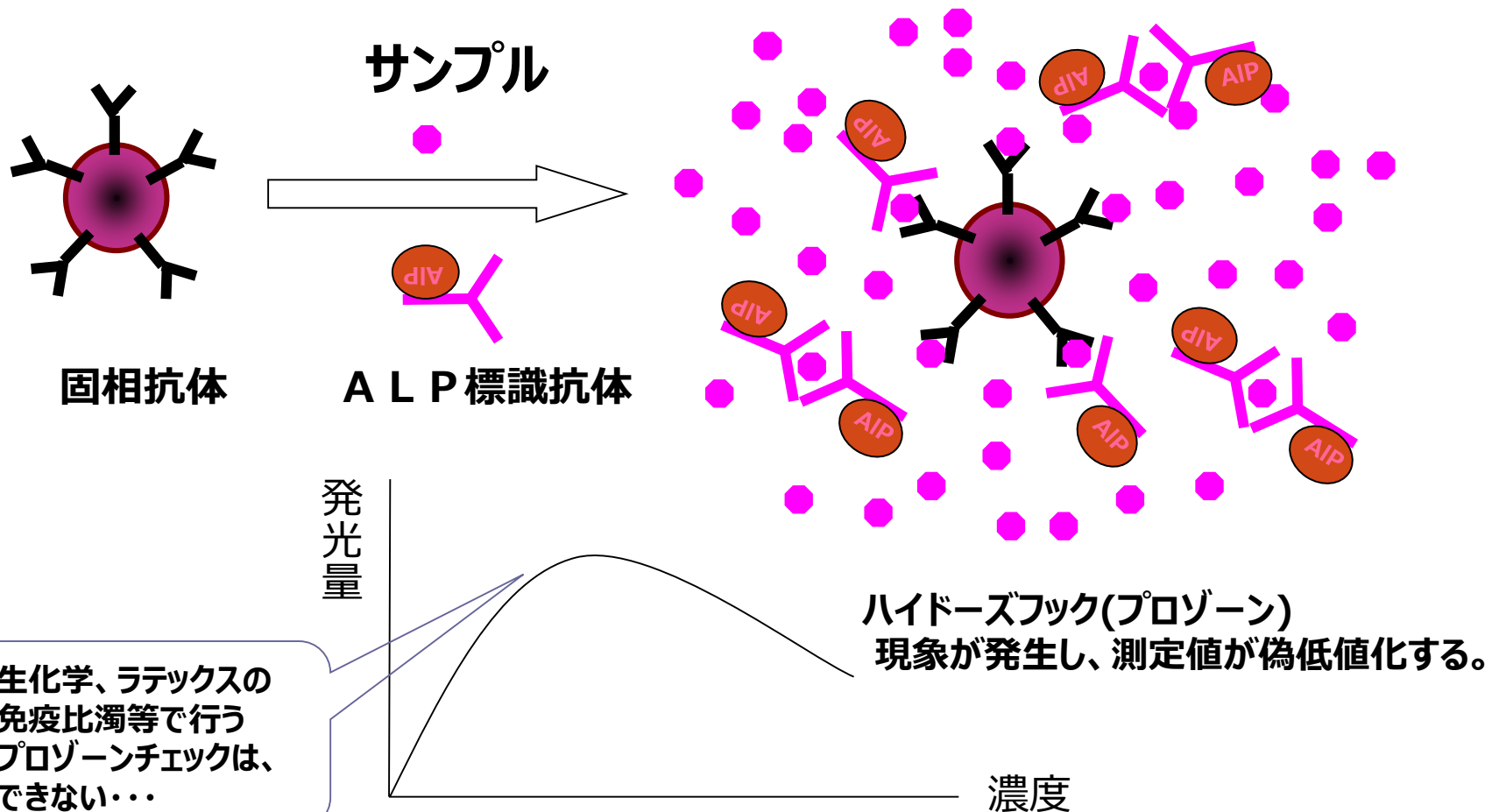


1ステップサンドイッチ法の方が、同じ反応時間内で
抗原抗体サンドイッチの複合体を多くつくれる。

1ステップサンドイッチ法 デメリット

✓ 1ステップ サンドイッチ法

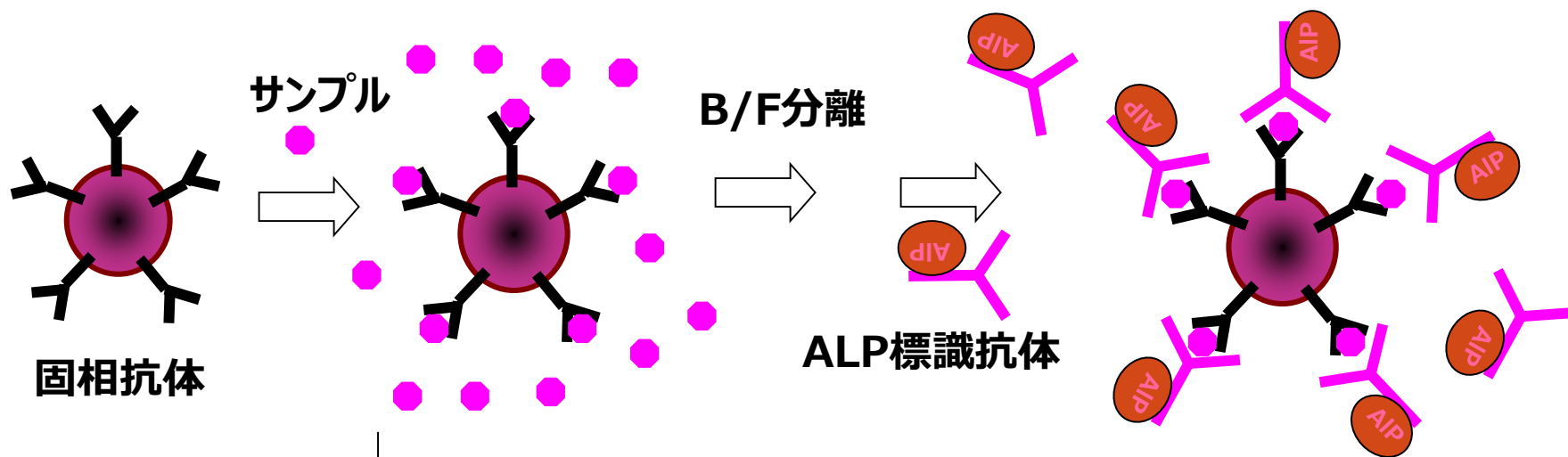
デメリット: 測定対象物(抗原または抗体)が大過剰になると、ハイドースフック(プロゾーン)現象が発生し、偽低値化する。



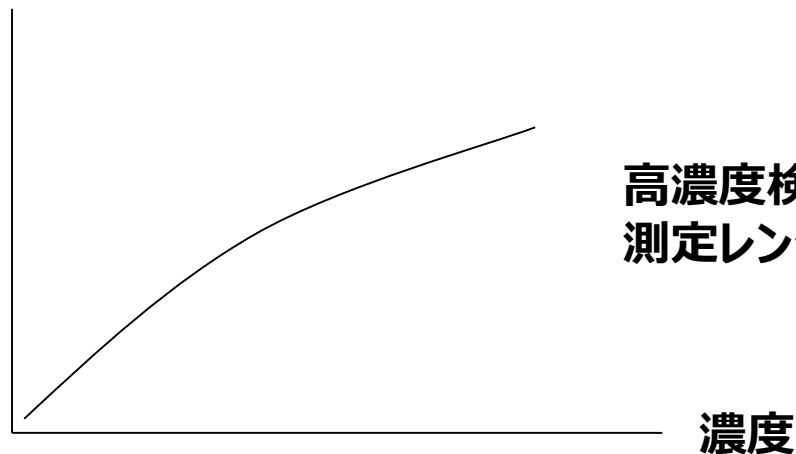
2ステップサンドイッチ法 メリット

✓ 2ステップ サンドイッチ法

メリット: 測定対象物(抗原または抗体)が大過剰になっても、B/F分離を2回行うためハイドースフック(プロゾーン)現象が発生しない。



発光量



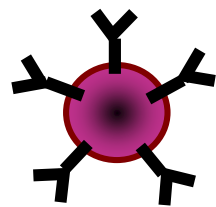
高濃度検体は
測定レンジオーバーとなる。

2ステップサンドイッチ法 デメリット

✓ 2ステップ サンドイッチ法

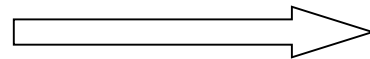
デメリット: 1ステップ法に対し、抗原抗体反応時間を長く設定できないため、高感度し難い

1ステップ サンドイッチ法

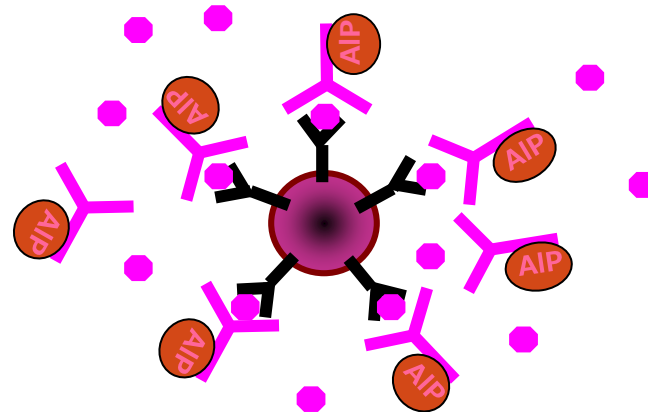


固相抗体

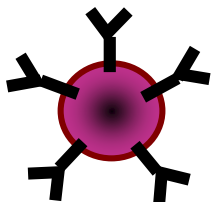
サンプル



ALP標識抗体

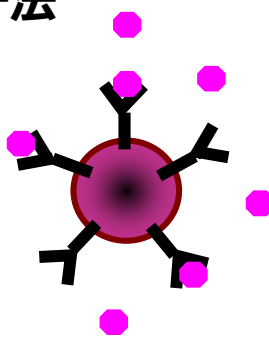
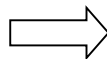


