

Readout

HORIBA Technical Reports

特集 高機能分析

March 1999 ■ No.19

自動血球 C R P 測定装置 L C - 2 7 0 C R P の評価

Evaluation of the LC-270CRP Automatic Blood
Cell Counter and CRP Assay System

藤田直久・湯浅宗一・吉村 学・奥 成博

Naohisa FUJITA, Soichi YUASA, Manabu YOSHIMURA

Narihiro OKU

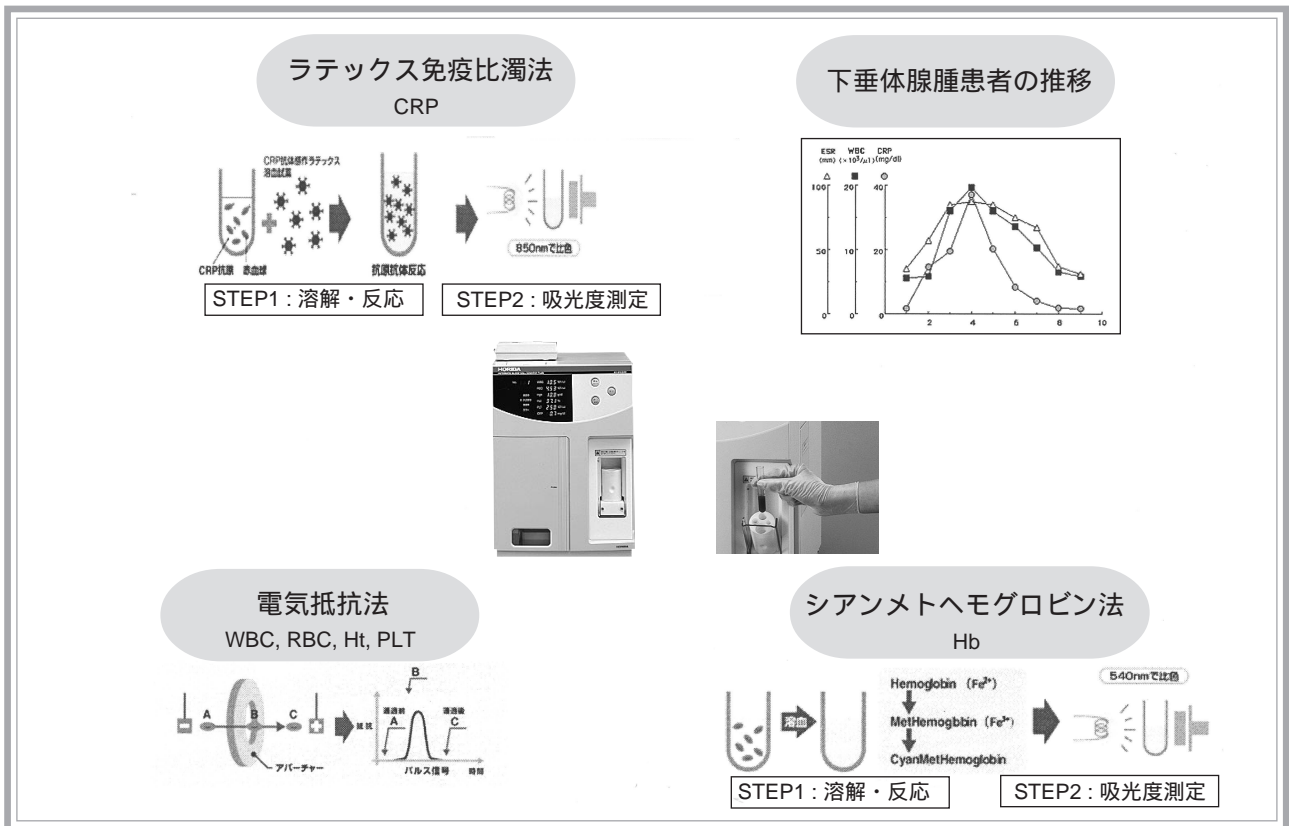
(Page62-67)

株式会社 堀場製作所

自動血球 CRP 測定装置 LC-270CRP の評価 Evaluation of the LC-270CRP Automatic Blood Cell Counter and CRP Assay System

藤田直久 湯浅宗一 吉村 學 奥 成博

(京都府立医科大学)



