

〈特集：新しいテクノロジー・イムノアッセイ〉

全血微量検体を用いた血算とCRPの同時迅速測定

杉山 庸子、斉藤 憲祐

Simultaneous rapid measurement of CBC and CRP with a vary small amount of whole blood samples

Yoko Sugiyama and Kensuke Saito

Summary We developed a device which, for the first time, measured complete blood cell counts (CBC) and C-reactive protein (CRP) from whole blood samples, a concept designed to provide doctors useful information at the clinical site. In clinical investigations such as immunology, it made sense to avoid as far as possible hemolysis of the specimen. However, we developed a system that requires no coagulation of blood and no centrifugal separation when using hemolysis blood that did not intentionally affect an immuno-reaction. As a result, we were able to simultaneously analyze CBC and CRP, thus achieving results within five minutes after sample collection. Because we can easily and quickly analyze CBC and CRP in the presence of the patient, it is useful in diagnosing the severity of a disease, as well as in a differential diagnosis of bacterial and viral infections, thus facilitating decisions regarding the dosage of antibiotics, especially in the fields of pediatrics or the internal medicine.

Key words: Complete blood cell count (CBC), C-reactive protein (CRP), Hemolysis, Clinical site

I. はじめに

医師が今必要とする情報を、その場で提供しようというコンセプトから、世界で初めて血球計数（血算）とC-反応性タンパク（CRP）を同時測定する装置（自動血球計数CRP測定装置 Microsemi LC-667 CRP；以下LC-667）が開発された。従来、免疫血清検査などの臨床検査においては、検体の溶血を出来る限り避けることが

検査手技上の常識とされていた。しかし、この既成概念にとらわれることなく、免疫反応に影響を与えない方法により血球を故意に溶血させた試料を使用することで、血液の凝固および遠心分離などの検体の前処理を不要とした。この結果、全血検体を使用して、血算とCRPの結果を同時に、採血から5分以内に得ることが可能になった。このように、簡便で迅速に血算とCRPを同時に検査できることから、本製品は小

株式会社 堀場製作所 医用システム 事業推進部
〒601-8510 京都市南区吉祥院宮の東町2番地

Medical Electronic Systems Division, HORIBA, Ltd.
2 Miyanohigashi, Kisshoin, Minami-ku, Kyoto 601-8510, Japan

児科あるいは内科などの臨床現場で、重症度の診断、細菌感染とウイルス感染の鑑別診断、抗菌薬投与の決定に使用されている。

2010年の診療報酬点数の改定において、地域医療貢献加算および地域連携夜間・休日診療料の新設、地域連携小児夜間・休日診療料の増点などにより、地域連携が重視されている。加えて外来迅速検体検査加算が2倍に増点され、診療所においてもその場での検査結果に基づく診断、適切な治療法・治療薬の選択など、データに基づく医療の普及が期待されている。

II. 測定方法

LC-667での測定は、全血を溶血サポニン類溶液と混合することにより強制的に溶血させて被検試料とする工程、全血中の抗原と特異的に反応する抗体を固定化した不溶性粒子試薬と被検試料中の抗原とを凝集反応させる工程、生じた凝集混合液に対する光照射による吸光度変化を測定する工程、被検体試料のヘマトクリット値(%)を用いて演算による補正を行う工程から構成されている¹⁾。

LC-667による測定の工程は以下の通りである。

- 1) 全血 (8 μ L) に溶血サポニン類溶液 (100 μ L) を混合
- 2) 全血中の血球を溶血
- 3) R2緩衝液 (100 μ L)、R3抗CRP抗体感作ラテ

ックス試薬 (200 μ L) を混合

- 4) 凝集反応 (1分間)
- 5) 光 (波長660 nm) の照射
- 6) 吸光度変化の測定 (1分間)
- 7) ヘマトクリット補正 (全血補正)
- 8) 血漿成分中のCRP濃度の算出

III. 性能評価

3濃度の検体を用いて各々10回連続測定した際のLC-667の再現性について、白血球数(WBC), RBC, Hb, Hct, PLTはいずれの検体でもCV5.0%未満と良好、PLTに関してはCV4.0%以下、全血でのCRP測定は、CVは5.0%未満と良好な再現性が報告されている²⁾。