2ステップ サンドイッチ法

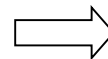


固相抗体

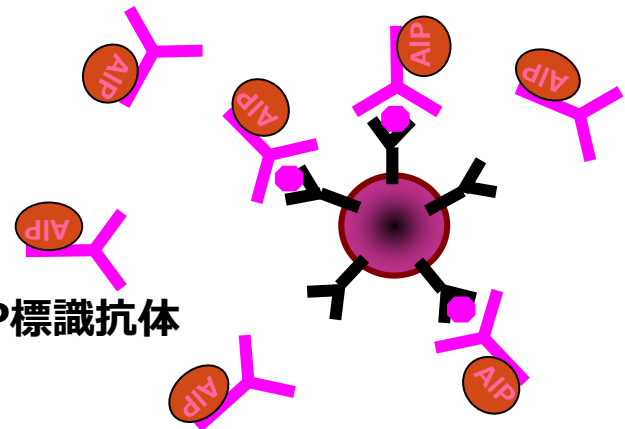
サンプル



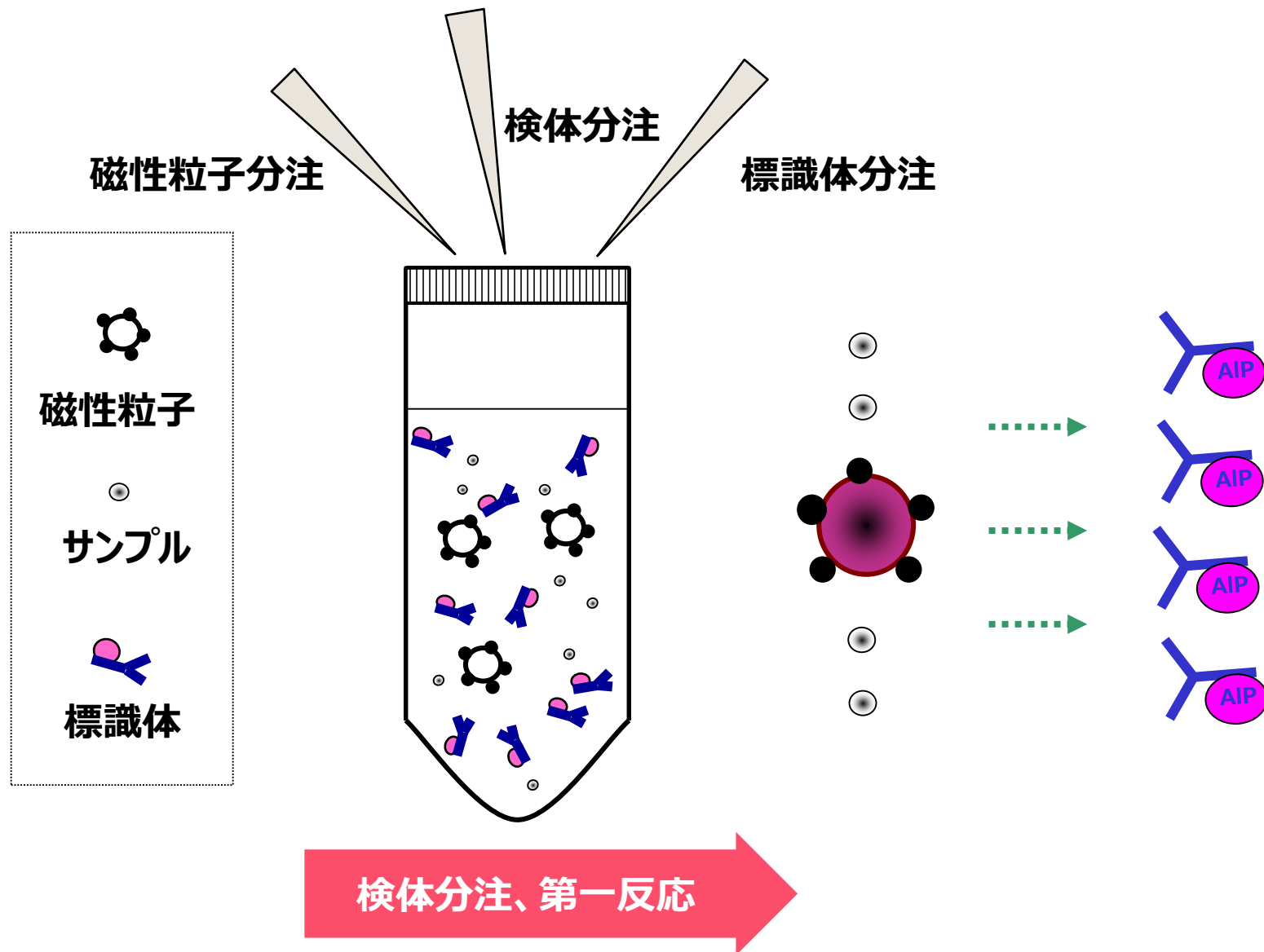
B/F分離



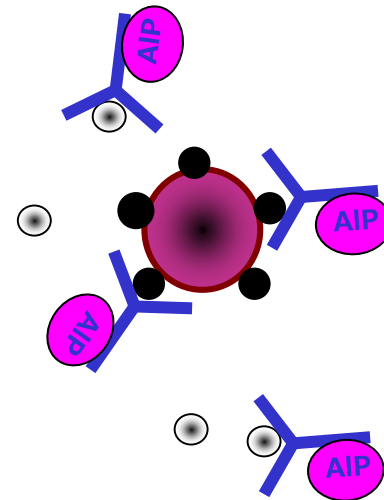
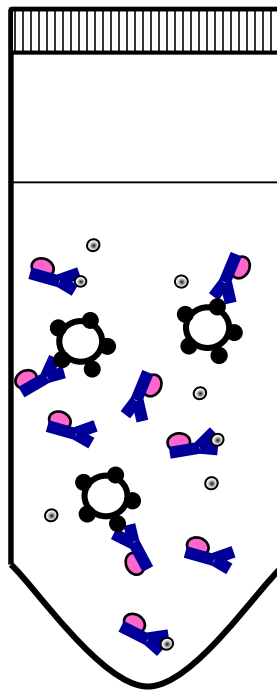
ALP標識抗体



