

臨床化学

2025
Vol.54 Supp.1

JAPANESE JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY

ピットフォール症例解析マニュアル
～異常事例の発見から解析まで～

一般社団法人
日本臨床化学会



臨床化学
Jpn J Clin Chem
Vol.54 Supp.1

作成にあたって

臨床化学・免疫血清検査は自動化・標準化が進んだ分野であるが、それでもなお、我々を誤った判断へと導くさまざまなピットフォールが存在する。日常検査においては、時として、患者の病態を反映しない非特異的反応、ひいてはピットフォール事例に遭遇することがある。しかし、業務が忙しい、解析法がわからない、などの理由により原因究明に至らないケースも多いのではないだろうか。

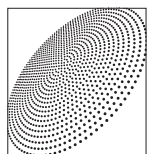
このような事例の中には、貴重な症例が潜んでいる可能性もあり、限られた貴重な検体を適切に解析することの重要性は言うまでもない。そこで、日本臨床化学会ピットフォール研究専門委員会では、2018年より相談窓口を設置し、広く事例の相談を受け付けてきた。

さらに、解析手法に関する正しい理解が不可欠であることから、解析チャートおよび解析方法に関する目的、原理、解釈、注意点などを整理し、2023年3月より日本臨床化学会のホームページにて、「ピットフォール症例解析マニュアル～異常事例の発見から解析まで～」として公開した。

このたび、本マニュアルを広く参考文献としてご活用いただくため、日本臨床化学会誌の補冊として正式に発行する運びとなった。多くの方々に本マニュアルをご活用いただき、ピットフォール解析への理解を深めるとともに、その奥深さや魅力にも触れていただければ幸いである。

2025年7月

日本臨床化学会ピットフォール研究専門委員会



1. ピットフォール疑い事例の発見	4
2. 解析前の確認事項	4
3. 解析チャート	5
4. 各論	
確認方法	
① 反応タイムコースの確認	小島 和茂 6
② 他の試薬・測定方法による確認	濱田 悦子 7
解析方法	
③ 希釈直線性試験	細羽恵美子 9
④ 添加回収試験	細羽恵美子 10
⑤ 試薬成分添加試験	三好 雅士 11
⑥ 血清蛋白・リボ蛋白分画電気泳動	菅野 光俊 12
⑦ アイソザイム電気泳動	川崎 健治 14
⑧ ポリエチレングリコール(PEG)処理	清宮 正徳 15
⑨ 免疫グロブリン吸収試験	土筆 智晶 16
⑩ 異好抗体阻止試験	阿部 正樹 17
⑪ 還元処理	上田 一仁 19
⑫ ゲル濾過分析	中野 恵一 21
⑬ ウエスタンブロット法	長田 誠 23
⑭ シアテスト(Sia euglobulin precipitation test)	阿部 雅仁 24
⑮ 検体の不活性化	阿部 雅仁 25
⑯ ノイラミニダーゼ処理	濱田 悦子 26

ピットフォール研究専門委員会 (50音順)

2025年4月1日時点

委員長：三好 雅士(徳島大学病院)

副委員長：中野 恵一(北海道大学病院)

委員：阿部 雅仁(栄研化学株式会社)

石嶺 南生(信州大学医学部附属病院)

上田 一仁(関西医療大学)

長田 誠(国際医療福祉大学)

川崎 健治(千葉大学医学部附属病院)

小島 和茂(日本電子株式会社)

菅野 光俊(福島県立医科大学)

清宮 正徳(国際医療福祉大学)

土筆 智晶(北里大学病院)

中沢 隆史(株式会社日立ハイテク)

細羽恵美子(東京女子医科大学)

脇 雅宏(ニッソーボーメディカル株式会社)

オブザーバー：濱田 悦子(文京学院大学)

ピットフォール疑い事例の発見

分析装置やLISの発展によって、さまざまな方法で誤った結果が報告されないようシステム化されているが、臨床検査にはさまざまなピットフォールが潜んでいる。

ピットフォール疑い症例の発見は、LISによる前回チェック、極端値チェック、項目間チェックなど、分析装置の反応タイムコース異常が発端となる場合がある。また、再測定あるいは希釈再検時における測定値の乖離、年齢・性差で想定し得ない測定値を認めた場合や、臨床症状と検査結果の乖離、他施設からの患者移動、試薬性能・比較検討時に発見される場合も多い。