WBC, RBC, Hb, Hct, PLTおよび全血CRPの6項目について、装置の測定範囲内 (WBC 0.5~120.0 $\times 10^3/\mu$ L, RBC 0.50~7.50 $\times 10^6/\mu$ L, Hb 2.0~30.0 g/dL, Hct 5.0~80.0%, PLT 10~999.0 $\times 10^3/\mu$ L, 全血CRP 0.2~20.0 mg/dL) の濃度検体に対して良好な希釈直線性が報告されている²⁾。

血球計数のWBC, RBC, Hb, Hct, PLTの5項目については、LC-667とシスメックス社XE-2100との間で $R^2=0.979\sim 0.998$ と極めて良好な相関が報告されている²⁾。CRPに関しては対照機と、全血、血漿、血清いずれの検体でも $R^2=0.997\sim 0.998$ と良好な相関 ($r=0.999$) が報告されている²⁾。

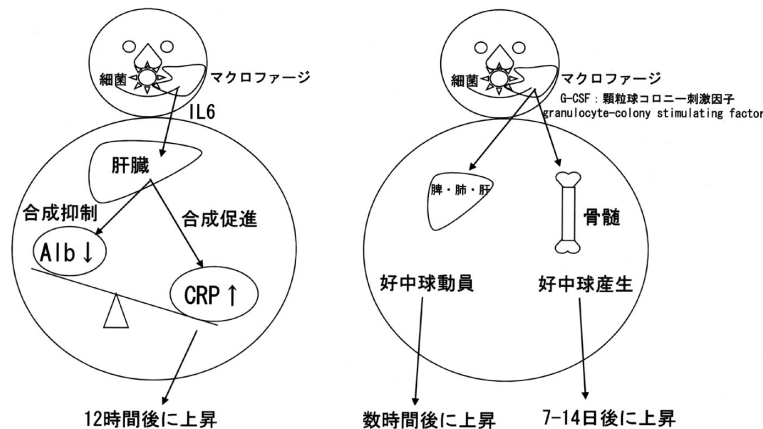


図1 CRPとWBCの生産メカニズム

IV. CRPとWBCが細菌感染で 上昇するメカニズム

CRPの名前は、肺炎球菌のC多糖体に沈降反応を示す血漿蛋白として発見されたことに由来している。CRPはCa²⁺の存在下で、肺炎球菌表面のリン脂質の一種であるホスホリルコリンに結合する。肺炎球菌以外にも、細胞質膜や毒素の構成成分としてホスホリルコリンを含む細菌は多く、これらの細菌のホスホリルコリンにCRPが結合し、凝集したCRPによって補体が活性化されることにより、食細胞による貪食および溶菌により生体防御に役立っている。このように、CRPは細菌感染に対する生体防御システ

ムとしての役割を持ち、細菌感染時には肝臓でのCRP合成が促進され、血中CRP濃度が上昇する。一方、ウイルスは細胞質膜の構造を持たないため、ウイルス感染時にはCRP濃度はあまり上昇しない。

細菌感染時には、マクロファージから産生されるインターロイキン6 (IL-6) が、肝臓でのCRP合成を促進する。肝臓でのCRP合成に時間を要するために、血中のCRP濃度が上昇するのは約12時間後となる³⁾ (図1)。

一方、白血球はマクロファージから産生される顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) により、脾臓、肺、肝臓に蓄えられている好中球が血中に動員されることから、感染数時間後には血中の白血球が増加する。G-CSFは骨髄にも働き、好中球の産生も促進し1週間程度で骨髄で産生されるが、通常では蓄えられている好中球が動員されるため、白血球は感染後速やかに増加する⁴⁾ (図1)。

このように、細菌感染後、白血球がより早期に増加し、CRPは白血球より遅れて上昇することから、CRPと白血球数 (WBC) を同時に測定することで、感染の時期を推定することが可能である。WBCのみ高値であれば感染初期、CRPとWBCが高値であれば極期、CRPのみが高値であれば感染後期と推定することが可能である⁵⁾ (図2)。従って、細菌感染の初期にはWBCを主に使用し、細菌感染の後期にはCRPを主に使用して炎症の状態を判断することが可能である。