要旨

免疫血清検査のC反応性蛋白(CRP)は、急性炎症の診断指標として広く利用されている。

一方、白血球数(WBC)もまた、炎症・感染症関連の診断にはなくてはならない検査項目である。従来はCRPとWBCとは別々の測定装置ではかっていたため、医療現場の医師や検査技師が不便を感じるものが少なかった。今回、堀場製作所は両者を一つの測定装置で同時に測定できる自動血球 CRP 測定装置 LC-270CRP を製品化した。本装置は、CRP の測定には抗原抗体反応試薬によるラテックス免疫比濁法をまた、血球の計数には電気抵抗法を、ヘモグロビン測定にはシアンメトヘモグロビン法を使っている。本稿では、LC-270CR の再現性、妨害物質の影響、従来法との相関、さらに、臨床現場における検査症例を報告する。

Abstract

Both C-reactive protein(CRP) and white blood cell counts(WBC) are widely used and essential for the diagnosis of inflammations and infectious diseases. We have frequently used these two tests as important clues for evaluating these conditions. These tests require separate instruments and have been thought to be separately measured so far, CRP in serum and WBC in EDTA-added blood, respectively. Now, Horiba offers a new diagnostic instrument "LC-270CRP automatic blood cell counter and CRP assay system" which performs both tests simultaneously. To measure CRP, the instrument uses an antigen-antibody reaction reagent to perform a latex turbidimetric immunoassay. Blood cells are counted using the impedance method, and hemoglobin is measured by the cyanmethemoglobin colorimetric method. This article describes evaluation test results of the LC-270CRP, the carryover, the minimum detectable sensitivity, the dilution linearity and the correlation with conventional measurement methods. And also report three clinical trial using this instruments.

1. はじめに

C-反応性蛋白(CRP)は肺炎球菌菌体多糖類(C-物質)と反応する蛋白で、急性の組織損傷、感染症において血液中に増加するため急性相反応性物質として広く利用されている。一方、血球成分中の白血球数もCRPと同様に感染症、炎症性疾患を診断する上で重要な検査項目であり、前者と共に炎症状態の把握においてなくてはならない検査項目である。これらの2項目を同時に、かつ迅速に検査することは感染症、炎症性疾患の診断および治療に有用と考えられる。ホリバはラテックス免疫比濁法を用いたCRP検査と従来の血球計数と組み合わせた新しい全血測定システム LC-270CRPを開発した。

2. LC-270CRP の測定原理

LC-270 は、血球計数装置とCRPを同時に測定できる世界で初めての炎症マーカー計測機能付自動血球計数装置である。本装置で採用した測定方法としては、赤血球、血小板、白血球には電気抵抗検出法を、ヘモグロビンにはシアンメトヘモグロビン法を、そしてCRPにはラテックス免疫比濁法をそれぞれ使っている。本機の主な仕様を表1示す。

表1 LC-270CRPの主な仕様
Specifications of the LC-270CRP

測定モード	CBCモード(血算項目のみ) CRPモード(CBC+CRP)
測定項目	WBC, RBC, Hgb, Hct, PLT, CRP (C反応性蛋白)
血算項目	MCV, MCH, MCHC (プリンタまたはRS-232C接続時のみ)
測定方式	電気抵抗法: WBC, RBC, Hct, PLT シアンメトヘモグロビン法: Hgb ラテックス免疫比濁法: CRP
検体量	CBCモード: 10 μ l CBC+CRPモード: 18 μ l
測定時間	CBCモード: 75秒以内 CBC+CRPモード: 260秒以内
測定範囲	WBC: 0.5 ~ 80 10^3 個/ μ l RBC: 0.5 ~ 7.5 10^6 個/ μ l Hgb: 2.0 ~ 25g/dl Hct: 10 ~ 70% PLT: 20 ~ 900 10^3 個/ μ l CRP: 0.2 ~ 10.0mg/dl (血清: 0.2 ~ 7.0mg/dl)

2.1 電気抵抗検出法

電気抵抗検出法は、血液細胞(赤血球、血小板、白血球粒子)を等張性希釈液に懸濁させ、粒子が細い孔を通過するときに生じる抵抗の変化をアパーチャーの両側に取り付けた電極で計測するものである。そして、抵抗変化のパルス数から血球数を、パルスの高さから血球の容積を測定する。

2.2 シアンメトヘモグロビン法

まず、溶血剤により赤血球を破壊し、ヘモグロビンを希釈液中に溶出させ、溶血剤中の酸化物質によってメトヘモグロビンに転化し、さらにシアン化イオン(CN⁻)によってシアンメトヘモグロビンに転化させる。そして、ヘモグロビン濃度は、このシアンメトヘモグロビンの特性吸収波長である555nmにおける吸光度を測定してヘモグロビン濃度を求める。

