

表面プラズモン励起増強蛍光分光（SPFS）を用いた バイオマーカー測定技術の救急医療への応用

Emergency Medicine Application of Biomarker Measurement Technology Employing
Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy

寺田 孝太郎*
Kotaro TERADA

大谷 真紀子*
Makiko OTANI

村山 貴紀*
Takanori MURAYAMA

井出 陽一*
Youichi IDE

要旨

救急医療の現場、特に米国の救急処置室（ER）では、混雑解消が喫緊の課題となっている。緊急処置の要否が未判明の患者が滞留することにより、病院にとっては限られたリソースの浪費、患者にとっては長時間の待機による苦痛や適時の治療機会の喪失といった問題が生じている。混雑を緩和するためには、急性心筋梗塞（AMI）等の迅速な治療が必要な疾患と、同じ胸痛を主訴とする他の疾患とを早期に鑑別することが重要とされている。

AMIの診断では、血中の心筋トロポニンI（cTnI）タンパク質の測定が推奨されている。特に近年、従来よりも高感度なcTnI測定を行うことで、診断の正確性と迅速性が増すとする研究が多数報告されている。しかし、高感度cTnI測定は、現状では中央検査室に設置されている大型システムでのみ可能なため、ERからの検体搬送が必要である。更に、測定サンプルとして血漿を調整する工程が事前に必要となる。このため救急医が高感度cTnIの測定結果を受け取るまでに60分以上を要しており、混雑の十分な解消には至っていない。

そこで我々は、ERに設置可能で、全血検体をそのまま使用することができ、10分で高感度cTnI測定を完了することができるcTnI SPFSシステムを開発した。測定原理として、表面プラズモン励起増強蛍光分光法（SPFS: Surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy）を採用することにより、小型システムでの高感度測定を実現した。

本システムの基本性能を評価したところ、検出下限（LoD）が2.5 ng/L、変動係数が10%となる定量下限（LoQ）が7.2 ng/Lで、既存の高感度cTnI測定用大型機と同等であった。血漿検体60例を用いた相関性試験では、既存大型機に対して良好な相関性を示した。更に、全血検体30例を用いたマトリックス試験では、血漿の測定値との良好な相関を確認し、全血検体が使用可能であることが確認できた。以上から、救急現場で本システムを用いることにより、非AMI患者の早期鑑別・除外ワークフローが実現され、十分な混雑解消の達成に繋がるものと期待される。

Abstract

In the field of emergency medicine, especially in emergency rooms in the United States, the reduction of overcrowding is an urgent task. Patients retained in the ER waste limited hospital resources, and patients suffer from excessively long waiting times for treatment. To reduce overcrowding and provide timely patient treatment, triage must quickly distinguish conditions that require immediate attention, such as acute myocardial infarction (AMI), from less serious conditions whose symptoms (such as chest pain) mimic those of AMI.

In diagnosing AMI, it is recommended to measure the cardiac troponin I (cTnI) protein in the blood with high sensitivity to achieve fast and accurate diagnostic results. At this time, however, such high sensitivity cTnI measurement is possible only in large systems currently found in a hospital's central laboratory, necessitating transport of samples from the emergency room to the central laboratory. Further, since whole blood cannot be used as a measurement sample, the preliminary step of preparing plasma samples from whole blood must be taken. All this takes over 60 minutes for the ER physician to receive results.

To meet this challenge, we developed a small, prototype system that can be kept in the ER, can use whole blood specimens, and can complete high sensitivity cTnI measurement in just 10 minutes by using surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy (SPFS).

The analytical sensitivity of this system is equivalent to existing systems in hospital central laboratories that provide high sensitivity cTnI measurement, and agreement of measurements with hospitals' central laboratory systems is good. Furthermore, in a matrix test using whole blood specimens prepared by spiking healthy whole blood with a standard cTnI antigen, a strong correlation between whole blood and plasma was confirmed. The use of this system in the ER promises to greatly aid triage identification of AMI and non-AMI patients, thus reducing ER overcrowding.