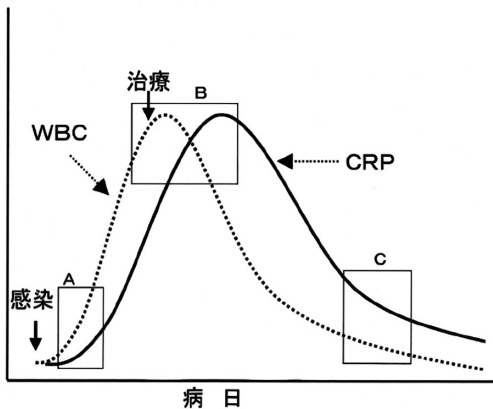


図2 CRPとWBCを同時測定する効果と意義

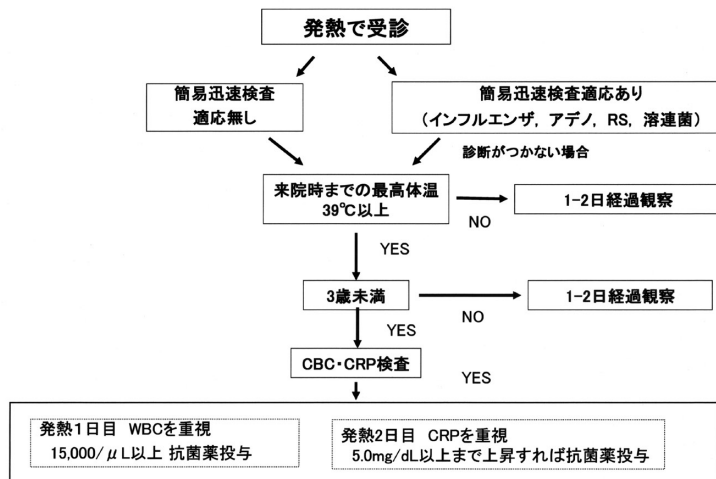


図3 抗菌薬投与の基準

発熱している患者の多くはウイルス感染症が原因である。ウイルス感染症に抗菌薬を投与しても効果は無く、耐性菌を増加させる恐れがある。このため、発熱の原因が細菌感染かウイルス感染かを鑑別して、細菌感染を疑った場合にのみ抗菌薬を投与することで、抗菌薬を適正に使用することが推奨されている。

V. 抗菌薬投与のフローチャート

図3に、小児科診療所での抗菌薬の投与基準の例を示す。高熱で受診した小児に対して、必要に応じてインフルエンザなどの簡易迅速検査を用い、確定診断されればタミフルやリレンザなどの抗インフルエンザウイルス薬等を処方する。簡易迅速検査で診断がつかない症例では、来院時の体温および年齢から、39℃以上でかつ2歳未満であれば、CBCとCRPを測定する。その際、発熱1日目はWBCを重視し、WBC 10,000/ μ L以上で抗菌薬投与を考慮し、WBC 15,000/ μ L以上で必ず抗菌薬投与、WBC 17,000/ μ L以上では抗菌薬を点滴静注する。発熱2日目以降はWBCよりCRPを重視し、CRP 2.0mg/dL以上で抗菌薬投与を考慮、5.0 mg/dL以上では抗菌薬を点滴静注している⁶⁾ (図3)。

CRPが5.0 mg/dL以上の場合には、細菌性髄膜炎、尿路感染症、胸水を伴う肺炎などの重症例が多くなるので、注意を要する⁷⁾ (図4)。

この施設では、開院当初は発熱がある小児には抗菌薬を投与するケースが多く、全処方箋の中で抗菌薬を含む割合は40%程度であった。しかしWBCとCRPを同時に測定できる装置を導入し、上述の抗菌薬の投与基準に基づいた診療を実践するようになってからは、抗菌薬を含む処方箋の割合は10-20%程度に減少したと報告されている⁶⁾。

VI. 肺炎の診断フローチャート

インフルエンザ患者は16歳以下で多いが、インフルエンザ感染後の合併症は65歳以上の高齢者ほど多いことが報告されている⁸⁾ (表1)。日

表1 A型インフルエンザの肺炎合併率 (2002-03 シーズン)

年齢層	対象者数	肺炎	合併症 (%)
0-15歳	729	1	0.14
16-64歳	969	8	0.83
65-79歳	97	2	2.06
80歳以上	30	4	13.33
合計	1,825	15	0.82