1ステップ競合法 反応過程

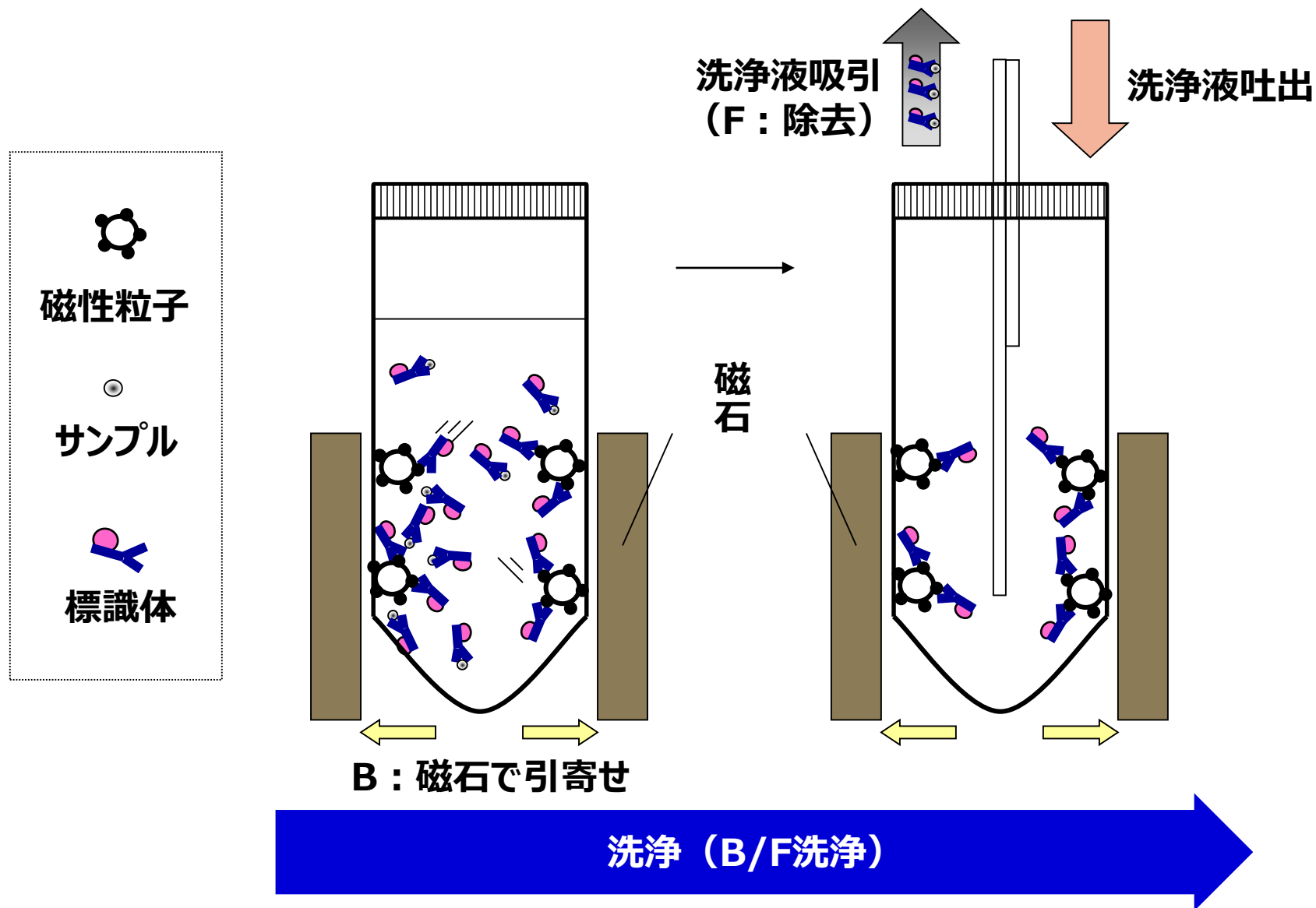


1ステップ競合法 反応過程



洗浄動作なし、反応継続

1ステップ競合法 反応過程



1ステップ競合法 反応過程

基質液分注

磁性粒子

サンプル

標識体

AMPPD

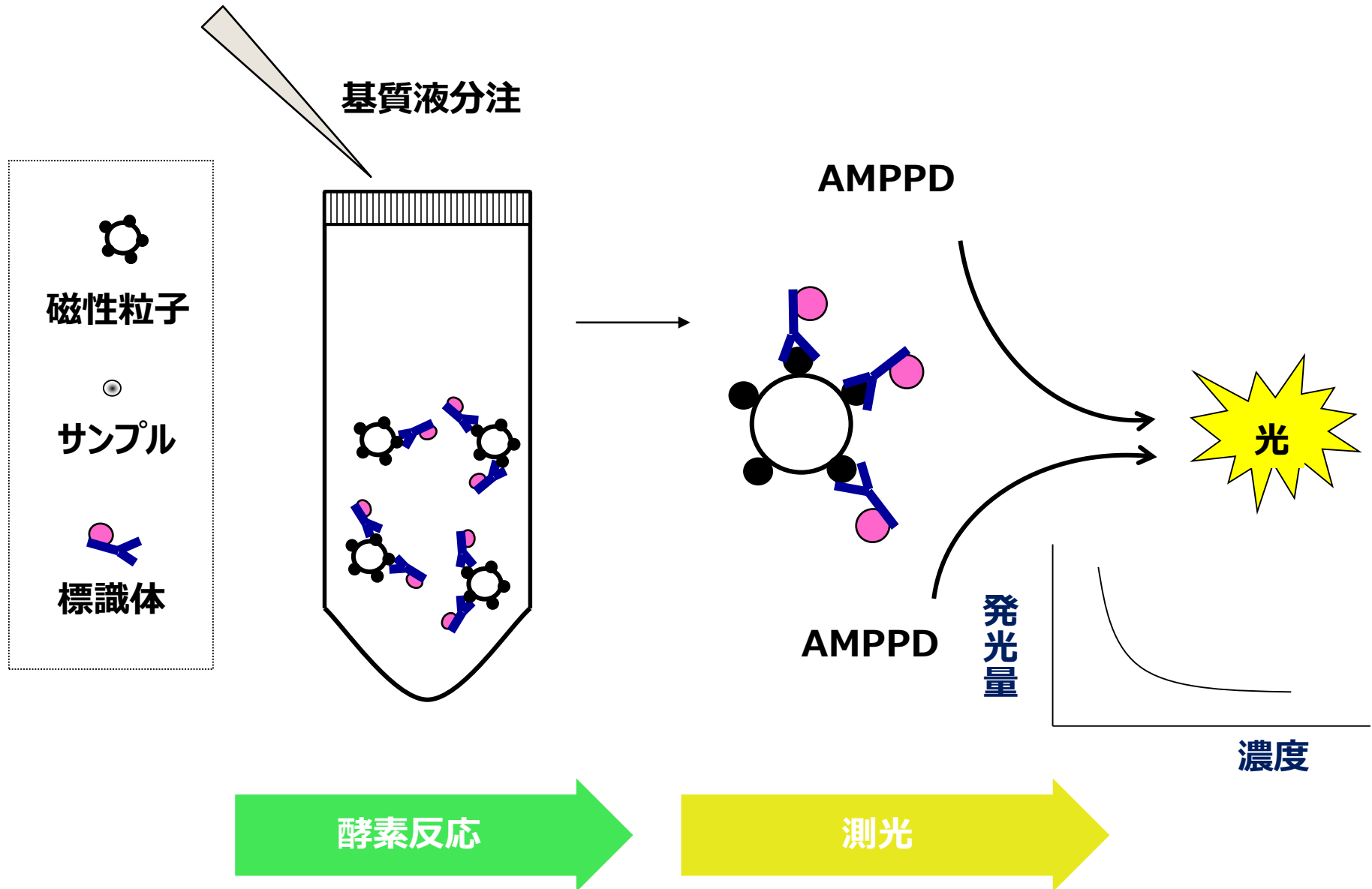
光

発光量

濃度

酵素反応

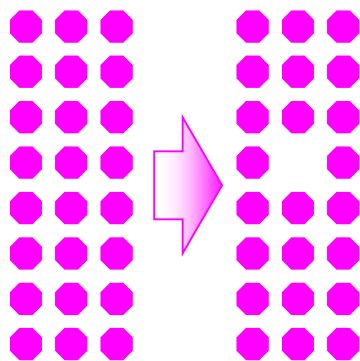
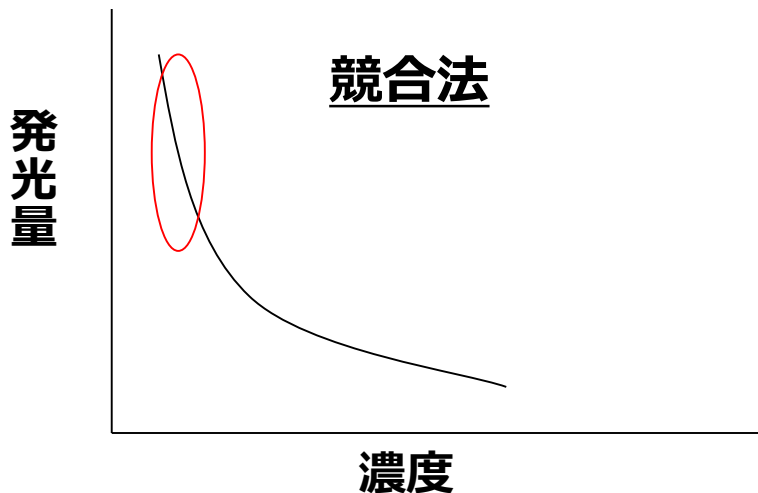
測光



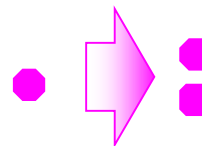
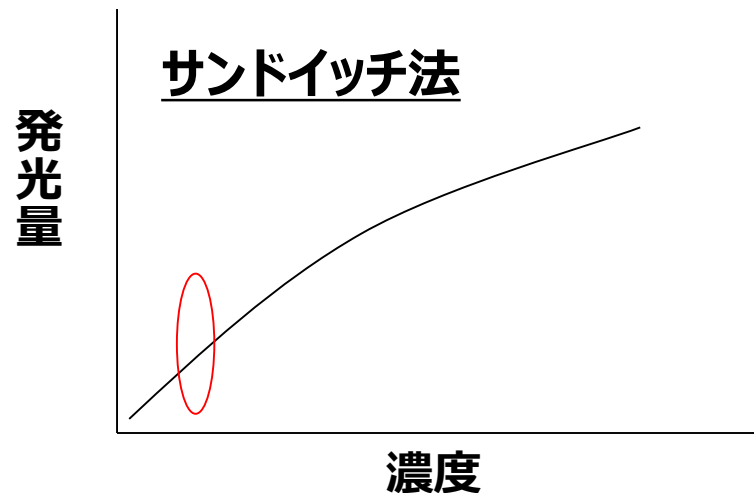
1ステップ競合法 デメリット

