

〈原著〉

ディメンション ビスタ1500を用いた「LOCI法」による 高感度測定の基礎的性能評価と検査室の効率改善

中根 生弥、岡松友美子、高嶋 幹代、宮本 則央、
山田 幸司、酒巻 尚子、有木 美紅、山崎 良兼

Fundamental evaluation and improvement of lab efficiency by highly sensitive LOCI methods on Dimension Vista 1500

Ikuya Nakane, Yumiko Okamatsu, Mikiyo Takashima, Norio Miyamoto,
Koji Yamada, Hisako Sakamaki, Miku Ariki and Yoshikane Yamazaki

Summary Increasing demands for efficiency, rapid turnaround time (TAT) and patient service prompted lead us to evaluate and select Immunoassays on Dimension Vista[®] for 365 24-hr days with rapid TAT reports. Luminescent oxygen channeling immunoassay (LOCI[™]) technology was adopted for cTnI, TSH, FT4 and FT3 to enable homogenous immunoassays. LOCI[™] reagents included two latex bead reagents and a biotinylated analytespecific receptor. Sensibead was coated with streptavidin and Chemibead with a binding partner specific to the method. During the assay, the three reactants combined with analyte to form an immunocomplex. Illumination of the complex generated singlet oxygen from the sensibead, which was channels into the Chemibead to trigger chemiluminescence.

We concluded that the TSH, FT4, FT3 and cTnI methods on the Dimension Vista[®] system provided excellent sensitivity, precision, linearity, and correlation with current commercialized kits thus enabling us to shorten turn-around time reports.

Key words: Dimension Vista[®]1500, LOCI technology, Highly sensitive assay,
365 24-hr days with rapid TAT reports

I. はじめに

近年、医療を取り巻く環境が急激に変化する中、患者さまの視点に基づいた質の高い効率的な診療情報の提供が強く求められている。当院

は平成20年1月より病院新築移転に際し、臨床検査部の基本方針として『信頼される開かれた検査科』を目指し、我々分析部門は自動化及びシステム化により省力化と迅速化を図る目的で、生化学免疫分析装置ディメンションビスタ1500

JA愛知 厚生連豊田厚生病院 臨床検査技術科
〒470-0396 愛知県豊田市浄水町伊保原500-1
受領日 平成22年1月8日
受理日 平成22年1月27日

Department of Clinical Laboratory, JA Aichi Koseiren
Toyota Kosei Hospital
500-1 Ibohara, Josui-cho, Toyota-shi, Aichi 470-0396,
Japan

の新規導入を決定した。

その導入背景には、大量の検体を迅速に検査するルーチン検査のバックアップと夜間休日検査専用分析装置としての運用であった。可能な限り迅速かつ、恒常的に検査情報を臨床へ提供することに重点を置いた時、最も重要視された点が夜間休日検査における高感度イムノアッセイの測定であった。このディメンションピスタ1500はB/F分離が不要で高感度イムノアッセイを10分から21分で測定可能なLOCI (Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay) 法を採用している。特に、高感度イムノアッセイの弱点であった測定時間の延長や専用分析装置での運用など、これまでの概念から脱却した分析装置である。今回、我々は国内1号機として新規導入を図った本装置でのトロポニンIおよび甲状腺関連検査測定の基礎的性能評価を行ったので、24時間迅速報告体制の構築と日常運用での利便性も含め報告する。

II. 装置ならびに方法

1. 装置概要

ディメンションピスタ1500 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社製) の

装置概要を(図1)に示す。本装置は1時間あたり1,500テストの処理能力を有し、生化学から高感度イムノアッセイまで測定できるワークセル方式により、LOCI法、比色法、電極法、ネフェロメトリー法の4つの測定法を1台に集約し、さらに、全ての項目を同時に測定することが可能な分析装置である。また、装置本体内部には、純水装置・廃棄ボックスA・廃棄ボックスB・コンピューター・主電源スイッチ・ハンディーバーコードリーダーが内蔵され、検体架設は6本立ての専用サンプルラックにて検体を搭載し分析を行う。さらに、災害時対応分析装置としての機能(無停電装置および外部給水ポート)を有し、トラブル時対応としてもコールセンターとはオンライン・リモートが構築されているので、当院では日常業務ならびに日当直用の分析装置として現在24時間運用を実施している。