発見の発端

1. 前回チェック
2. 極端値チェック
3. 項目間チェック
4. 反応タイムコース異常
5. 再検または希釈再検時の測定値の乖離
6. 年齢・性差で想定し得ない測定値
7. 臨床症状と検査結果の乖離
8. 他施設からの患者移動
9. 試薬性能・比較検討

解析前の確認事項

はじめに同一の装置で連続したエラーがないか確認することが大切である。分析装置の洗浄ノズルの不具合などでは、連続したエラーが発生している場合が多い。また、同一検体の複数項目で問題が発生している場合は、輸液混入などがいないか確認することも必要である。

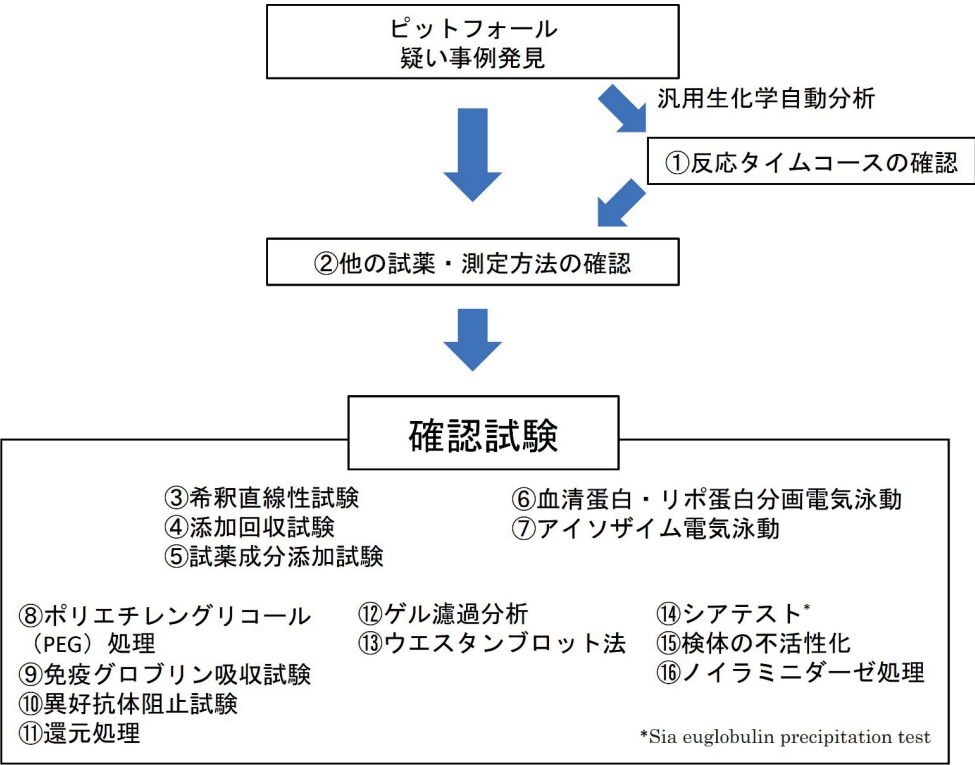
さらに、高度の溶血や乳び、フィブリン塊の析出がないかなど、検体の性状に問題はないかを確認することも必要である。特に、温度依存性の蛋白(クリオグロブリンなど)は注意が必要である。また、初検と再検時に値が乖離した際は、検体の保存状況(ビリルビンの光による影響、酵素の失活など)を合わせて確認することが必要である。

確認事項

1. 同一の装置で連続したエラーがないか
2. 同一検体の複数項目
3. 検体の性状

解析チャート

疑い症例を発見し、前述のような確認事項において解決しない場合は、下記のような流れで解析を進めることが有効である。各方法の、目的、原理、解釈などは各項を参照していただきたい。



① 反応タイムコースの確認

【目的】

生化学自動分析装置において、試料・試薬の分注から測定終了時までの吸光度変化を複数の波長で確認することができる。装置の異常・非特異反応・検体の色の度合いなどの異常要因を推測する。

【原理】

エンドポイント法、レート法などの測定法により定量される測定対象項目の吸光度変化を確認することができる。各検査項目の正しいタイムコースを把握することにより、異常なタイムコースを判別することができる。