✓ 競合法

デメリット: 右下がり検量になるため、サンドイッチ法に対し高感度し難い



多くの測定対象物から1個
減っても認識しづらい



1個の測定対象物が2個
に増えたら認識し易い

サンドイッチ法・競合法メリット/デメリット

✓ 2ステップ サンドイッチ法

メリット: 測定対象物(抗原または抗体)が大過剰になっても、B/F分離を2回行うため
ハイドースフック(プロゾーン)現象が発生しない

デメリット: 1ステップ法に対し、抗原抗体反応時間を長く設定できないため、高感度
し難い

✓ 1ステップ サンドイッチ法

メリット: 2ステップ法に対し、抗原抗体反応時間を長く設定できるため、高感度し易い

デメリット: 測定対象物(抗原または抗体)が大過剰になると、ハイドースフック(プロゾーン)
現象が発生し、偽低値化する

✓ 競合法

デメリット: 右下がり検量になるため、サンドイッチ法に対し高感度し難い

B/F分離性能向上【バックグラウンドの低減化】

検体吸引

R1分注

R2分注

1次B/F分離

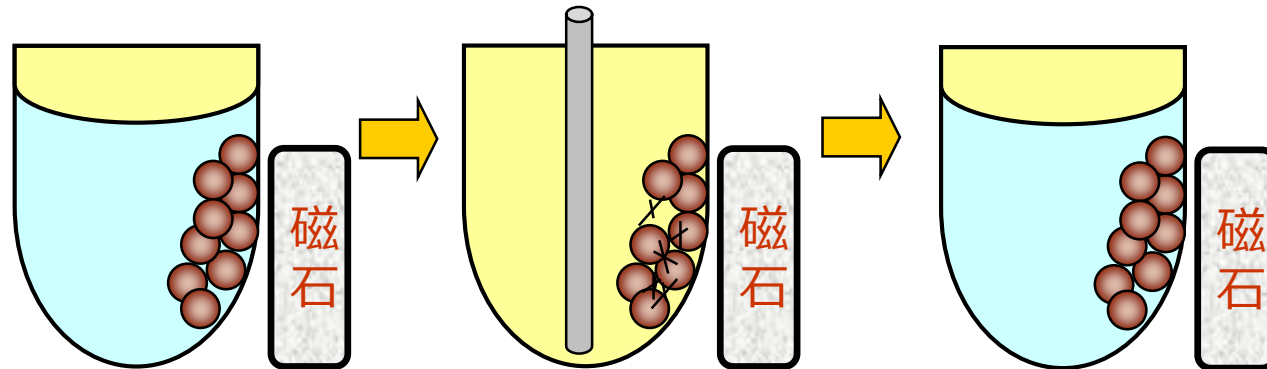
R3分注

2次B/F分離

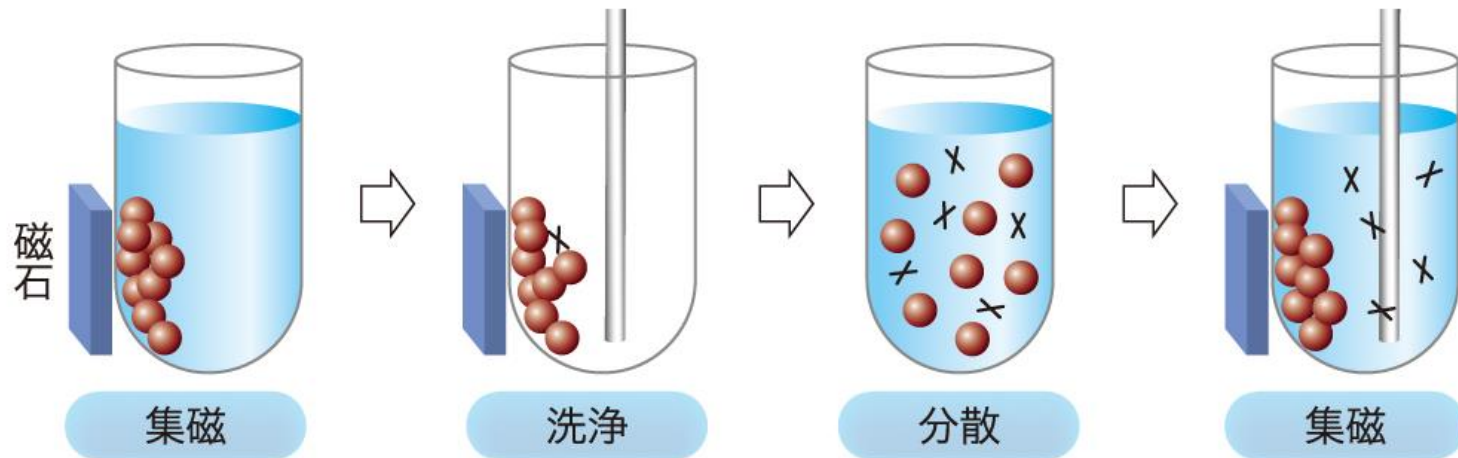
R4・R5分注

検出

【従来法】



【洗浄法】



反応物と未反応物とを効率的に分離し
非特異反応を低減し高精度検出技術を獲得

42℃反応系による酵素活性の向上

検体吸引

R1分注

R2分注

1次B/F分離

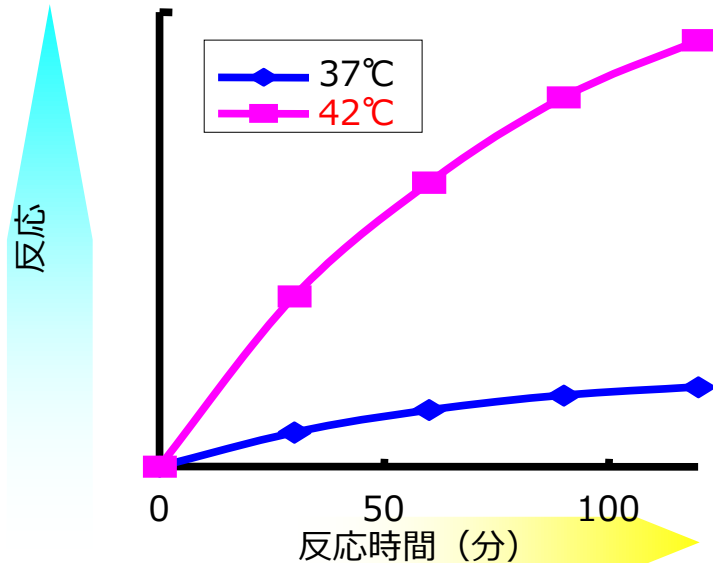
R3分注

2次B/F分離

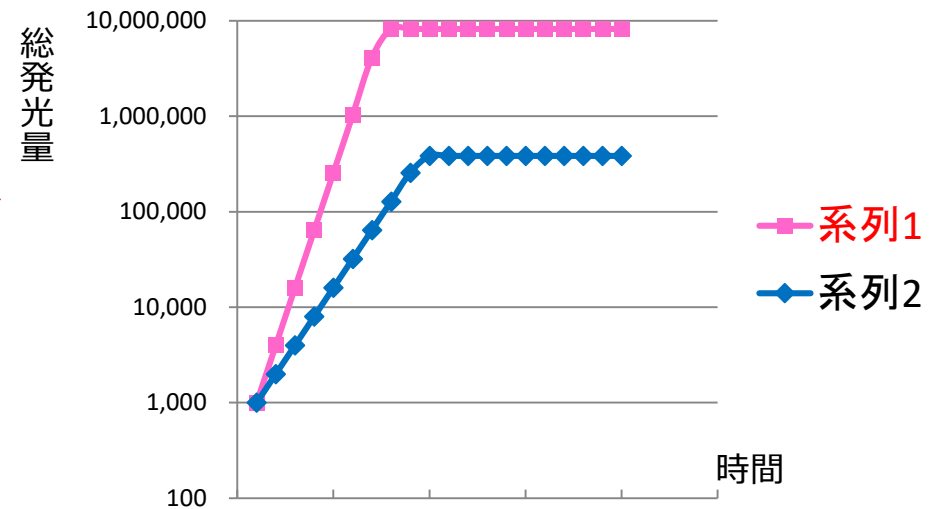
R4・R5分注

検出

【ALPの活性】



【CDP-Star活性】



【42℃反応系における酵素活性の向上】（ALP：アルカリフォスファターゼ）

反応過程で利用している酵素（ALP）は、一般的に温度が上昇すると反応速度が増加する。

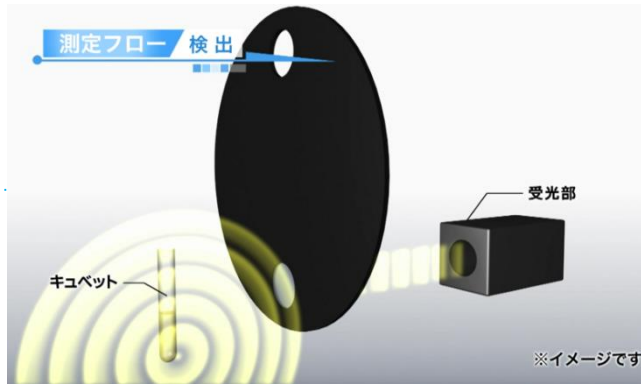
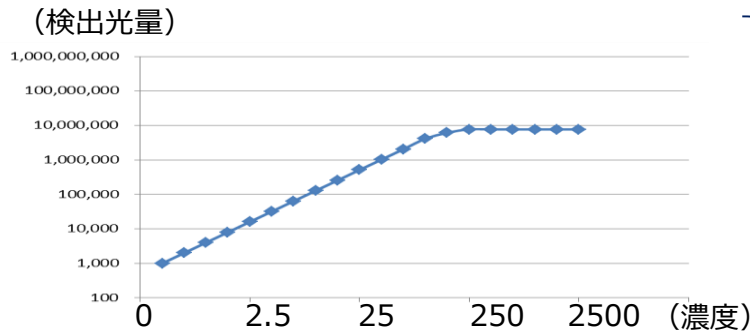
酵素（ALP）はタンパク質のため高温すぎると失活するが、42℃では失活せず、37℃に比べ高い反応速度が得られる。左グラフ。

そのため、CDP-StarのALPによる分解スピードが上昇し、総発光量が増加する。

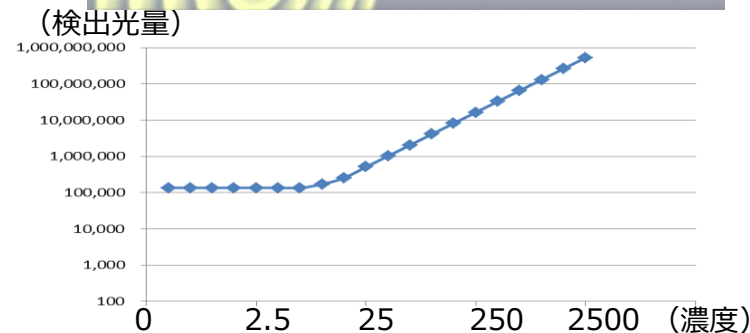
ワイドレンジ検出技術：光学フィルター採用

検体吸引 R1分注 R2分注 1次B/F分離 R3分注 2次B/F分離 R4・R5分注 検出

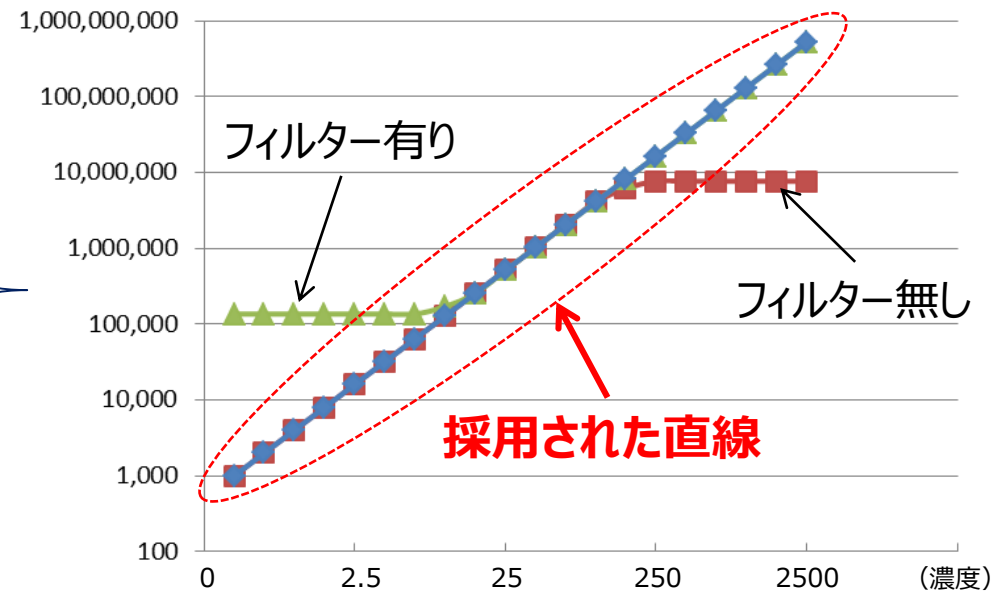
● 光学フィルター無し



● 光学フィルター有り

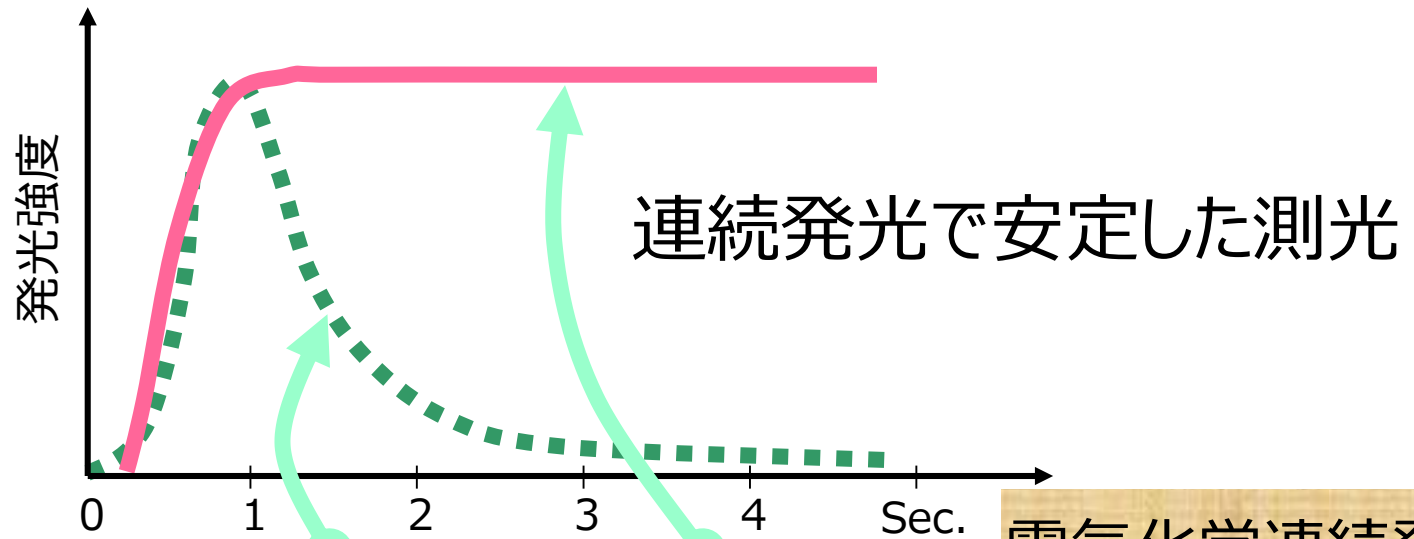


光学フィルターの切替により
低濃度から高濃度までの
ワイドレンジな直線性を確保

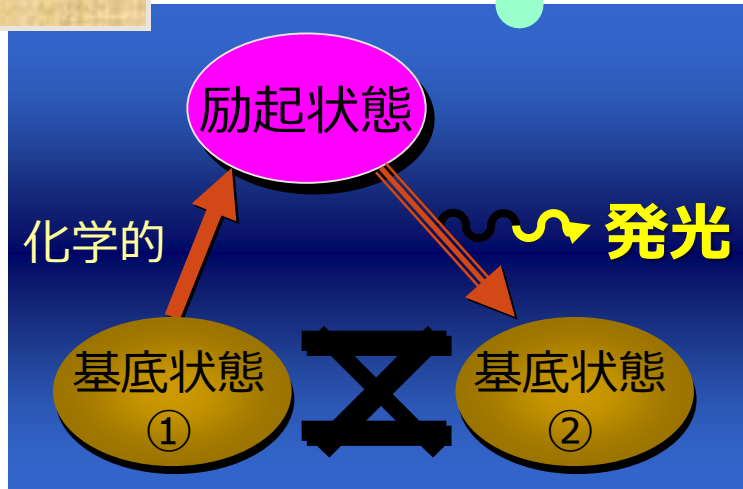


● 直線性の向上のため、光学フィルターの切替測定によって得られた赤枠の直線データを採用

電気化学発光 (ECLIA)