2.3 ラテックス免疫比濁法

検体を溶血液(R-1)で溶血し、この溶血検体中のCRP抗原を抗ヒトCRP抗体感作ラテックス試薬(R-3)で凝集させる。この凝集塊に850nmの光を照射し、吸光度変化からCRP濃度を求める。また、同時に求めたヘマトクリット値から血漿中のCRP濃度を求める。

2.4 試料作成

血球計数用としてEDTA-2K入り採血管セキュータE4020(栄研機材)で採血された当院入院患者89名のEDTA全血、および同一人の血清を検討試料とした。

3. 結果

3.1 CRP 測定の基本特性

(1) 再現性

低濃度から高濃度までの3種類のEDTA全血および血清試料についてCRP測定を各々15回行ったところ、表2に示すように、EDTA全血ではCV2.21 ~ 5.31%、血清検体は1.72 ~ 2.34%といずれも良好な同時再現性が得られた。

一方、日差再現性については低濃度および高濃度の2種類の試料を冷蔵保存あるいは室温保存下で2日間測定した結果、CV3.1 ~ 4.2%といずれも良好な結果であった。(表2)なお、保存期間が3日を越えると検体に溶血が認められたため、日差再現性の検討は2日間のみとした。

表2 同時再現性と日差再現性

The precision of the CRP measurement, within-run and day-to day

	同時再現性			日差再現性			
	EDTA全血			室温		冷蔵	
	L(N=15)	M(N=15)	H(N=15)	L(N=3)	H(N=3)	L(N=3)	H(N=3)
Mean(mg/dl)	0.3	1.0	6.0	1.3	6.3	1.3	6.3
SD(mg/dl)	0.02	0.02	0.7	1.2	6.7	1.2	6.7
CV(%)	5.31	2.21	2.81	1.3	6.2	1.3	6.2
				1.2	6.7	1.2	6.3
				1.2	6.5	1.2	6.7
				1.2	6.6	1.2	6.7
				1.2	6.1	1.3	6.4
				1.2	6.3	1.2	6.6
				1.2	6.7	1.3	6.4
Mean(mg/dl)				1.22	6.46	1.24	6.48
SD(mg/dl)				0.04	0.24	0.05	0.20
CV(%)				3.6	3.6	4.2	3.1

	血清		
	L(N=15)	M(N=15)	H(N=15)
Mean(mg/dl)	0.8	3.0	7.0
SD(mg/dl)	0.02	0.07	0.13
CV(%)	2.20	2.34	1.72

(2) 妨害物質の影響

妨害物質の影響は、遊離型および抱合型ビリルビン、乳びについては干渉チェックAプラス(国際試薬), リウマチ因子については干渉チェックRF(国際試薬)を用いて評価した。遊離型ビリルビンでは17mg/dl, 抱合型ビリルビンでは20mg/dlまで, リウマチ因子は600IUまで影響は認められなかった。

EDTAについては通常使用量の5倍である5mg/mlまで影響がなかった。

一方, ホルマジン濁度2800まで影響を認めなかったため, 高脂血症症例の血清を添加してその影響を検討したところ, トリグリセライド1200mg/dlの添加でも影響は認められなかった(図1)。

(3) キャリーオーバー

CRP濃度20mg/dl以上の高濃度検体を連続3回測定の後, CRP濃度0mg/dlの検体を連続3回測定するサイクルを2回繰り返したが, いずれもキャリーオーバーを認められなかった(図2)。