【方法】

キャリブレーション時(ブランクおよび標準液)、健常者試料(濃度同程度の別試料)などを比較し、異常なタイムコースの判別を行う。全ての反応タイムコースを確認することができないため、極端値(LOW・HIGH)チェック、項目間チェック、前回値チェックなどの測定値の監視と生化学自動分析装置の反応タイムコースのチェック機構を併用し、検査過誤対策を実施し、タイムコースの確認を促す必要がある。

【明らかになる点】

- 生化学自動分析装置の不具合
(試薬・検体吸引不良、コンタミネーション、光源ランプ劣化、気泡、攪拌不良・・・etc)
- 非特異反応(M蛋白の影響やクリオグロブリン・・・etc)
- 検体の色(乳び・溶血・黄疸)

【明らかにならない点】

- 異常要因の特定は困難(推定は可能)
- 検体の目視確認・再測定・希釈試験などの結果も確認し、総合的に判断が必要

【解釈と注意点】

- 複数のタイムコースを比較する際には、吸光度のスケール設定を調整し、必要部分は拡大してデータの確認を行う。
- 反応タイムコースを確認する際、2波長測光の場合は演算吸光度だけでなく主波長、副波長それぞれの形状も確認することで機器由来の異常(光源ランプ劣化、気泡など)と検体由来の異常(非特異反応など)を区別できる場合がある。
- 生化学自動分析装置や試薬に問題があった場合には、装置のメンテナンスや試薬の交換後に再測定が必要。また、すでに複数検体の測定で問題が発生している可能性もあるので、過去にさかのぼってタイムコースの確認を実施する。

【参考文献・解析文献】

- 1) 小島和茂：【自動分析装置における反応タイムコースの基礎と活用事例】生化学自動分析装置機器メーカーにおけるタイムコースの利用法 日本電子株式会社, 医療検査と自動化, **45**(Supp.1): 55-61, 2020.

② 他の試薬・測定方法による確認

【目的】

異常事例が発生した場合、その原因を早急に発見し、正確なデータを報告する必要がある。異常の原因が試薬側・機器側、測定方法にあるのか、もしくは患者試料にあるのかを大別し、原因を解析することを目的とする。