2. LOCI法の測定原理

LOCI (Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay) は、一重項酸素をトリガーとしたBF分離を必要としないホモジニアスなイムノアッセイであり、本LOCI法には2種類のポリスチレン粒子、センスビーズとケミビーズを使用している^{1,2,3)}。

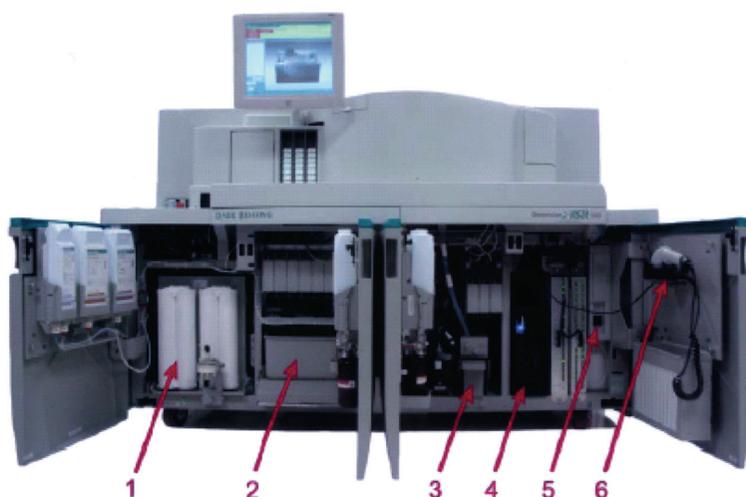


図1 装置概要

1：純粋装置、2：試薬廃棄ボックス、3：反応キュベット廃棄ボックス、4：CPU、5：メインスイッチ、6：ハンディーバーコードリーダー

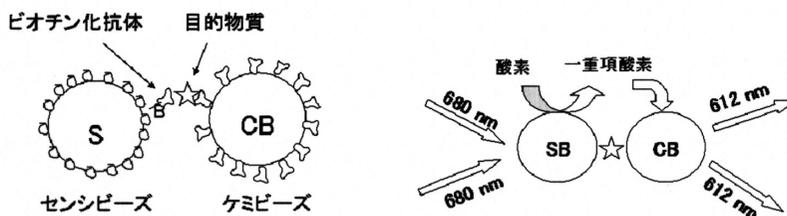


図2 反応原理（複合体の形成と発光）

表1 他の高感度免疫法との比較（TSH）

試薬名	会社名	検体量(μL)	測定時間(分)	実効感度(μIU/mL)	測定範囲
クオルタスシリーズTSH	カイノス	80	15	—	0.03~40
フレックスカートリッジ [®] TSH V	シーメンス	12	16	0.006	CV 20% 0.005~100
エクルーシス試薬TSH	ロシュ	50	18	—	0.005~100
ルミパルスプレストTSH	富士レピオ	50	23	0.01	CV 10% 0.003~200
アーキテクトTSH	アボット	150	30	0.0038	CV 20% 0.0025~100
ビトロスタTSH	ジョンソンエンドジョンソン	80	30	0.015	CV 20% 0.015~100
バイダスアッセイキットTSH	ビオメリュー	200	40	—	0.05~60

センシビーズは直径200 nmのポリスチレン粒子であり、フタロシアニンという青色の色素を含んでいる。フタロシアニンは、680 nmの光を吸収し、励起状態から基底状態に戻る際に一重項酸素を発生する性質があり、さらに、一重項酸素には電子が空の軌道が存在し、強力な酸化作用をもつ。この一重項酸素の半減期は4 μ秒であり、一瞬にして通常の酸素の電子配列に戻る。したがって、接近している物質に対してのみ一重項酸素の酸化作用が発揮される。センシビーズの表面にはストレプトアビジンが結合しており、ビオチン化抗体と反応する。

ケミビーズは直径200 nmのポリスチレン粒子である。表面には測定物質と反応する特異抗体が結合しており、オレフィン化合物とユウロピウム錯体が含まれている。オレフィン化合物は一重項酸素により酸化され発光する。また、ユウロピウム錯体がオレフィン化合物の発光エネルギーを吸収し612 nmの光を発光する。