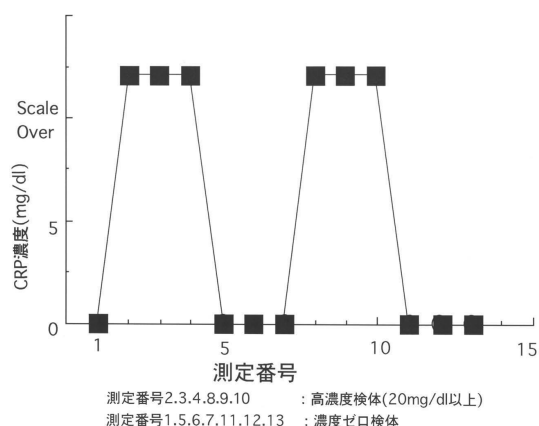


図2 キャリーオーバー

The carry over test for measurement of CRP

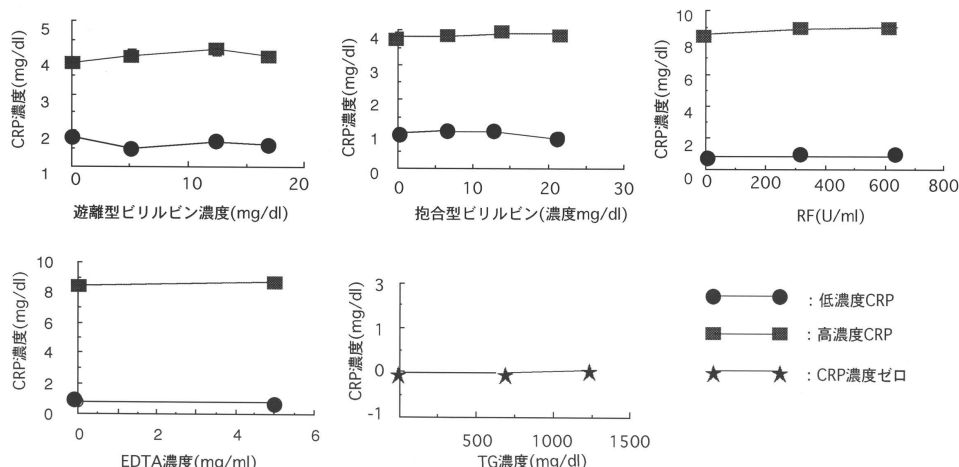


図1 妨害物質の影響

The influence of the interference substrate on the measurement of CRP

(4) 最小検出感度

CRP 濃度 0mg/dl の +2.6SD と各濃度の -2.6SD が重ならない最小の濃度を最小検出感度とすると最小検出感度は 0.2mg/dl であった(図 3)。

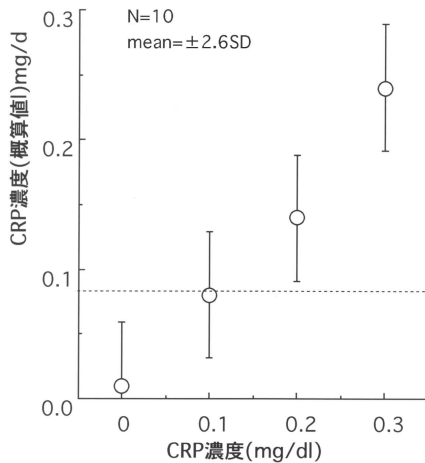


図 3 最小検出感度
The detection limit for the measurement of CRP

(5) 希釈直線性

血球計数用コントロール血液から血漿を遠心除去後同量の CRP 標準液(20mg/dl)を加え、これを更に血球計数用コントロール血液で段階希釈して直線性を調べたところ、10mg/dl まで直線性を示し、それ以上の検体でプロゾーン現象が認められた(図 4)。

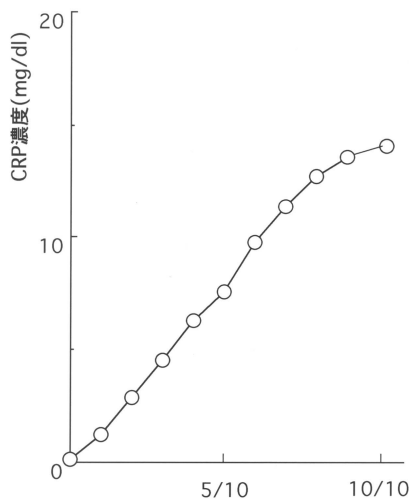


図 4 希釈直線性
The dilution linearity for the measurement of CRP

(6) 相関

EDTA 全血を試料とした本法での CRP の測定結果と同一人の血清を試料として日立 736 型自動分析機で測定した結果とを比較検討したところ図 5 に示すように良好な相関が得られた(P<0.001)。