* 開発統括本部 HC技術開発室

1 はじめに

救急医療の現場、特に米国のERでは、搬送される患者による混雑を解消することが喫緊の課題となっている。緊急処置の要否が未判明の患者が滞留することにより、病院にとっては設備や医療従事者などのリソースの浪費、患者にとっては長時間の待機による苦痛や適時の処置を受ける機会の逸失といった問題が生じている¹⁾。救急搬送される患者の中では、胸痛を症状とするケースが多いため、胸痛の元となる疾患の迅速・正確な診断が混雑緩和に必要とされている²⁾。近年の米国疾病管理予防センター（CDC）の調査においては、主要因が胸痛である15歳以上の救急搬送患者は年間約600万人であり、全要因の中で最多を占めたと報告されている³⁾。

胸痛で想定される疾患として多くの割合を占めるのが急性冠症候群（ACS）である⁴⁾。ACSは冠動脈に血栓が形成されることにより生じる複数の病態を包含した疾患概念である。その重度の病態として、虚血による心筋壊死で発症するAMIが含まれ、AMIである場合には早期の外科的処置が必要となるが、非AMIの場合は緊急処置を必要としない。このため、混雑を緩和するためには非AMI患者を早期鑑別・除外することが重要となる。最近の大規模コホート研究では、胸痛による救急搬送患者のうち約4割が結果的に非AMIであり、早期除外が可能であったと報告されている⁵⁾。

AMIの診断では、心筋損傷に対する特異性が最も高い、cTnIタンパク質の測定が必要不可欠とされている⁶⁾。特に近年、国際臨床化学連合（IFCC）が提唱する、高感度cTnI測定システムのクライテリア⁷⁾に合致するシステムでの高感度cTnI測定が重要との認識が広まりつつある。このため、病院の中央検査室に設置されている大型の免疫検査装置を用いた高感度cTnI測定が、実用化され始めている⁸⁾。

十分なレベルの混雑緩和を達成するには、救急医が非AMIの医療判断を行うまでに要する時間を、30分以内にすべきとする報告がされている⁹⁾。しかし中央検査室の大型の免疫検査装置を用いる場合、cTnIの高感度測定は可能となるが、医療判断を行うまでに60分以上を要してしまうケースが多い¹⁰⁾。大型の免疫検査装置を用いたワークフローでは、ERから中央検査室への検体搬送時間、全血サンプルからの血漿サンプル調整時間、大型装置での測定時間などを必要とするためである¹¹⁾。したがって、ERに設置可能なデスクトップサイズで、全血サンプルをそのまま測定することができ、測定時間が短い高感度cTnI測定システムが求められている。しかしながら、このようなcTnI測定システムは存在しない。

我々はこれまでに、SPFSを信号発生・検出技術として採用した高感度サンドイッチ免疫測定の要素技術を確立し、肝臓癌マーカーの α -フェトプロテイン、前立腺癌マーカーのLacdiNAc-PSAの測定例を報告している^{12) 13)}。本免疫測定法は、マイクロ流路による微小空間での高効

率な免疫反応および、バックグラウンドノイズを極力抑えた信号検出を特徴としている。このため、デスクトップサイズの高感度免疫測定システムに採用する技術として最適である。我々は本技術を応用し、Fig. 1に示すワークフローを可能とすべく、全血サンプルを用いて僅か10分で高感度cTnI測定を行うことができるcTnI SPFSシステムを開発した。本稿では、この新規システムの性能評価結果を報告する。

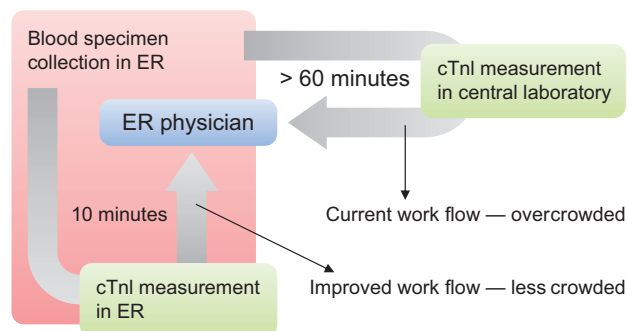


Fig. 1 High sensitivity cTnI immunoassay system's rapid workflow in diagnosing acute myocardial infarction.