検体中の目的物質はビオチン化抗体と反応し、ケミビーズ上の抗体と反応する。さらに、ストレプトアビジン結合センシビーズと反応し、センシビーズ-目的物質-ケミビーズ複合体を形成し、センシビーズとケミビーズが接近する。2つのビーズが接近した状態で680 nmの光をセンシビーズに照射すると、一重項酸素が発生し、ケ

ミビーズと反応し612 nmの光を発光する（図2）。一方、検体中に目的物質が存在しない場合、複合体を形成せず、2つのビーズが離れた状態で存在する。2つのビーズが離れた状態で680 nmの光を照射すると一重項酸素は発生するが半減期が4 μ秒と短くケミビーズとは反応しないため発光しない。検体中の目的物質が多いほど、より多くの複合体が形成され、センシビーズとケミビーズが接近することにより発光量が増加する。612 nmの光の強を、既知濃度の標準液の光の強さと比較し、検体中の目的物質の濃度を算出する。

LOCI法では、光の照射、発光、測光を繰り返して実施することにより、より大きなシグナルが得られ、偶発的に発生するノイズを吸収することができる。甲状腺関連検査測定に関する他の高感度免疫法との比較を（表1）に示すが、測定時間、検体量、測定範囲において本法が優れていることが分かる。

3. 分析装置（対照機器）

分析装置は、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス（株）社製 デイメンションビスタ1500を用い、検討試薬はデイメンションビスタ専用フレックスカートリッジ試薬4項目（トロポニンI、TSH、FT3、FT4）を添付文書に

生 物 試 料 分 析

表 2 トロポニンIの同時再現性 (n=20)

CardiacTL	試料1	試料2	試料3	試料4
Mean	0.073	0.470	1.730	15.135
Max	0.078	0.496	1.750	15.300
Min	0.068	0.452	1.710	14.800
Range	0.010	0.044	0.040	0.500
S.D.	0.002	0.016	0.010	0.127
C.V.	2.943	3.313	0.563	0.838

表 3 甲状腺関連項目の同時再現性 (n=20)

項目名	試料	Mean	Range	S.D.	C.V.
TSH	試料 1	0.532	0.220	0.006	1.10
	試料 2	6.475	0.190	0.060	1.00
	試料 3	42.330	2.200	0.600	1.40
FT3	試料 1	2.707	0.200	0.056	2.10
	試料 2	7.593	0.250	0.082	1.10
	試料 3	17.592	0.670	0.157	0.90
FT4	試料 1	0.977	0.030	0.010	1.10
	試料 2	2.356	0.080	0.021	0.90
	試料 3	7.137	0.400	0.095	1.30

に基づき使用した。本試薬の特長として、一体型容器に必要な試薬が区分け充填されているため、必要時に直接専用口より搭載するのみで試薬の補充が完了する。また、試薬ロット番号・有効期限などは2次元バーコード[®]がフレックスカートリッジに印字されているため、装置側で試薬搭載後の管理行われており、試薬の継ぎ足し補充による試薬の変性や誤混入による劣化を防止することが可能となっている。

対照機器は同社ディメンションRxL Max (トロポニンI) およびロシュ・ダイアグノスティクス社製E 170 (TSH、FT3、FT4) を用い検討をおこなった。対照機器の試薬は、各社専用試薬を指定条件で使用した。

Ⅲ. 成績

1. 再現性 (同時、日間)

トロポニンIは専用管理用試料4濃度による20回重複測定にて同時再現性を検討した結果、各濃度における変動係数CVは0.56%~3.30%と良好な精度を示した (表2)。また、2ヶ月間に渡るCardiac TL1コントロール値の変動からは、

ノンキャリブレーションにて平均0.245 ng/mL、SD 0.018と安定した結果が得られた。

また、甲状腺関連検査項目では、日常精度管理用試料であるライフォチェック3濃度を用い20回重複測定にて同時再現性を検討した結果、各項目、各濃度における変動係数CVは0.9%~2.1%と良好な精度を示した (表3)。日間変動の確認において、基準値内プール血清を用いた1ヶ月間の月内日間変動係数CVは、2.47~3.95%であり、同様に2濃度管理試料を1日1回1濃度測定実施時の変動係数CVは、1.92~4.65%と安定した結果であることを確認した。