【原理】

測定原理は、試薬および測定方法により異なる。他の試薬および測定方法によって確認することで、何がデータに影響しているかを鑑別する。

【方法】

用手法か自動分析装置に代表される自動化法かにより対応法が異なる。

① 自動分析装置における異常データの解析例を図1に示す(詳細は各装置を参照)。

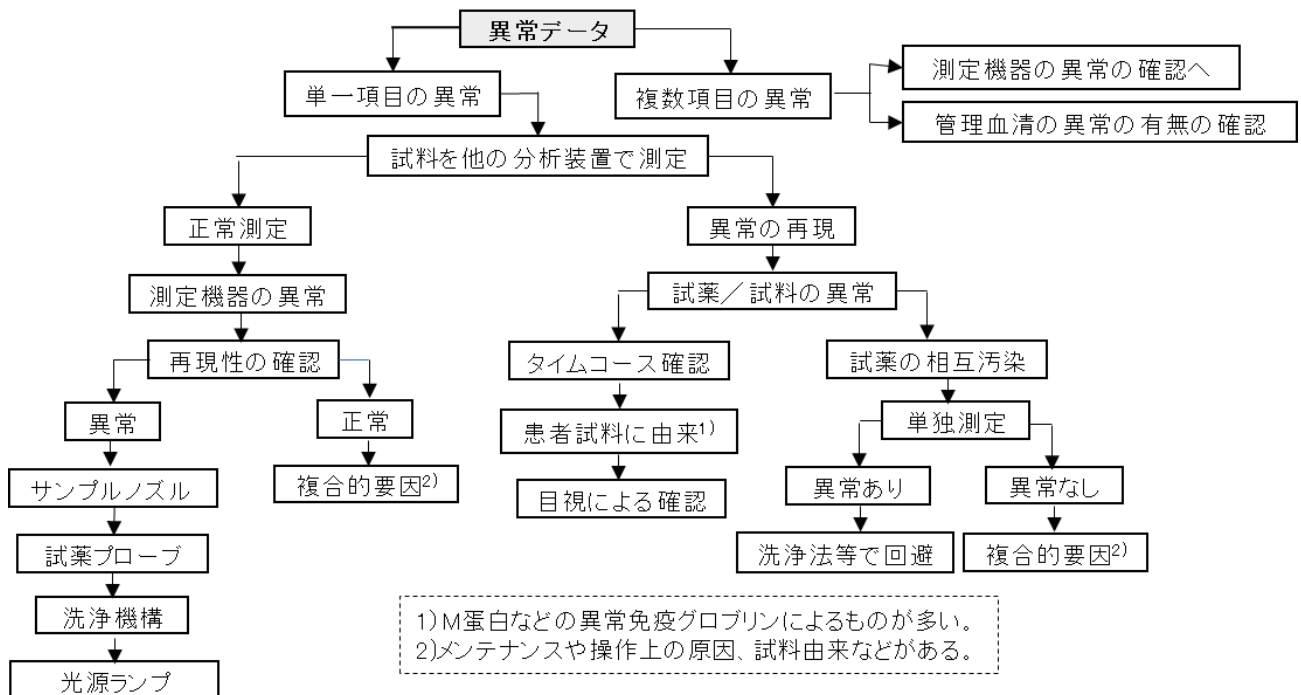


図1 自動分析装置異常データの解析フローチャート

② 用手法と自動化法に共通項目の代表的なものに以下があるため、各要因を解析する(詳細は文献などを参照)。

主な生化学・免疫検査データの異常には、患者試料に由来する異常(酵素的異常、投与薬剤、免疫グロブリン、異好抗体、分子異常蛋白、自己抗体、RF、フィブリン、マイクロフィブリン、乳び、採血管起因、他)、測定対象物質と構造類似物質の交差反応(ホルモン、薬剤、NCA-2、感染症抗体など)、測定対象物質の構造の多様性や不均一性、測定装置や試薬の異常、試薬の構成成分、操作・メンテナンスのミスによる異常、測定法間の違いによる異常(原理の違いなど)、薬剤の干渉による異常、さらには内部精度管理および外部精度管理試料測定(測定原理、添加物、由来酵素、マトリックス、電極特性、分析機構、試料の取違い、記入ミス

など)による異常などがある。

【明らかになる点】

- 異常原因が測定原理，試薬，機器，もしくは患者試料のどこにあるか。

【明らかにならない点】

- 試料，試薬および方法(手技など)に問題はなく，原理の違い，同機種 of 機器間差および同試薬の試薬間差によりデータに差異が生じている場合の報告値の選択

【解釈と注意点】

- 異常値を示す要因は多種多様のため，文献などを参考に解析を進めていく。

【参考文献・解析文献】

- 1) 日本臨床化学会ピットフォール研究専門委員会 ピットフォール事例集
- 2) 日本臨床検査自動化学会：生化学自動分析装置の異常データ事例集，日臨検自動化会誌，**31** (Suppl.1)：1-92，2006.
- 3) 中井利昭，桑 克彦，細萱茂実，家入蒼生夫，池田 齊，市原清志，他：自動分析異常の解析技術マニュアル及び自動分析運用指針 Ver.1.7(2010.9.1)，日臨検自動化会誌，**35**：1-146，2010.

③ 希釈直線性試験

【目的】

試薬に干渉を及ぼす成分の有無を確認する目的で行う。

【原理】

高値を示した異常検体は、希釈により原因物質の濃度が低下し非特異的反応の影響が弱まるため直線性が得られない。

【方法】

- ① 非特異反応を示す試料を生理食塩水もしくは専用希釈液などを用い、段階希釈系列を作成し測定する。
- ② 段階希釈した測定値をプロットし近似曲線を描く。
- ③ 原点を通る直線が得られていることを確認する。

※あらかじめ、原液濃度より段階希釈の理論値を求めておき、理論値から $\pm 5\%$ のずれがあった場合を直線性がないと判断するなど、評価基準を決めておく。

【明らかになる点】

- 試薬に干渉を及ぼす成分の有無

【明らかにならない点】

- 非特異反応の原因物質の特定

【解釈と注意点】

- 非特異反応であっても希釈直線性が保たれるケースもあるので注意が必要である。

【参考文献・解析文献】

- 1) 阿部正樹, 鈴木晴美, 杉本健一: Human anti-mouse antibody(HAMA)による非特異反応症例における血清希釈直線性に関する考察, 日臨検自動化会誌, **40**: 10-15, 2015.
- 2) 齊藤 翠: 日常業務で遭遇しやすい非特異反応とその確認方法, 生物試料分析, **40**: 156-161, 2017.