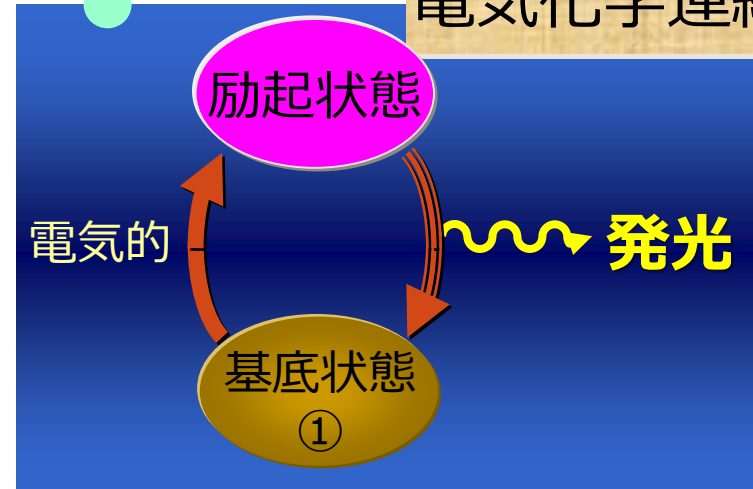
化学発光



発光物質

①の消費で、急速に発光が減少

電気化学連続発光

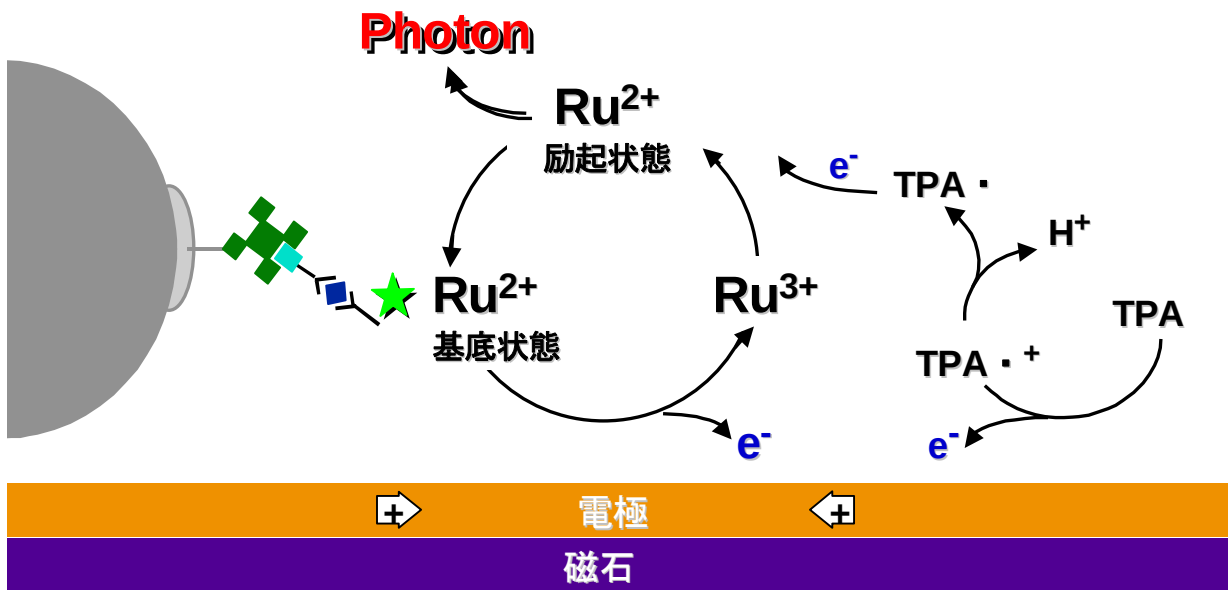


発光物質

①の消費は無く、持続発光できる

電気化学発光のメカニズムについて

電気化学発光のメカニズム

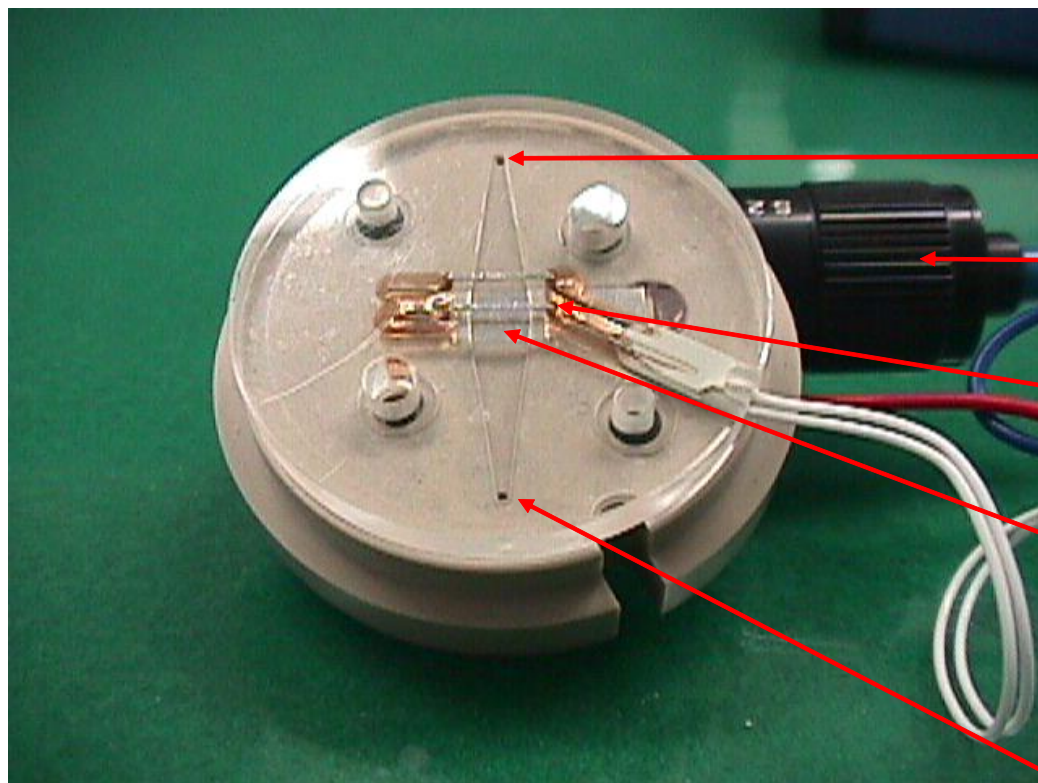


1. 反応は、ルテニウム錯体化合物とプロセル(TPA)でセル内で反応が行われます。

2. この両物質は、電圧を掛けない場合は基底状態で存在します。

3. ルテニウム錯体化合物(²⁺)とプロセル(TPA)の両物質が、白金電極表面で電圧を掛けた電磁場で存在すると反応が引き起こされます。

測定セル



反応溶液出口

リファレンス電極

カウンター電極

作動（白金）電極
(真下に磁石が来る)