2. 共存物質の影響

シスメックス社の干渉チェックを使用し、ビリルビンF; 20 mg/dL、ビリルビンC; 20 mg/dL、ヘモグロビン; 500 mg/dL、ホルマジン濁度; 3000になるよう10段階希釈系列の試料を調整し、無添加試料での値を基準として±10%以上の変動傾向があった場合を影響ありと評価した時、トロポニンIにおいて中から強溶血で低下傾向が認められたが、その他の項目では特に優位な影響は認められなかった。

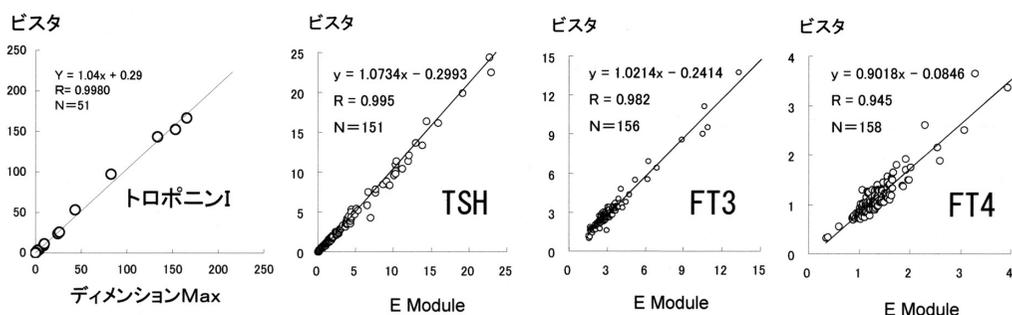


図3 相関性 (トロポニン I TSH FT3 FT4)

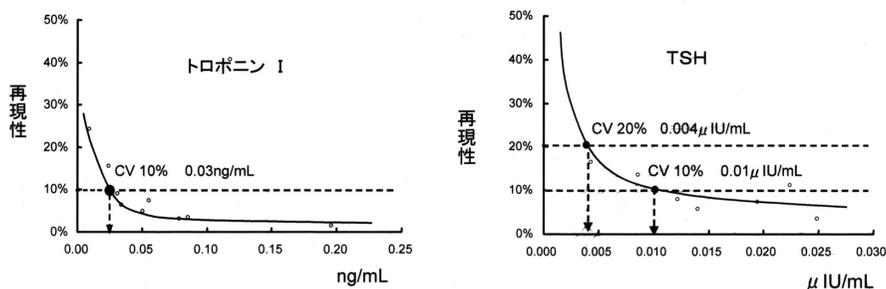


図4 実効感度 (トロポニンI TSH)

3. 相関性

トロポニンIにおけるディメンションRxL Maxとの相関関係を検討したところ、N=51で $y=1.04x+0.29$ 、 $R=0.998$ と高い相関性をみとめた。また、その測定値は小数点第3位まで報告することが可能であり、より低値の変動を詳細に捕らえることが可能となった。また、甲状腺関連検査においては、日常検査法であるE170との相関性 (2 LOT、N=150) は、いずれの項目も相関係数は0.95以上と良好な相関性を示し、傾きはTSHで1.07、FT3で1.02、FT4で0.90であった (図3)。

4. 希釈直線性

トロポニンIにおいては、コントロール血清を専用希釈液にて10段階希釈し、希釈直線性を検討したところ、低濃度域では0.80 ng/mL、高濃度域では5.0~40 ng/mLまでの定量性が確認できた。また、甲状腺関連項目では、高濃度標準液を0濃度標準液にて10段階希釈し、希釈直線性を

検討したところ、TSHは10~110 μ IU/mL、FT3は3.0~30 pg/mL、FT4は1.0~10 ng/dLまで定量性が確認された。日常運用においてTSHの測定レンジを越えた検体は、臨床的有用性と採算性の考慮し希釈再検は行わず、測定上限以上の報告としているが、希釈を行う場合は専用希釈液を用いる必要がある。