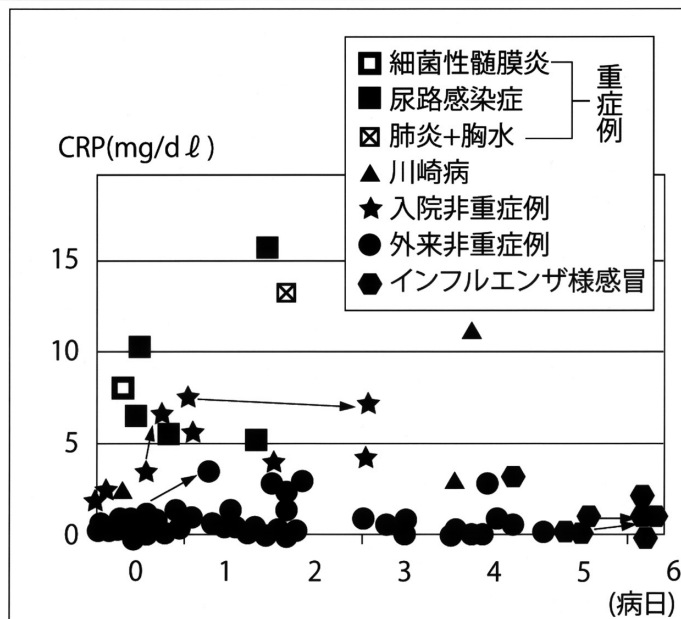


図4 発熱乳児のCRP値による重症度の判定

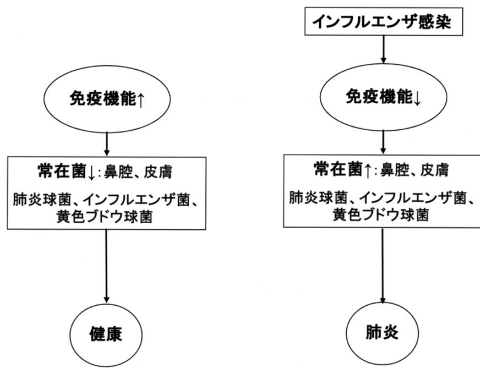
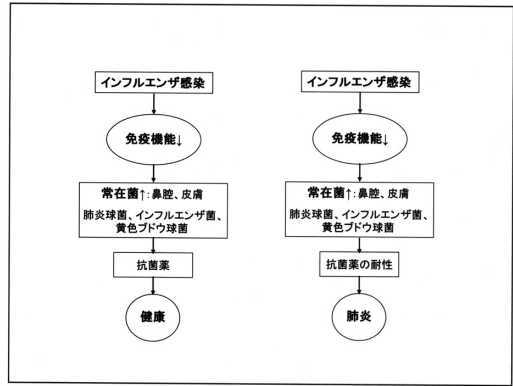


図5 二次性の細菌感染症のメカニズム



常在菌が増殖した場合でも、抗菌薬が効けば肺炎などの重篤な疾患を引き起こすことはありません。しかしながら、薬剤に対する耐性を持つ耐性菌に感染した場合には、抗菌薬が効かないので、肺炎を引き起こしてしまいます。

図6 抗菌薬の効かない耐性菌

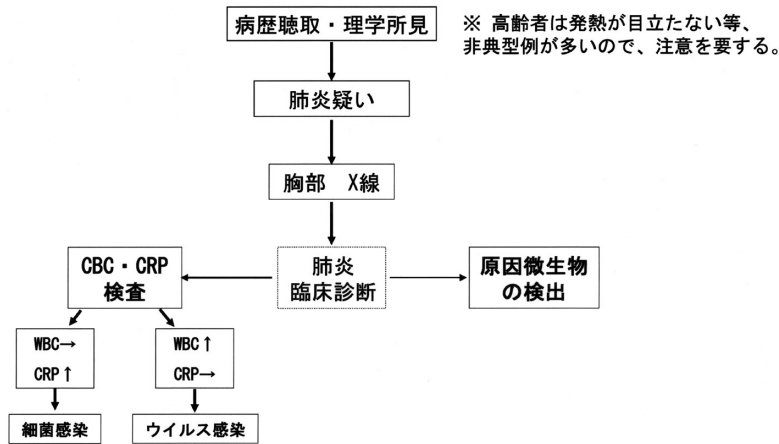


図7 肺炎の診断フローチャート

本人の死亡原因の上位3位は、悪性腫瘍、心疾患、脳血管障害であるが、4位は肺炎である⁹⁾。肺炎は高齢者で多く、日本の人口構造の高齢化を反映し、肺炎での死亡率は年々増加している。高齢者では肺の気管内の絨毛が少なくなり、異物を外に出す機能働きの衰えている。この異物が細菌の場合には、細菌が肺に入り込んで、肺炎を引き起こす。