④ 添加回収試験

【目的】

添加した目的成分が試料中で正確に測定できるかを確認する目的で行う。

【原理】

標準物質を血清に一定の割合で添加，添加後の測定値を理論値と比較することにより回収率を求める。

【方法】

標準物質を用いた方法を示す。

- ① 既知濃度の試料：標準物質
- ② 対照血清：非特異反応を起こしている試料，確認したい試料など

$$\text{回収率} = \frac{\text{添加試料の測定値} - \text{対照血清の測定値}}{\text{添加量(理論値)}} \times 100(\%)$$

一般に $100 \pm 5\%$ 以内を妥当な回収率とする。

※血清標準物質を用いる場合は容量比を対照血清：血清標準物質を 1：1～1：3 程度にして実施する。

【明らかになる点】

- 自己抗体が関与する非特異的反応
- 非特異反応物質の関与

【明らかにならない点】

- 非特異物質の同定

【解釈と注意点】

- 測定試料と組成が異なるため，標準物質の添加量には注意が必要である。

【参考文献・解析文献】

- 1) 金井正光 監，奥村伸生，戸塚 実，本田孝行，矢富 裕 編：第1章 臨床検査総論，臨床検査提要(改訂第35版)，金原出版，東京，2020。
- 2) 齊藤 翠：日常業務で遭遇しやすい非特異反応とその確認方法，生物試料分析，**40**：156-161，2017。
- 3) 飯塚儀明，桑 克彦：臨床化学検査 回収試験法と干渉物質の影響試験法，検査と技術，**24**：356-360，1996。

⑤ 試薬成分添加試験

【目的】

血清に測定試薬あるいは試薬成分を混和し、混濁など性状変化の有無を確認する。

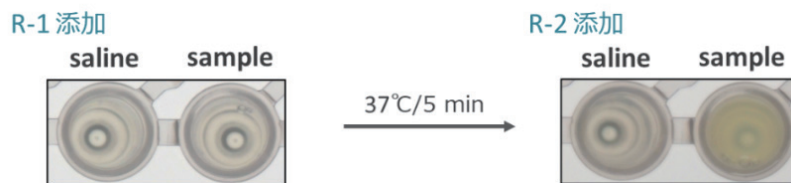
【原理】

血清と測定試薬が混和されることにより、試薬成分やpHが変化し、混濁などの性状変化が生じる場合がある。M蛋白やリウマトイド因子(RF)などが原因物質として挙げられるが、混濁を生じる条件はさまざまである。

【混和結果の1例¹⁾】

第2試薬の添加により当該検体で混濁を認めた。

生食対照では混濁を認めず、血清と測定試薬の混和による非特異的な性状変化が示唆された。



【方法】

測定条件と同じ割合で原血清と試薬を混和し、その性状を目視による確認、または、吸光度を測定する。試薬中の単体成分を添加する場合も、試薬含有量を照らし合わせて、同様に実施する。

【明らかになる点】

- 試薬中の成分により生じる非特異的な混濁

【明らかにならない点】

- 混濁の原因物質

【解釈と注意点】

- ラテックス免疫比濁法を原理とする測定試薬では、反応増強剤としてポリエチレングリコール(PEG)が使用されている場合が多く、M蛋白やRFはPEGにより凝集し、非特異反応の原因となることがある。
- 全ての含有成分を開示していない試薬の場合、原因の特定にはメーカーの協力が必要である。

【参考文献・解析文献】

- 1) 西岡麻衣, 三好雅士, 上田 舞, 中尾隆之: ALP測定において非特異的な混濁を生じた原発性マクログロブリン血症の1例, 徳島県臨床検査技師会誌, **58**: 13-18, 2021.