5. 実効感度

トロポニンIの実効感度は、トロポニンI濃度が0.01 ng/mLから0.2 ng/mLまでのプール検体を各30本ずつ小分け凍結保存 (-80°C) した試料を1日1回2重測定で30日間繰り返し測定を行い、各濃度毎の試料におけるCV (%) をプロットした時のCVが10%となる濃度を実効感度として求めたところ、トロポニンIでは0.03 ng/mLであった。

また、TSHの実効感度は、TSH濃度が0.002 μ IU/mLから0.02 μ IU/mLまでのプール検体を各30本ずつ小分け凍結保存 (-80°C) し同様にCV (%) をプロットした時、CVが20%となる濃度

システム準備完了状態(スタンバイ)からの検体投入

CTNI(LOCI法)+生化学(比色法)を測定した場合

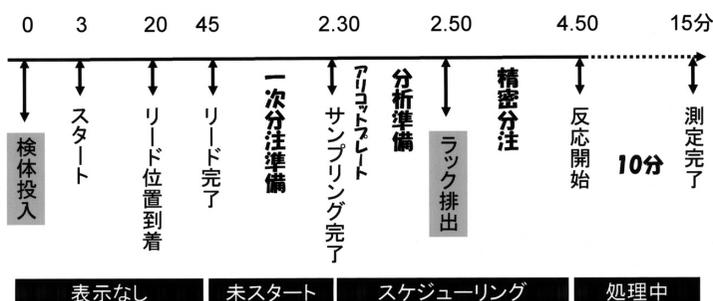


図5 測定タイムテーブル

を実効感度として同様に求めたところ、TSHで0.004 μ IU/mLであり臨床的には充分な感度を有していた(図4)。

6. 測定タイムテーブル

LOCI法によるトロポニンIと比色法による生化学項目を同時測定した場合のタイムテーブルについて(図5)に示す。測定時には専用サンプルラックに検体を架設し、装置に搭載すると約45秒後にラックおよび採血管バーコードのリードが完了し、装置のステータスは「表示なし」から「未スタート」となる。その時装置内部では一次分注のための準備が同時に行われ、2分30秒後にはアリコットプレートへのサンプルリングが完了し、ステータスは「スケジューリング」になり、2分50秒後には親検体は装置内部より排出されてくる。引き続き装置内部では測定項目の試薬準備に移り精密分注が行われ、4分50秒後より測定が開始され「処理中」となり、10分間の反応が終了すると検体搭載から約15分後には全測定が完了する。本装置はアリコットプレートへ1次分注を行うため、自動希釈再検や追加検査においてはアリコットプレートからのサンプルリングを行うことで、親検体の早い排出により他の分析装置や検査へ検体を用いることが可能であり、業務の効率的運用に寄与できている。

7. 日常運用における利便性

本装置の導入目的であった、ルーチン検査の

バックアップと夜間休日検査専用分析装置としての運用に加え、依頼件数の比較的少ない特殊項目(ホルモン、心筋マーカー、血中薬物濃度、尿生化学、血漿蛋白、血中アンモニアなど)の分析をおこなっている。そのため測定対象項目数は、生化学・免疫検査を合わせ57項目に及ぶ。分析担当者は多数項目の試薬管理、精度管理等に加え、日常保守を行う必要があるため、導入当初は担当者への心理的ストレスを心配した。

しかし、日常業務における試薬の補充は、全て専用カートリッジ(単一包装)であること、試薬要求に合わせ該当試薬を装置に搭載することで自動的に試薬調整に移り測定可能となる。また、試薬調整のタイミング(残テストなど)等もユーザー運用にあわせ設定が可能であるのも便利である。日常精度管理試料の測定は、精度管理試料を専用バイアルキャリアに架設し事前に装置本体のストレージリングに保冷保存されているため、指定時間に自動測定されることで担当者は精度管理値を確認するのみとなり、業務軽減に役立っている。日常保守として実施すべき作業としては消耗品や試薬の補充と廃棄物(使用済み試薬カートリッジとキュベット)処理、約15分間の各種プローブ動作チェックのみであり、担当者へのストレス軽減にも繋がっている。