市中肺炎の原因菌として最も多いのが肺炎球菌、インフルエンザ菌、黄色ブドウ球菌などの細菌である¹⁰⁾。これらの細菌は常在菌であり、

健常者でも持っているが、通常は免疫機能が勝っているので、細菌感染を引き起こすことはない。しかし、インフルエンザ感染により体力を消耗することで、免疫機能が減少すると、常在菌が増殖し、肺炎などの重篤な疾患を引き起こす(図5)。

常在菌が増殖した場合でも、抗菌薬が有効であれば肺炎などの重篤な疾患を引き起こすことはない。しかしながら、耐性菌に感染した場合には、抗菌薬の効果がないので、肺炎を引き起こす可能性が高くなる(図6)。

耐性菌の発生を抑制するには、ワクチンによる予防が有効とされている。しかし、日本はワクチン接種に対する考え方が遅れており、ワクチン接種が普及していない。このため、日本では、肺炎に対する検査体制の確立が重要となる。日本呼吸器学会・成人市中肺炎診療ガイドラインから一部改変した肺炎診断のフローチャート(図7)を示す。胸部X線による肺炎の確定診断後、原因微生物の検出と同時に、CBCとCRP検査により細菌性肺炎なのか、ウイルス性肺炎なのか、あるいは細菌性肺炎とウイルス性肺炎の合併肺炎なのかを鑑別後、適切な治療薬を選択することが推奨されている。

VII. まとめ

LC-667は、微量(18 μ L)のEDTA-2K加全血を使用するため、血液凝固および遠心操作を行わずに短時間(約4分)で、CBCおよびCRPを再現性良く測定可能であり、また日常検査法との相関も良好であることから、小児および高齢者をはじめとする急性炎症性疾患の初期診療現場において有用な機器である。

発熱は外来受診患者の訴えとして最も多いものの1つであり、発熱患者のリスクマネジメントとして、自然治癒するものと髄膜炎や肺炎などの重症の疾患の鑑別が必要である。また、CBCとCRPの検査により、細菌性感染症かウイ

ルス性感染症かの鑑別を行うことが可能であり、適切な薬剤の選択および治療を実施することが可能である。

参考文献

- 1) 長尾俊治, 大上創一, 山尾泰生: 自動血球計数CRP測定装置 LC-178 CRP. Readout-HORIBA Technical Reports, 29: 24-29, 2004.
- 2) 稲葉 亨, 山根洋子, 湯浅宗一, 藤田直久, 谷口弘志, 中島巧陽, 長岡洋樹: 自動血球計数CRP測定装置Microsemi LC-667CRPの基礎的検討. 日本臨床検査自動化学会会誌, 186 (34): 548, 2009.
- 3) 大谷英樹: 血漿蛋白と炎症マーカー. 臨床検査, 33, 1497-1500, 1989.
- 4) 武蔵 学: 血液専門医以外のための血液疾患対応マニュアル 症候編 白血球増加と減少のプラマリケア. 治療, 84(2): 231-235, 2002.
- 5) 鈴江純史: 小児実地医療においてCRPとWBCを診療時に即時測定する効果と意義. Readout, 19: 68-73, 1999.
- 6) 西村龍夫: 当院での抗生物質投与基準と投与数の変遷. 外来小児科, 5(2): 188-190, 2002.
- 7) 鈴江純史: CRP定量検査; 小児感染症で有用性を発揮, 入院や抗菌薬投与の見極めに. Nikkei Medical, 3月号, 2003.
- 8) 河合直樹他: インフルエンザ. 臨床と研究, 81: 1614-1618, 2004.
- 9) 厚生労働省 平成20年 人口動態統計(確定数)
- 10) 石田 直: 特集; 肺炎をめぐって。1 市中肺炎. 呼吸器ケア, 1(4): 436-443, 2003.