⑥ 血清蛋白・リポ蛋白分画電気泳動

【目的】

非特異反応の原因となりうるM蛋白や異常脂質などの検出をはじめ、検体中に量的・質的な異常蛋白や脂質が存在するかを観察することを目的とする。

【原理】

溶液中にあるコロイド粒子に電場を与えた場合に移動する現象を利用した分析方法が電気泳動である。本原理を利用して、血清蛋白・リポ蛋白分画電気泳動が実施されている。

血清蛋白は両性電解質でありアルカリ溶液中では負に荷電するため、電場を与えると、陽極側へ移動する。移動速度は個々の蛋白質の表面荷電の違いにより異なる。

支持体を用いた電気泳動においては、溶媒(液体)と支持体(固体)が接すると、その界面において固体側は負(-)に帯電し、液体側は正(+)に帯電し、正負2層の電気二重層を生じる。これに直流電流をかけると、正に帯電した溶媒分子が陰極側に移動する。この現象を電気浸透という。

電気泳動の支持体には、セルロースアセテート(セ・ア)膜、寒天(アガー、アガロース)ゲル、ポリアクリルアミドゲル(PAG)などが用いられる。

【方法】

蛋白分画電気泳動

- ① セルロースアセテート膜電気泳動法(染色：ポンソー3R, ポンソー3Sなど)
- ② アガロースゲル電気泳動法(染色：ポンソーS)
- ③ キャピラリー電気泳動法

リポ蛋白分画電気泳動

- ① アガロースゲル電気泳動法(脂質染色：Fat Red 7B, oil red O, Sudan black B)
- ② アガロースゲル電気泳動法(酵素法によるコレステロール，トリグリセライド分別染色法)
- ③ ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

詳細な方法は、成書または各種取扱説明書を参照されたい^{1,2)}。

【明らかになる点】

- ・量的・質的な異常蛋白(M蛋白・免疫グロブリン結合複合体・2峰性アルブミンの存在や γ グロブリン欠損、Lp-X, Lp-Yなど)の存在

【明らかにならない点】

- ・量的・質的な異常蛋白が電気泳動で検出されたとしても、非特異反応にどのような関与をしているかを特定することはできない。

【解釈と注意点】

- ・量的・質的な異常蛋白が認められた場合、下記のような電気泳動を適宜追加する。
 - ✓免疫電気泳動 → M蛋白同定、欠損蛋白の同定、量的異常を示す異常蛋白血症の分析

- ✓免疫固定電気泳動法 → M蛋白同定
- ✓ポリアクリルアミドゲル電気泳動 → 分子量の確認
- ✓等電点電気泳動 → 等電点・荷電の確認
- リボ蛋白分画において、アガロース電気泳動ではカイロミクロンは粒子が大きいために原点に留まる。

【参考文献・解析文献】

- 1) 藤田清貴：臨床検査で遭遇する異常蛋白質 基礎から発見・解析法まで，医歯薬出版，東京，2010.
- 2) 金井正光 監，奥村伸生，戸塚 実，本田孝行，矢富 裕 編：第6章Ⅳ 血清脂質とリボ蛋白，臨床検査法提要(改訂第35版)，金原出版，東京，2020.

⑦ アイソザイム電気泳動

【目的】

主に乳酸脱水素酵素(LD)、クレアチンキナーゼ(CK)、アルカリホスファターゼ(ALP)、アミラーゼ(AMY)が対象になる。

生化学検査で酵素活性に異常が認められた場合に、病態やその原因を探索するためにアイソザイム分析を行うことによって、分画の欠損、過剰な分画、移動度の異常、テーリングやリーディングなどの分画像の異常の有無を観察することを目的とする。

【原理】

アガロースゲル電気泳動

【方法】

- ① セルロースアセテート膜電気泳動法(染色：酵素活性染色)
- ② アガロース電気泳動法(染色：酵素活性染色)
- ③ ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(染色：酵素活性染色)

詳細な方法は、成書または添付文書を参照されたい^{1,2)}。

【明らかになる点】

- 血清アイソザイム分析で異常パターンが検出された場合は、成書を参照されたい¹⁾。
- LDアノマリーの場合は、赤血球を用いたアイソザイム分析を行うことにより遺伝性変異が明らかになる。
- 遺伝性変異が否定された場合は、免疫グロブリン結合型である場合が多い。
- 免疫グロブリン結合の有無をアイソザイム分析で証明することが可能である。

【明らかにならない点】

- アイソザイム分析では、免疫グロブリン結合が認められなかった場合に、その酵素に結合している物質を同定することは困難である。
- アイソザイム分析では、酵素の中でどのサブユニットとの結合なのかを同定することはできるが、サブユニットの結合部位を同定することは困難である。