2 高感度cTnI測定システムの概要と試薬開発

cTnI SPFSシステムは、デスクトップサイズの測定装置と使い捨てタイプのcTnI測定用試薬カートリッジから成り（Fig. 2）、1患者サンプルにつき1カートリッジを使用する。測定装置は、最大で3つのカートリッジを同時架設・測定することができる。カートリッジを装置にセットし、カートリッジのサンプル注入ウェルへ全血サンプルもしくは血漿サンプルを添加した後は、装置により自動で免疫反応、蛍光検出が実行される。cTnI SPFSシステムの基本仕様をTable 1に示す。

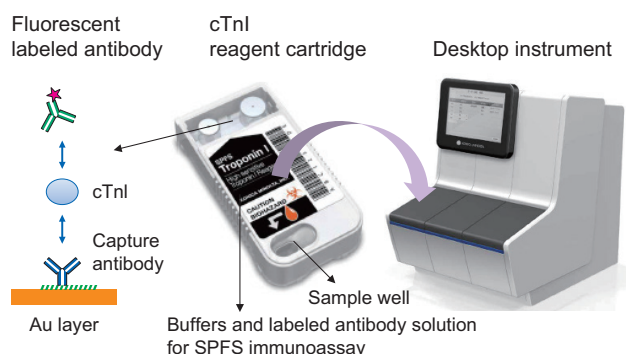


Fig. 2 The cTnI SPFS system. The system consists of disposable reagent cartridges and a desktop measuring device.

cTnI測定用試薬カートリッジには、cTnI抗体が予め固相化された検出用チップが装填され、その他に検体希釈液、蛍光色素標識抗体液、洗浄液等の測定に必要な液状試薬が予め充填されている。このうち、蛍光色素標識抗体を均一に再現性よく、それも量産スケールで作製す

る生産技術と、蛍光色素標識抗体液の作製技術が、IFCCの高感度クライテリア⁷⁾を満たす他社大型システムと同等の分析性能を達成するために重要である。具体的には、蛍光色素の抗体への標識方法を最適化し、目標とするシグナルノイズ比を確保した。また標識抗体液に高分子化合物ベースの増感剤を添加することにより、安定検出に必要なとされるレベルのシグナル絶対値を達成することができた。以上の検討で最適化した試薬を充填した試薬カートリッジを用いて、cTnI SPFSシステムの性能評価を実施した。なお評価には、インフォームドコンセントが得られている患者もしくは健康人の全血サンプルと血漿サンプルを使用した。

Table 1 Specifications of the cTnI SPFS system.

Sample type	Heparinized plasma Heparinized whole blood
Sample volume	200 µl
Turnaround time (TAT)	10 minutes
Measurement range	13 ng/L to 50,000 ng/L (between-run CV < 10%)
Number of measurement slots	3

3 高感度cTnI測定システムの基本性能評価

3.1 測定感度

測定感度の評価として、ブランク上限 (LoB), LoD, LoQを算出した。LoBとLoDは、0濃度社内キャリアプレートと低濃度血漿サンプル3例を3日間に渡り2重測定し、CLSI EP-17Aガイドラインに準じて合成標準偏差法により算出したところ、それぞれ1.1 ng/L, 2.6 ng/Lであった。LoQは、血漿サンプル4例を6日間に渡り2重測定し、プレジジョンプロファイル法によりCVが10%となるcTnI濃度として算出したところ、7.2 ng/Lであった (Table 2)。同じ測定サンプルを用いて同時に評価した他社の高感度cTnI測定用大型システム (X社システム) に対し、SPFSシステムの測定感度は同等レベルであることを確認した。

3.2 再現性

3濃度 (Low:52ng/L, Mid:315ng/L, High:48,000ng/L) のcTnI社内標準物質を同日に6重測定した結果、各濃度のCVは3.8%, 3.8%, 2.6%と良好な同時再現性であることを確認した (Table 2)。

3.3 希釈直線性

cTnI陽性のヘパリン血漿サンプル2例にそれぞれcTnI社内標準抗原をスパイクし、2濃度のスパイクサンプルを用意した (Low: 44ng/L, Mid: 336ng/L)。各サンプルを10段階希釈してcTnI SPFSシステムで測定したところ、約4ng/Lまで直線性が得られた (Fig. 3)。本結果よ

り、cTnI SPFSシステムは、血漿マトリックス成分による影響を受けずにcTnI濃度を正確に測定できることが示された。

Table 2 Analytical sensitivities and within-run imprecisions of our cTnI SPFS system and company X's system for central hospital laboratories.