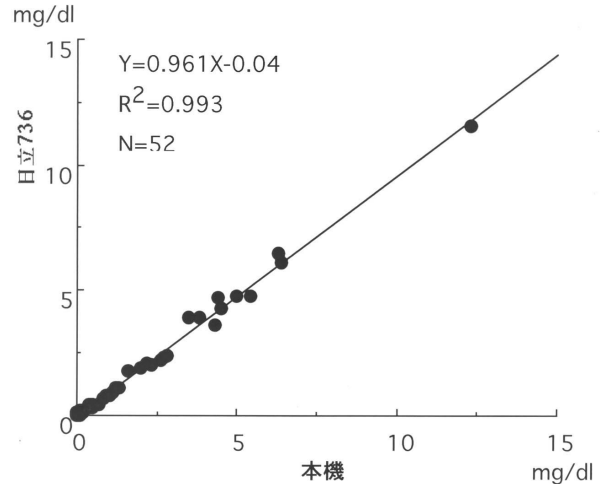


図 5 CRP 濃度の本法と他法の比較
The correlation between CRPO concentration by the Hitachi 736 and that by the LC-270CRP

なお、血球計数に関しては、本法と他法(Coulter counter STKS)との相関係数が 0.98 以上と良好なことを確認している。

3.2 臨床評価

本機を臨床検査の現場で使った症例を紹介する。

(1) 下垂体腺腫患者の症例

下垂体腺腫と診断された男性(63 歳)の CRP, WBC および ESR を 10 日間に 9 回測定し、その変動を観察した(図 6)。発熱と共に CRP は正常範囲内から最高 38mg/dl まで、WBC は 5,200/μl から最高 19,000/μl まで増加、ESR は 28mm から 82mm まで促進し、全身状態の改善と共にほぼ正常範囲内にまで急速に減少している。このような症例においてはいずれのマーカーにおいても炎症状態を示唆する結果が得られるものと考えられる。

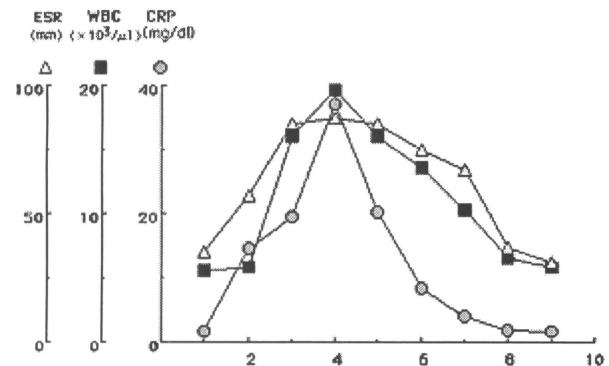


図 6 下垂体腺腫患者の症例
The case of the hypophyseal adenoma patient

(2) 脳腫瘍患者の症例

脳腫瘍と診断された女性(50歳)のWBCとCRPを22日間にわたり18回測定し、その変動を観察した(図7)。抗ガン剤の使用により白血球数が7,200/ μ lから減少傾向を示し、ついには400/ μ lにまで達した。それに対してCRPは白血球数が1,000/ μ lより更に減少する頃に発熱と共に急激に上昇し、ついには18mg/dlに達した。その後は白血球数の増加とともにCRPは正常域内にまで減少している。本症例の場合にはCRPの変動によってのみ炎症状態を把握することができた。

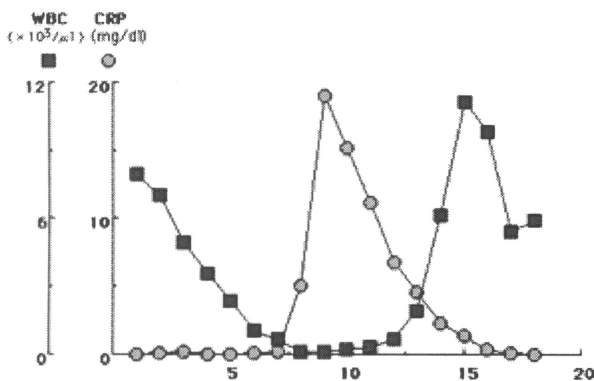


図7 脳腫瘍患者の症例
The case of the brain tumor patient

(3) SLE患者の症例

SLEと診断された女性(48歳)を10日間、8回測定した(図8)。

CRPはいずれも正常域内で変動しているが、WBCは40,000 ~ 5,000/ μ l程度であったのが23,000/ μ lまで急激に増加している。一方、この間、炎症を示唆する発熱等の症状は認められず、原因はステロイド剤投与によるものであった。