【解釈と注意点】

- 酵素活性の異常値に気が付いたら、検体を適切に保管して解析できるようにする。
- 異常値の原因が特定できたら、速やかに依頼医に連絡し、不要な検査が繰り返されないように適切に対応する。
- 血清蛋白電気泳動を行い、M蛋白の有無を確認することも一助となる。

【参考文献・解析文献】

- 1) 藤田清貴：臨床検査で遭遇する異常蛋白質 基礎から発見・解析法まで、医歯薬出版、東京、2010。
- 2) 川崎健治：化学検査 アイソザイム染色、染色法のすべて、水口國雄 編集代表、医歯薬出版、pp.408-415、東京、2022。

⑧ ポリエチレングリコール(PEG)処理

【目的】

異常反応の原因に免疫グロブリンの関与が疑われる際に、免疫グロブリンを吸着して異常反応の減弱を確認する。

【原理】

PEGが水に溶解する際にはPEGの周りに水を引き付ける。蛋白質は蛋白分子の周りに水分子を水素結合させて水に溶解しているが、PEGを加えるとPEGが蛋白質表面に結合している水分子を奪い取るため、蛋白質は不溶性となり沈殿する¹⁾。原理としては蛋白質の塩析に似る。

【方法】

PEG6000の25%水溶液と検体を等量混合して攪拌し、遠心して上清を測定する。検体処理後に40%以上の測定値の低下によりPEG試験陽性と判断するという方法が報告されている²⁾。試験時には目的物質の同程度の濃度の別検体も同時に行って比較する(対照試験)。

【明らかになる点】

異常反応の原因として免疫グロブリンなどの異常蛋白が関与しているかどうかの確認

【明らかにならない点】

- 原因となる異常蛋白の種類

【解釈と注意点】

- 免疫グロブリンなどを非特異的に吸着して沈殿させることで、これらの異常反応への関与を予想する(スクリーニング)もので、原因物質の特定はできない。
- 測定物質の分子量が大きいとPEG処理により沈殿する可能性があるので、測定物質の分子量が小さい場合に向く。
- スクリーニング法なので、本法で陽性が確認された場合は免疫グロブリンなどの関与を他の方法で確認する必要がある。

【参考文献・解析文献】

- 1) 堀尾武一，他：蛋白質・酵素の基礎実験法，南江堂，pp.63-67，東京，1985。
- 2) 大澤 進，細萱茂実，飯塚儀明，大久保滋夫，白井秀明，芦原義弘，他：免疫化学検査の異常データの解釈と対応の仕方 Ver.1.0(2015.6.1)，日臨検自動化会誌，**40**(Suppl.1)：3-116，2015。

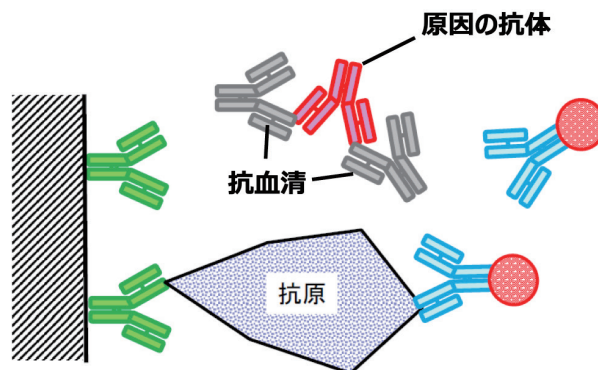
⑨ 免疫グロブリン吸収試験

【目的】

免疫グロブリンが非特異反応に参与しているかを確認するため。

【原理】

測定系に非特異反応の原因となる抗体が存在する場合、その抗体を結合する免疫グロブリンなどで吸収することにより、非特異反応が解消される。



【方法】

① 抗ヒト免疫グロブリン特異抗血清

- 被検血清と特異抗血清を適切な混合比で混和し、4℃で一晩放置の後に遠心上清を測定する。
- 抗血清が正しい反応を示すことを確認するため、異なる陽性検体に抗血清を添加した対照をおき、測定値が変わらないことを確認することが望ましい。さらに必要に応じて抗血清中の測定対象物質の有無についても確認しておく。

② プロテインG・A・L

- 製品として市販されているアガロースや磁気ビーズなどに固定化されたProtein GやProtein AやProtein Lを操作書に従い検体と反応させ、遠心上清を測定する。