	Our cTnI SPFS system	Company X's system
LoB	1.1 ng/L	0.8 ng/L
LoD	2.6 ng/L	2.5 ng/L
LoQ	7.2 ng/L	6.9 ng/L
CV 10%		
Within-run imprecision (CV)	52 ng/L 3.8%	N.D.
	315 ng/L 3.8%	N.D.
	48,000 ng/L 2.6%	N.D.

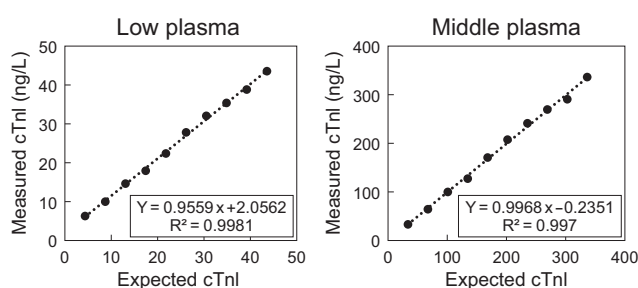


Fig. 3 Dilution test of two cTnI positive heparinized plasma samples with different concentrations spiked with in-house standard cTnI antigen.

3.4 既存大型システムとの相関

cTnI陽性のヘパリン血漿サンプル60例 (3ng/L-46,173ng/L) について、SPFSシステムとX社システムの両方で測定し、その相関性を評価した。近似直線のR²値は0.99以上と良好であり (Fig. 4)、サンプル中のcTnIを既存大型機と同等に検出できていることが確認された。

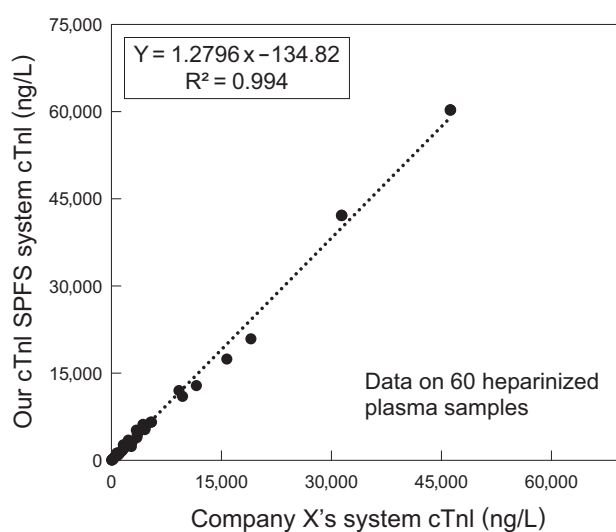


Fig. 4 Correlation of measurement data: our cTnI SPFS system versus company X's system.

Measurement was conducted on 60 cTnI positive heparinized plasma samples. The range of measured cTnI concentrations was from 3 to 46,173 ng/L.

3.5 全血検体の測定

健常人ヘパリン全血サンプルにcTnI社内標準抗原をスパイクし、4-60,256 ng/Lの濃度範囲の全血サンプルを30例作製した。全血サンプルそのもの及び、全血サンプルを遠心分離して調整した血漿サンプルの両方を測定し、cTnI定量値の一致率を評価した。近似直線のR²値は0.99以上と良好であり (Fig. 5), cTnI SPFSシステムは、全血サンプル中の血球成分による顕著な影響を受けず、cTnI濃度を正確に測定できることが示された。