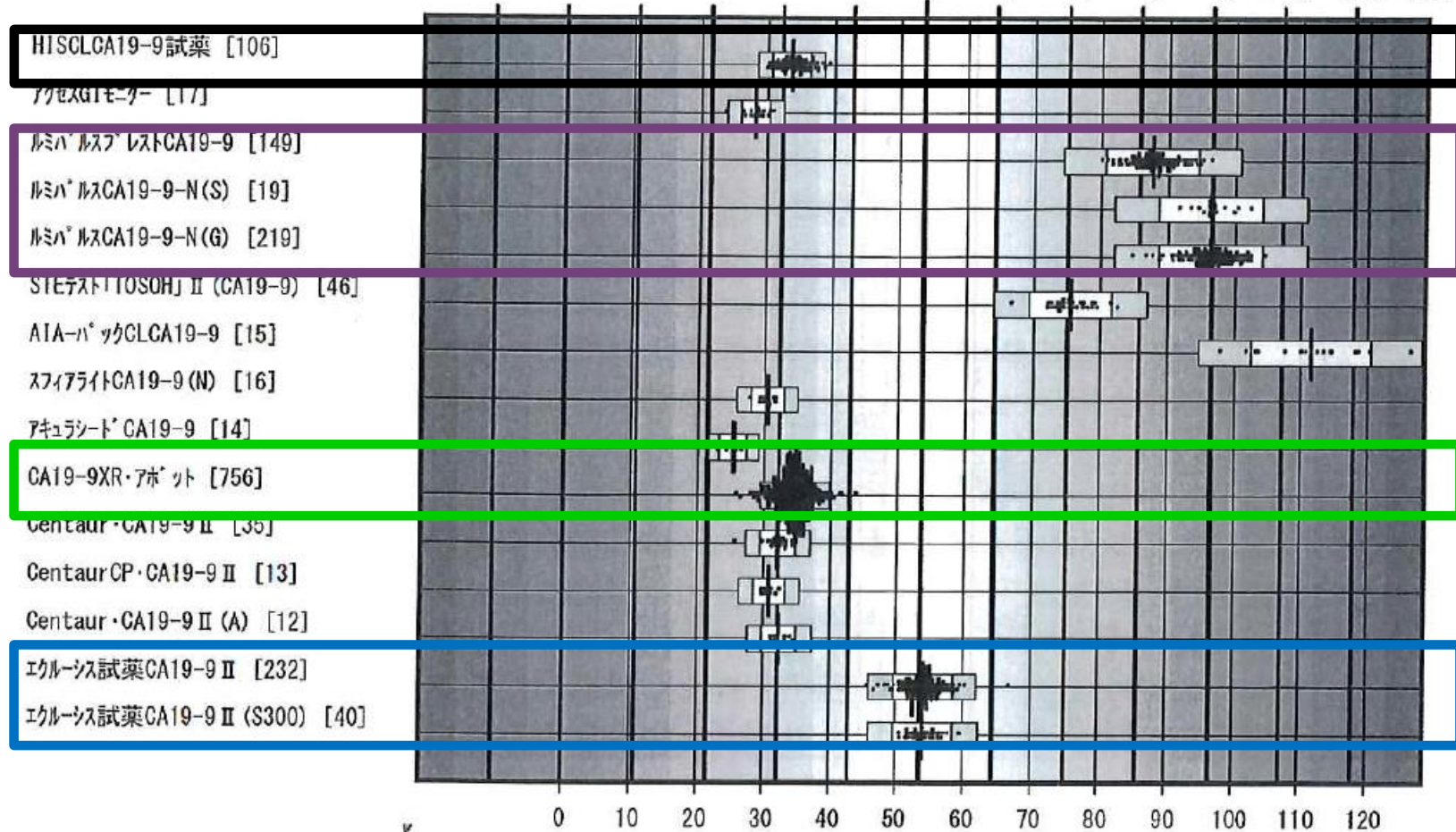
反応溶液入口

各メーカー別測定データの違い

CA19-9 (中濃度 試料12) 平成30年度

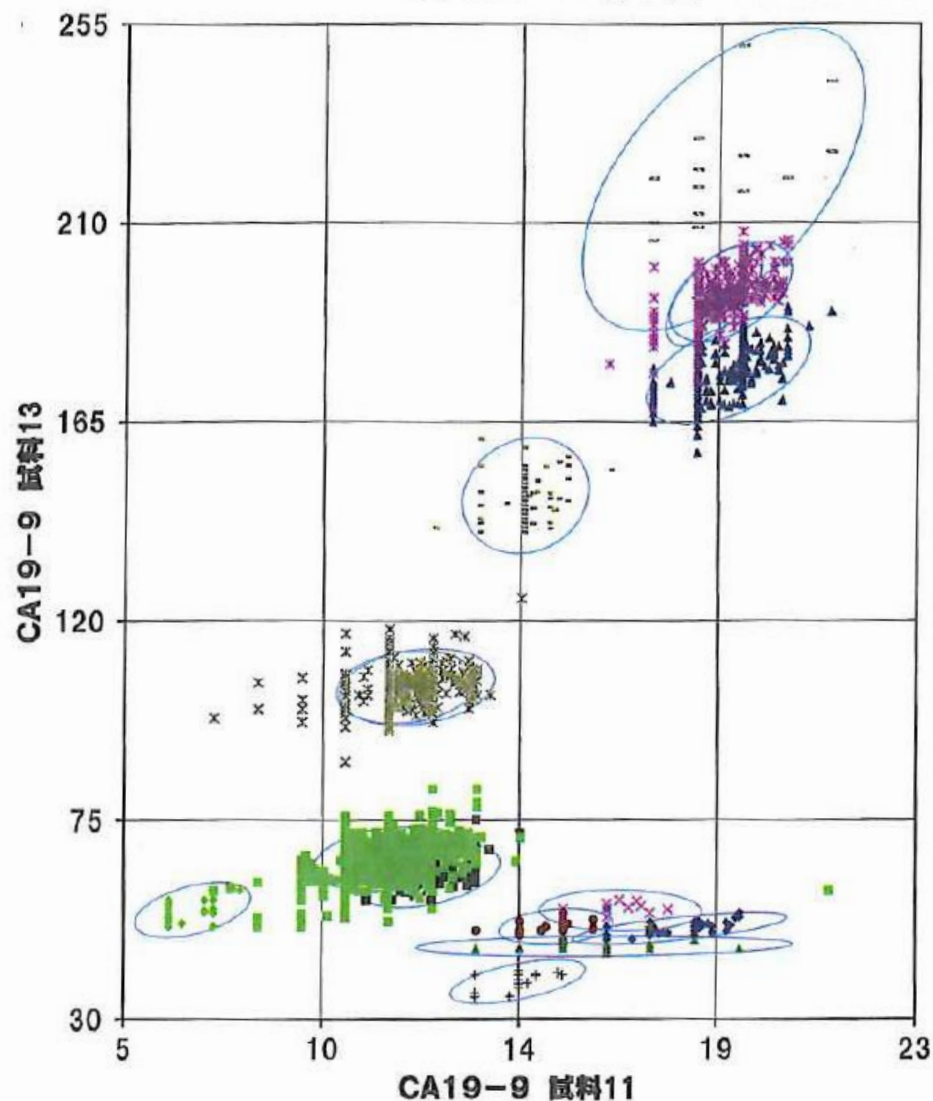
方法間CV= 53.84%(28.86) 方法内CV= 4.29%(2.26) 共通CV= 4.05%(4.46%) 評価用CV= 7.50%(コンセンサスCV) 総平均 53.613

-140% -120% -100% -80% -60% -40% -20% 0% 20% 40% 60% 80% 100% 120% 140%



30. CA19-9 試料 12

CA19-9 試料11と試料13の双値図



■ HISCLCA19-9試薬 [106]

◆ アクセスGIモニター [17]

▲ ルミハルスプレストCA19-9 [149]

✕ ルミハルスCA19-9-N(S) [19]

✕ ルミハルスCA19-9-N(G) [219]

- STEテスト「TOSOH」II (CA19-9) [46]

-- AIA-バックCLCA19-9 [15]

● スフィアライトCA19-9(N) [16]

+ アクセラシードCA19-9 [14]

■ CA19-9XR・アボット [756]

● Centaur・CA19-9 II [35]

▲ CentaurCP・CA19-9 II [13]

✕ Centaur・CA19-9 II (A) [12]

✕ エクルーシス試薬CA19-9 II [232]

・ エクルーシス試薬CA19-9 II (S300) [40]

まとめ（基礎編）

- ◆高感度標識発光測定法を理解する
- ◆免疫検査は、装置によりデータの違いがあることを理解する
- ◆免疫検査に関して、常に新しい情報を入手しておく必要がある

本日の内容（ピットフォール編）

- **異常反応の因子**
- **測定前のピットフォール**
- **免疫血清検査のピットフォール**
- **まとめ**

異常反応の因子

異常反応の因子

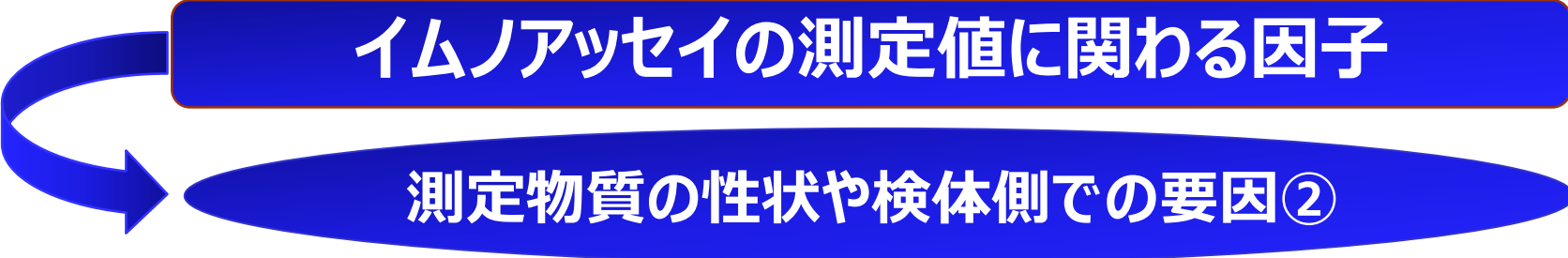
イムノアッセイの測定値に関わる因子

測定物質の性状や検体側での要因①

目的物質について

- 類似物質の存在
 - サブタイプ[°]の存在
 - 分子量の大小
 - 抗原決定基の数
 - 合成される部位
 - 生体内での存在様式・半減期・クリアランス
- 交叉反応による偽高値、偽陽性

異常反応の因子



イムノアッセイの測定値に関わる因子

測定物質の性状や検体側での要因②

検体による影響

- **HAMA、M蛋白、自己抗体、クリオグロブリン等の存在**
→ 非特異反応による偽高値、偽陽性
- **薬剤の影響**
→ 偽高値、偽陽性
- **採血管血清分離不良による影響**
→ マイクロフィブリンによる偽高値、偽陽性

異常反応の因子

イムノアッセイの測定値に関わる因子

分析装置での要因①

検体

- 検体詰まり
(検体粘性、フィブリン)
- 検体量不足
- 高濃度検体による
キャリオーバー

対応

- ディスポ検体サンプリング
チップによる圧力検知警報
リスト表示
- アラーム

ルーチンデータ・精度管理データ不良

異常反応の因子

イムノアッセイの測定値に関わる因子

分析装置での要因②

試薬

- 試薬量管理
- 試薬ロット・有効期限
- キャリブレーション有効期限
- 各項目試薬クロスコンタミ(ボトル試薬のみ)