本症例より、WBCの急激な増加が必ずしも炎症状態を示すものではなく、症例2と同様にCRPの変動によってのみ炎症状態を把握することができた。

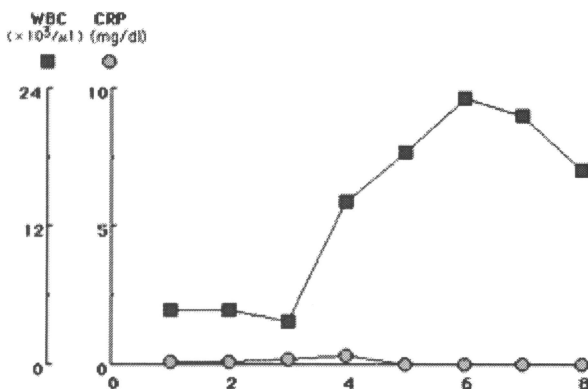


図8 SLE患者の症例
The case of the SLE patient

4. 考察

ホリバは炎症状態を迅速に把握し、しかも少量の採血で患者にかかる負担をいかに軽くするかという観点に立ち、CRPと血球数とを同時に測定できる自動血球CRP測定装置LC-270CRPを開発した。LC-270の再現性、妨害影響、キャリーオーバー、希釈直線性などの基本性能、他の機種との相関性はいずれも良好で、手軽な検査装置として十分に活用できるものである。

今回の試験では、全血を材料とする本装置のCRPの最小検出感度は、血清または血漿を材料とする他の方法^{1,2)}に比べ0.2mg/dlとやや低い傾向にあった。CRPの健常値について山岸らは0.06mg/dl以下³⁾、飯田らは健常者の84.5%は0.1mg/dlであると報告している。一方、新生児感染症ではCRPのみが経時的に上昇することが知られており⁵⁾、西田らは0.1 ~ 1.0mg/dlの範囲内でCRPの上昇傾向を捉えることで新生児感染症を早期に診断し得たと報告している⁶⁾。

簡便性と迅速性を特徴とする本装置は、健常値内の微小変化を捕らえたり、重症化予測診断や慢性化軽快期など低濃度領域の測定よりむしろ、CRP濃度0.5 ~ 10mg/dl程度で炎症の有無をスクリーニングし、加療するような急性・亜急性の感染症の診断・治療には極めて有用であると言える。

LC-270CRPの優れた点は、従来、血球計数の目的で採血されたEDTA加全血を用いて血球計数と同時にCRPの測定が行えることである。従来の考え方ではCRPは生化学検査室、血球計数は血液検査室という複数の検査室に検査依頼をするという固定観念があったが本システムはこれを払拭するものである。更に、またCRP測定にはプレーン容器、血球計数には抗凝固剤入り容器といった異なった採血管の準備も不要になった。しかもEDTA採血管を遠心分離をすることなくCRPと血球計数の同時測定が可能となった。このことは医療に従事する者の労力軽減のみならず、ベッドサイドで採血しその場で測定し、わずか5分で測定結果が得られるという診療直結型のベッドサイド検査を可能とした。このことは何よりも患者サービスにつながるものであり、今後の臨床検査の方向性を示唆するものと期待している。

参考文献

- 1) 大竹和子, 他: CRP測定用ラテックス試薬の日立7070形自動分析装置への適応, JJCLA, 20: 844-849, 1995
- 2) 石田浩二, 他: 日立7450自動分析装置を用いたラテックス免疫比濁法によるCRP測定, JJCLA, 21: 97-101, 1996
- 3) 山岸安子, 他: ラテックス近赤外比濁法(LPIA)によるCRPの微量測定 第2報 健常値と微量定量の意義, 臨床病理, 32: 1389-1394, 1984
- 4) 飯田久也, 他: 近赤外比濁法(LPIA system)によるC反応性タンパク質(CRP)測定の検討, 臨床検査機器・試薬, 6: 705-709, 1983
- 5) 河野均也, 他: 座談会 免疫比濁報による血漿蛋白測定上の問題点, 臨床検査機器・試薬, 20: 503-517, 1997
- 6) 西田陽, 他: 新しい新生児モニタリングシステムの検討, 日本小児科学会雑誌, 90: 2691-2700, 1986



藤田直久

Naohisa FUJITA Md, PhD

京都府立医科大学
臨床検査医学教室
助教授



湯浅宗一

Soichi YUASA

京都府立医科大学
臨床検査部
技師長 補佐



吉村 學

Manabu YOSHIMURA Md, PhD

京都府立医科大学
臨床検査医学教室
教授



奥 成博

Narihiro OKU

医用システム統括部
マネージャー