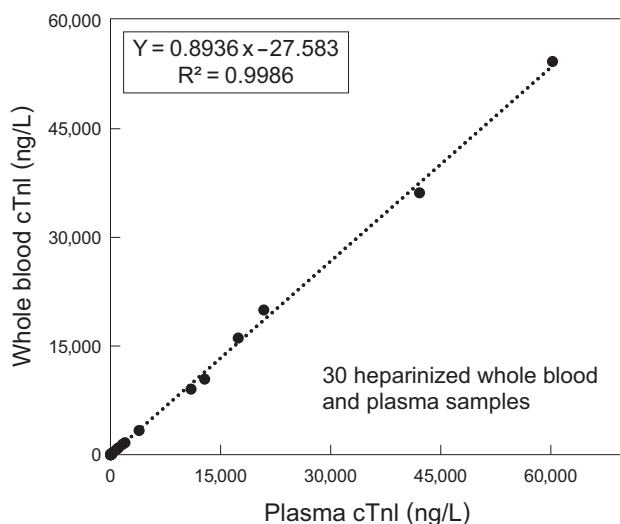


Fig. 5 Correlation of measurement data with our cTnI SPFS system: heparinized plasma samples versus heparinized whole blood samples. Whole blood samples were prepared by spiking in-house standard cTnI antigen to commercially available healthy whole blood. The range of measured cTnI concentration was 4 to 60,256 ng/L.

3.6 干渉物質の影響

cTnI社内標準抗原をスパイクした市販の健常人全血サンプルに、5種の干渉物質をそれぞれ添加し、cTnI SPFSシステムで測定を実施した。各干渉物質の添加上限濃度は、リウマチ因子500IU/mL、溶血ヘモグロビン510mg/dL、乳び1490ホルマジン濁度、遊離型ビリルビン21.1mg/dL、抱合型ビリルビン21.1mg/dLとした。各干渉物質の上限濃度添加時でも、干渉物質非添加時の測定値の±10%を越える影響が無いことを確認することができた。

4 まとめと今後の検討

cTnI SPFSシステムは、X社システムと同等の測定感度を有し、相関性も良好であることを今回の検討で確認することができた。更に、測定サンプルとしてX社システムでは使用不可能な全血サンプルを使用できることを示した。X社システムを用いた他施設の臨床研究においては、ACS疑いの患者のうち、緊急処置を要さない患者を高い確度（陰性的中率99%以上）で早期除外することができたとする報告がされている⁵⁾。したがって、X社と同等の分析性能を有するcTnI SPFSシステムも、同様の

臨床性能を発揮することができると言える。以上から、cTnI SPFSシステムを救急処置室へ設置することにより、非AMI患者早期除外のワークフロー改革が実現され、混雑緩和に寄与するものと期待される (Fig. 1)。またcTnIに加え、急性心不全マーカーの脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、静脈血栓塞栓症マーカーのフィブリン分解産物 (D-dimer) を迅速測定するための試薬カートリッジ開発にも取り組んでいる。これらをラインナップに加えることで、ER混雑緩和をより促進することができるものと考えられる。

今後は、大学病院等と協力しながら個別患者の新鮮全血検体の測定例数を増やし、測定システムの分析性能やロバスト性、臨床性能について確度を高めていく必要がある。併せて試薬カートリッジの安定した生産体制の確立を進めながら上市を目指す。

●参考文献

- 1) Salway et al. *Rev. Med. Clin. Condes*, 28 (2), 213-219 (2017)
- 2) Fox, Diercks *Clin Exp Emerg Med*, 3 (1), 1-8 (2016)
- 3) Niska et al. *National Health Statistics Reports*, 26, (2010)
- 4) Roffi et al. *Eur Heart J*, 37 (3), 267-315 (2016)
- 5) Neumann et al. *JAMA Cardiol*, 1 (4), 397-404 (2016)
- 6) Thygesen et al. *Circulation*, 126, 2020-2035 (2012)
- 7) Love et al. *Heart Metab*, 67, 9-14 (2015)
- 8) トロポニンキット アーキテクト・high sensitive・トロポニンI 体外診断用医薬品 添付文書
- 9) Amundson, Apple, *Clin Chem Lab Med*, (2014)
- 10) Možina et al. *Point of Care*, 9, (2010)
- 11) Nørgaard, Mogensen, *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 20 (71) (2012)
- 12) 彼谷高敏, 松尾正貴, 石田賢治, 須田美彦, “表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いた高感度免疫測定システムの開発”, *Konica Minolta Tech. Rep.*, Vol.9, 95-98 (2012)
- 13) 金子智典, 彼谷高敏, 小島駿, 中村幸登, 須田美彦, “表面プラズモン励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いた糖鎖マーカー定量による前立腺癌診断法の開発”, *Konica Minolta Tech. Rep.*, Vol.13, 73-78 (2016)