対応

- 各種センサー
- リーダ読み取り
- 警報リスト表示
- アラーム

ルーチンデータ・精度管理データ不良

異常反応の因子

イムノアッセイの測定値に関わる因子

分析装置での要因③

機器

- 分析機各機構の動作異常
- 各種部品・分注シリンジ・ポンプ等劣化

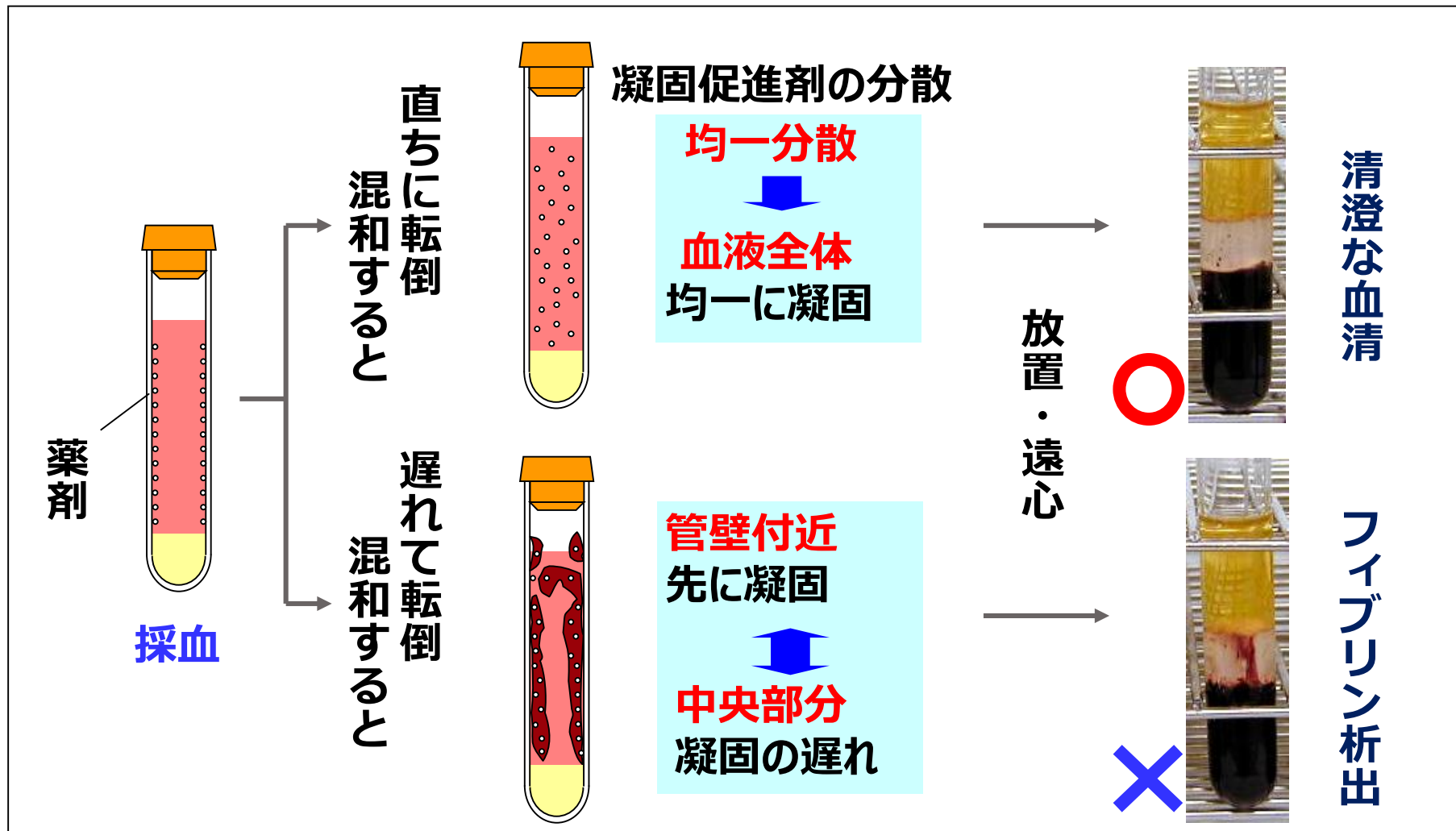
対応

- 各種センサー
- 警報リスト表示
- アラーム
- 定期メンテナンス

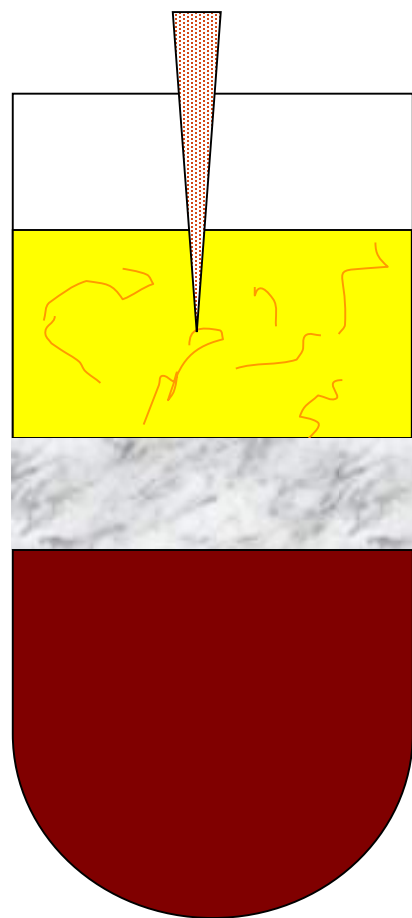
ルーチンデータ・精度管理データ不良

測定前のピットフォール

真空採血管混和のタイミング

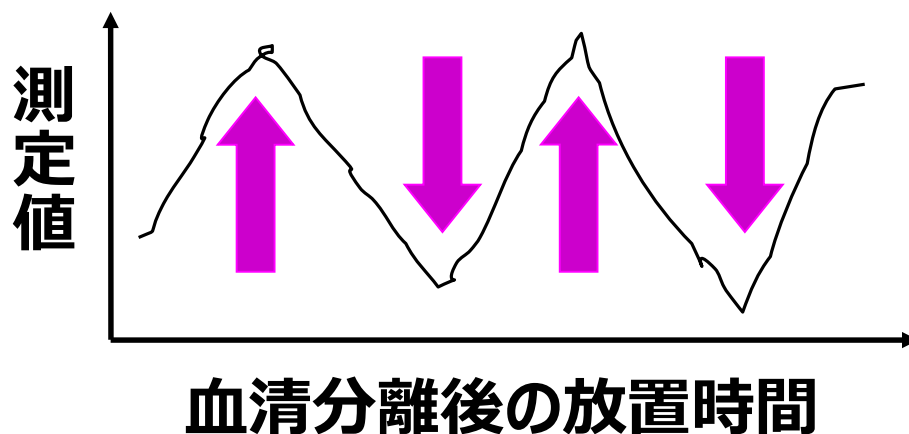


血清分離不完全による免疫反応への影響



サンプリング時、マイクロフィブリンを吸引してB/F分離不良、固相、反応容器内壁への吸着の原因となる

マイクロフィブリンが存在する状態の血清では、測定のたびに測定値が変動する



血清分離不完全血清では、遠心分離した血清中で、フィブリノーゲンがフィブリンに変化する反応が継続している

**血清分離後
数時間～数日放置**

血清分離不完全による免疫反応への影響



サンプリング時、マイクロフィブリンを吸引せずB/F分離不良、固相、反応容器内壁への吸着の原因とならない

測定のたびに測定値は変動しない



血清中のフィブリノーゲンが全てフィブリンに変化し、自然沈降の後、フィブリンを含有しない血清になる

血清分離不完全による免疫反応への影響

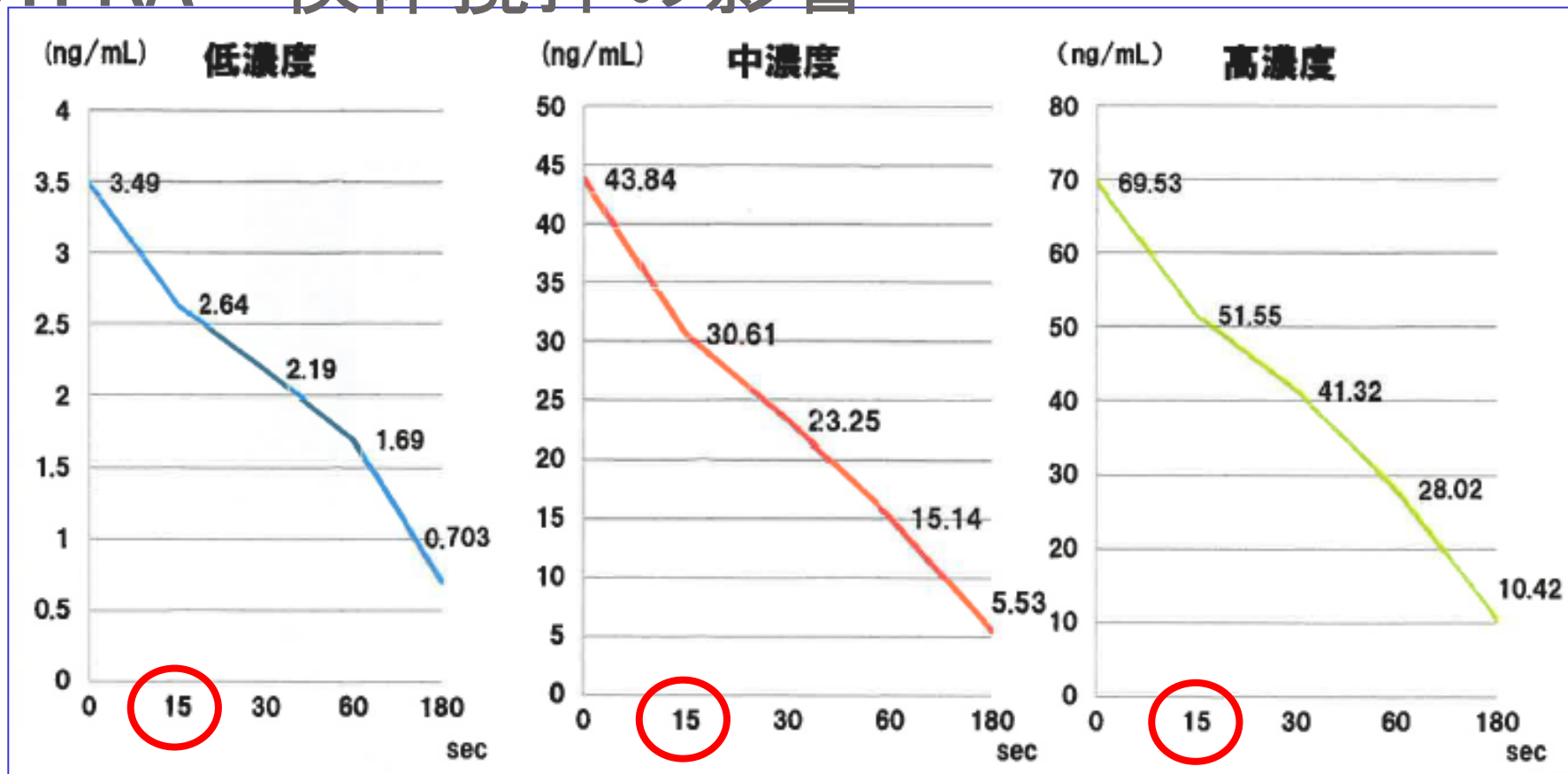
転倒混和不足によるHBs抗原の偽陽性

- 転倒混和あり、なしでHBs抗原の測定を行ったところ、転倒混和なしで偽高値が高頻度で発生した事例があった
- 転倒混和を十分に行うことが重要で、その他、凝固までの放置時間を長くする、遠心分離時間を長くすることでも、影響が小さくなると報告されている
- 原因は、転倒混和不足による微小なフィブリン析出、血球成分の浮遊などが、高感度の試薬に影響を及ぼすと考えられている

生化学用採血管も必ず転倒混和してください

CYFRA 検体攪拌の影響

濃度 ↑



時間 →

**Vortex Mixer
15秒**

- ✓ 低濃度 3.49 → 2.64 (ng/mL)
- ✓ 中濃度 43.84 → 30.61 (ng/mL)
- ✓ 中濃度 69.53 → 51.55 (ng/mL)

免疫血清検査のピットフォール

血中HBVマーカー ピットフォール事例

検査結果の不一致による事例は色々ありますが...