IV. 考察

今回我々は、高感度イムノアッセイを短時間で測定可能なLOCI法により、トロポニンIおよび甲状腺関連検査測定の基礎的性能評価を行い、日常業務におけるバックアップならびに24時間迅速報告体制の構築について報告した。本法による高感度イムノアッセイでの基礎的検討結果より、専用分析装置と同等な性能を有し、測定時間の短縮、広い測定レンジとサンプル量の低減が可能である。得に高感度アッセイの点では、トロポニンIの実行感度は0.03 ng/mL、TSHでは0.004 μ IU/mLと満足する結果であった。甲状腺関連検査では日常分析法との相関性も高く、特に小児微量検体での測定は他の生化学検査と同時に測定でき、患者負担の軽減にも一躍をかつている。反面、免疫反応であるため患者検体中に存在する異好抗体の影響には考慮が必要であり、本試薬では影響を最小限に抑える工夫が行われているものの、国内における異好抗体に関する検討も必要である。

24時間迅速報告体制の構築においては、トロポニンIの依頼のあった約2,500件の依頼科別件数比率から、救命救急外来67%、内科外来21%であり総件数の約90%が外来からの依頼であることが分かった。このことは、トロポニンIが急性期心筋マーカーとして24時間緊急検査対応の重要性と迅速報告の必要性が伺える。またカットオフを0.1 ng/mLとした時、23%がトロポニンI陽性であり、鋭敏な心筋マーカーとして低濃度域での正確な測定が要求される。LOCI法による高感度測定は急性期心筋マーカーの1つとして極めて有用であり、同時依頼される他の生化学項目とも同時報告が可能である事は、救命救急を担当する医師から高い評価を得ている。

また、日常診療において依頼件数の多い甲状腺関連検査では、免疫検査専用分析装置のトラブルは多大な診療遅延に繋がるため以前よりバックアップ体制の構築を模索していた。そこで24時間迅速検査項目の更なる拡大を目的に、臨床からのニーズと検査部の体制を考慮しこれまで日当直帯ではオン・コール対応を実施してきた甲状腺検査3項目の24時間対応を決定した。当院で甲状腺関連検査の24時間対応を実施後、当直時に同月2例の甲状腺機能亢進症患者の診

断例を経験した。特徴的な身体所見に加え、TSHの著減、FT3、FT4の増加から、直ちにICUに入院となり内分泌専門医による治療が施された。その後、担当医師から甲状腺クリーゼであったことの説明を受け、早い診断と連携した治療が行えた事は患者さまのQOL向上に寄与することができ、24時間迅速体制の有用性を感じた。

今回の検討報告では示していないが、現在LOCI法による β HCGの測定も24時間対応を行っており、統合型分析装置（LOCI法、比色法、ネフェロメトリー法、電極法）による24時間迅速報告体制の構築は、さまざまな臨床からのニーズに柔軟に対応できる発展性のある分析装置であるといえる。

V. 結語

LOCI法による測定は、2つの合成粒子試薬とビオチン化抗マウスモノクローナル抗体フラグメントが含まれており、ホモジニアスサンドイッチ化学発光免疫測定法により血清又は血漿中の目的成分を測定する試薬である。また、B/F分離を必要としないため反応時間が短いにもかかわらず、高感度であるという特徴を有しており、検討結果より本法は、臨床に役立つ情報を正確に、安心して、迅速に報告できる、日常検査法として有用性が高い方法と考える。

文献

- 1) Ullman EF, Kirakossian H, Singh S, Wu ZP, Irvin BR, Pease JS, Switchenko AC, Irvine JD, Dafforn A, Skold CN and Wagner DB: Luminescent oxygen channeling immuno-assay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 5426-5430, 1994.
- 2) Ullman EF, Kirakossian H, Switchenko AC, Ishkanian J, Ericson M, Wartchow CA, Pirio M, Pease J, Irvin BR, Singh S, Singh R, Patel R, Dafforn A, Davalian D, Skold C, Kurn N and Wagner DB: Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method. Clin Chem, 42: 1518-1526, 1996.
- 3) Patel R, Pollner R, de Keczer S, Pease J, Pirio M, DeChene N, Dafforn A and Rose S: Quantification of DNA using the luminescent oxygen channeling assay. Clin Chem, 46: 1471-1477, 2000.