HBs 抗原	HBs 抗体	HBe 抗原	HBe 抗体	HBc 抗体	HBV- DNA	診断結果
—	—?	—	—?	—?	—	HBV既往感染者
+?	—	—	—	—	—	HBV非感染者

血中HBVマーカー ピットフォール事例 ①

HBs 抗原	HBs 抗体	HBe 抗原	HBe 抗体	HBc 抗体	HBV- DNA	診断結果
—	—?	—	—?	—?	—	HBV既往感染者

ピットフォール要因

✓ HBV既往感染者

✓ 既往感染状態で免疫抑制剤治療により
抗体産生が抑制される

最終診断結果が既往感染者
なぜ抗体が陰性か・・・

HBs抗体・HBc抗体の偽陰性について

すでに化学療法歴のある症例、免疫抑制状態にある症例
では抗体価が低下して偽陰性となることがある



初回化学療法の前段階からHBs抗体、HBc抗体の
チェックが重要となります

B型肝炎治療ガイドライン2019 第3.1版 (日本肝臓学会)

https://www.jsh.or.jp/medical/guidelines/jsh_guidelines/hepatitis_b

血中HBVマーカー ピットフォール事例 ②

HBs 抗原	HBs 抗体	HBe 抗原	HBe 抗体	HBc 抗体	HBV- DNA	診断結果
+	-	-	-	-	-	HBV非感染者

ピットフォール要因

✓ HBワクチン接種後の検体
(HBVワクチン抗原)

最終診断結果が非感染者
なぜ抗原が陽性と検出されて
しまったのか・・・

日本赤十字社 予防接種者 献血不可の案内

一定期間内に予防接種を受けた方

**B型肝炎ワクチンの接種を受けた方は接種後4週間、
献血をご遠慮いただいています**



**国内のHBワクチンはビームゲン、ヘプタバックスⅡが使用されて
いますが、いずれもリコンビナントHBs抗原です**

**HBウイルスを接種している訳ではありませんので、HBsAg陽性
を呈しても、感染とは異なります**

HBV-DNAやHBc抗体は陰性です

腫瘍マーカー値の生理的変動因子

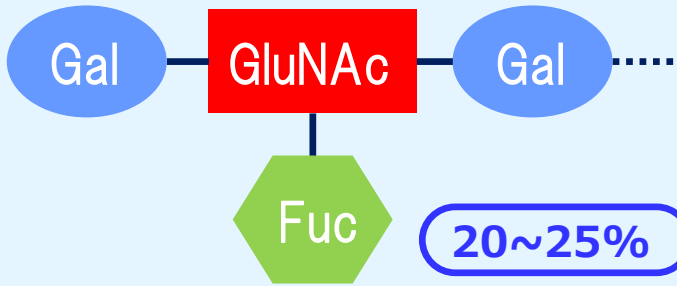
腫瘍マーカー	年齢・性差	妊娠・性周期	その他
CEA	加齢と共に上昇 男性でやや高値		喫煙者でより高値
CA19-9	若年でやや高値 女性でやや高値		Lewis血液型の影響がある Lewis a陽性者・分泌型の女性では、性周期で200U/mlまで上昇するケースあり Lewis a-b-血液型の人は、測定値ゼロレベルになる
AFP	出生時著高 生後8～10ヶ月で成人値	妊娠後期に高値	
PSA	加齢と共に上昇		脱毛剤で低値
CA125	男女ともに加齢につれて減少傾向	妊娠初期や月経期で高値	閉経前と比較して閉経後低値
CA15-3	加齢と共にやや上昇	妊娠前期に低値	

CA19-9 と ルイス式血液型

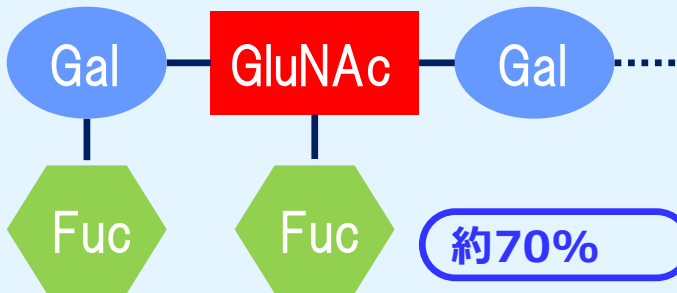
ルイス式血液型

糖鎖抗原

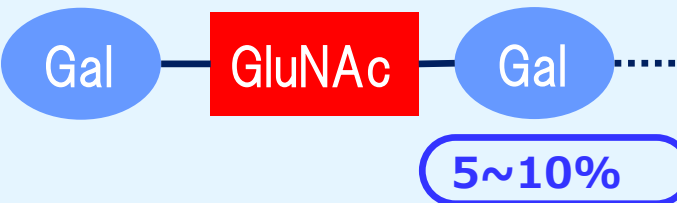
Le^{a+b-}



Le^{a-b+}



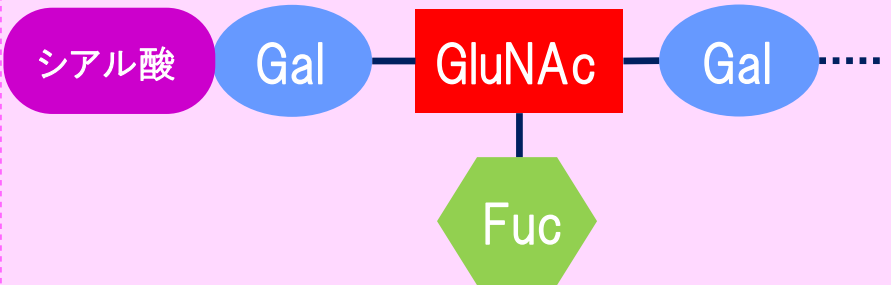
Le^{a-b-}



【CA19-9】

ルイス式血液型抗原 Le^a にシアル酸が結合したシアリル Le^a

CA19-9 (シアリルルイスA)



【DUPAN-2】

ルイス式血液型抗原 Le^a の前駆体であるルイスC抗原にシアル酸が結合したシアリル Le^c

DUPAN II (シアリルルイスC)



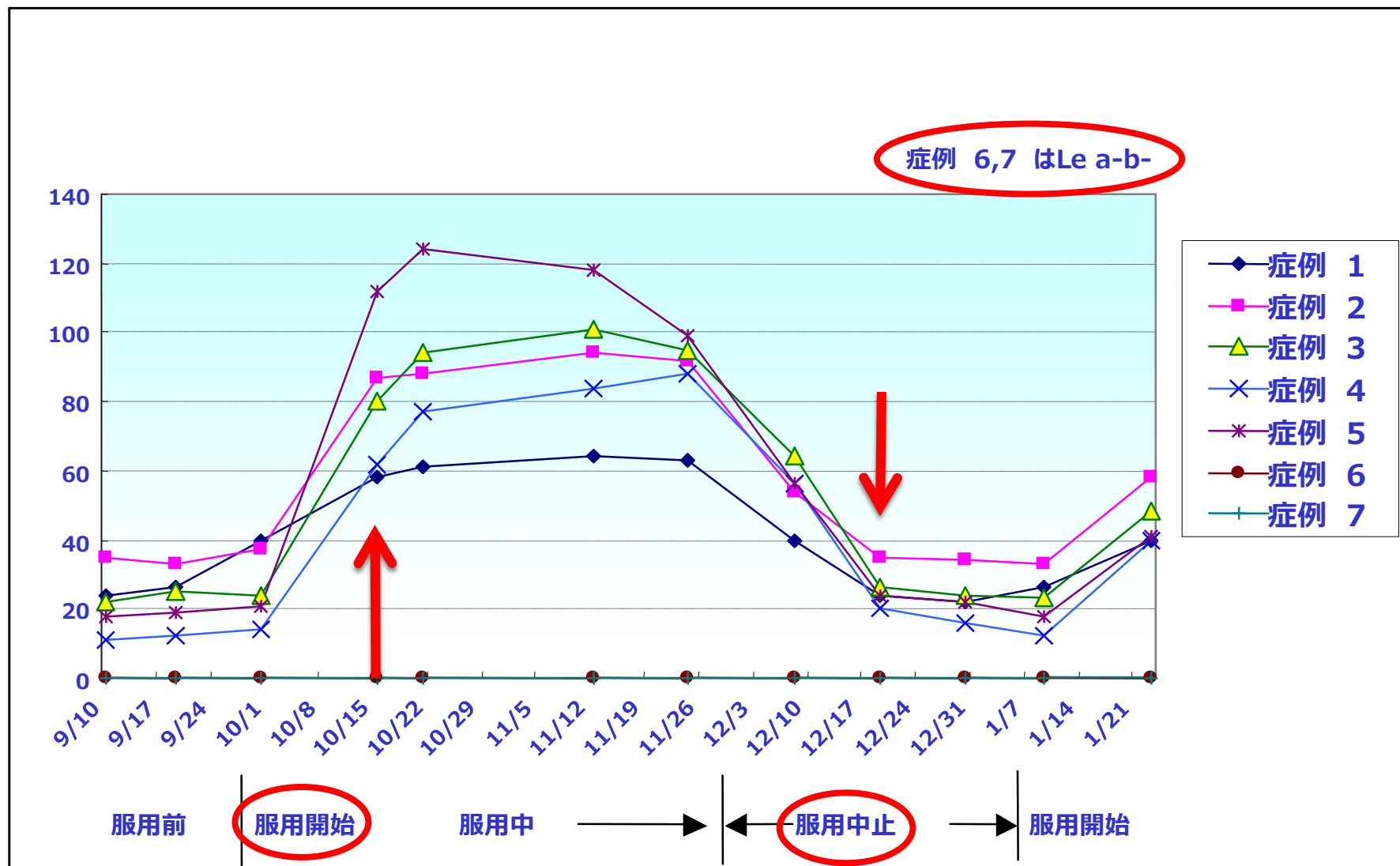
スクラルファート〔胃粘膜保護剤〕

胃粘膜保護剤スクラルファート〔商品名:アルサルミン〕
を**長期服用**すると血中CA19-9値が上昇する

測定系によっては、4,000U/mLまで上昇し、服用中止後測定値は、基準値 以下まで下がった例がある

CA19-9は胃粘膜にも存在しており、胃粘膜保護剤の使用により胃粘膜のCA19-9が毛細血管を通り、血中に入り込んだためCA19-9が上昇したと考えられる

CA19-9とスクラルファートとの関係



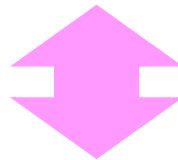
まとめ

ピットフォール(異常反応)発見の糸口

臨床検査技師の知識・経験による力量



この検査結果おかしくないか？



- ✓ 免疫検査の限界と非特異反応のリスクを認識すること
- ✓ 問題発生時には適切な対処がスムーズにできるよう試薬組成、試薬原理、分析機の動作原理などを理解し、解析手段をマニュアル化し関係者に周知
- ✓ 各検査項目に特有なピットフォール事例を把握
- ✓ 主治医へ 直接連絡〔臨床医との日頃のコンタクト強化〕

非特異反応かもしれないと思ったら

- マイクロフィブリンの影響の確認、再現性の確認

検体の再遠心（少し高速で長めに2000×g,10分間以上）
後に再測定して、再現性を確認しましょう

- カットオフ値に限りなく近い値が検出された場合

前回値の履歴・関連マーカーの結果を確認してもらいましょう

- RFによる影響を確認

検体のリウマチ因子（RF）の値を確認しましょう

- M蛋白の影響を確認

検体の免疫グロブリン量（IgG,IgA,IgM）、または蛋白分
画値を確認しましょう

非特異反応かもしれないと思ったら

- 検体の梅毒RPR測定結果が陽性の場合

リン脂質抗体の有無の確認、自己抗体の影響を確認しましょう

- 反応性に異常を認める場合

サンプルや試薬添加の確認、生化学分析装置であればモニタリング画面を確認しましょう

- 真の抗原抗体反応かどうかを確認するために吸収試薬が準備されている検査項目があります

吸収試験を実施しましょう

第47回 国臨協関信支部学会
《学会企画》学術委員による分科会（血清部門）

完

ご清聴ありがとうございました