【明らかになる点】

- 免疫グロブリンが非特異反応に参与していること。

【明らかにならない点】

- Protein GはIgG、Protein AはIgG・A・M・EとProtein LはIgG・A・M・D・Eと結合する。影響を及ぼす免疫グロブリンのクラスについては、Protein Gに反応するIgG以外の免疫グロブリンクラスは分からない。

【解釈と注意点】

- 回収率が低値であった場合、免疫グロブリン結合による非特異反応が考えられる。
- 抗血清の力価は製品により異なるため、予備検討により免疫グロブリンが吸収できる最適比を確認する必要がある。
- 自己抗体か異好抗体かの判別はできない。

【参考文献・解析文献】

- 大澤 進, 細萱茂実, 飯塚儀明, 大久保夫, 白井秀明, 芦原義弘, 他: 免疫化学検査の異常データの解釈と対応の仕方 Ver.1.0(2015.6.1), 日臨検自動化会誌, **40**(Suppl.1): 3-116, 2015.
- 阿部正樹, 歳川伸一, 塩谷美江子, 俵木美幸, 佐藤 翠, 田中祥子, 他: Dimensionによるタクロリムス測定における偽高値の解析, 医学検査, **61**: 844-849, 2012.

⑩ 異好抗体阻止試験

【目的】

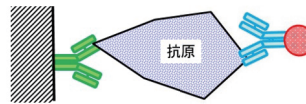
HAMA (Human anti-mouse antibody) などの異好抗体による測定系への干渉がある場合、偽高値や偽低値といった誤った測定結果をもたらすことがある。その干渉が疑われる場合、干渉の有無を確認するために行う。

【原理】

HAMAは抗マウス抗体であることから、マウス血清由来の吸収剤で吸収試験を行い、測定値が妥当な数値になるかを確認する。以下のようなサンドイッチ法の場合の干渉は偽陽性となるため、本操作により測定値は低下する。なお、ヤギ、ウサギ、ウシなどマウス以外の動物に対する異好抗体の確認にはその動物由来の成分を用いる。

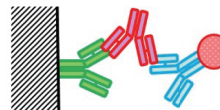
サンドイッチ法の原理図

正常な反応



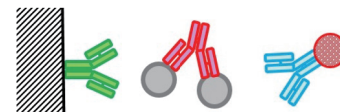
HAMAによる干渉

偽陽性



吸収剤による吸収効果

干渉阻止→陰性



 : HAMA  : 吸収剤  : 標識物質

【方法】

筆者らの行っている HBR-1 (Heterophilic blocking reagent-1 : Scantibodies 社) を用いた方法を記載する。

前段階：疑われる検体について試薬の異なる他の測定法でも測定し、他法での異常値の有無を事前に確認する。

通常、測定法が異なると大部分のケースは、異常が発生しない。

- ① HBR-1 を PBS (phosphate-buffered saline) にて 1 mg/mL に調整する。
- ② ① を検体に 1 : 1 の割合で添加し、よく混和後最終濃度 500 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で冷所に一晚放置する。この際、試薬に余裕があれば吸収剤が正しい反応を示すこと確認するため、異なる陽性検体に吸収剤を添加した対照をおき、測定値が変わらないことを確認することが望ましい。
- ③ 遠心後に上清を測定し測定値の変動を確認する。異好抗体の影響が 100% 除外できると、理論的には影響を受けない他の測定方法と同様の結果を示す。

<市販の阻止剤>

- HBR-1 (Heterophilic blocking reagent-1 : Scantibodies 社)
複数のマウスのサブクラスを含む抗ヒト IgM マウスモノクローナル IgG 抗体。HBR-1 がチューブに固相された HBT (Heterophilic Blocking Tube) もある。
- IIR (Immunoglobulin Inhibiting Reagent : Bioreclamation 社)
ヒト異種抗体や HAMA を免疫原としたマウスモノクローナル抗体の混合物

- MAKシリーズ (Roche Diagnostics社)
マウス IgG のフラグメント別干渉除去剤
① MAK33-IgG1, ② MAK33-IgG1/IgG1 Poly, ③ MAK33-IgG1/Fab1 Poly, ④ MAK-IgG2b/Fab2a Poly, ⑤ MAK33-Framework IEP
- その他
HeteroBlock, TruBlock, 市販のマウス血清など

【明らかになる点】

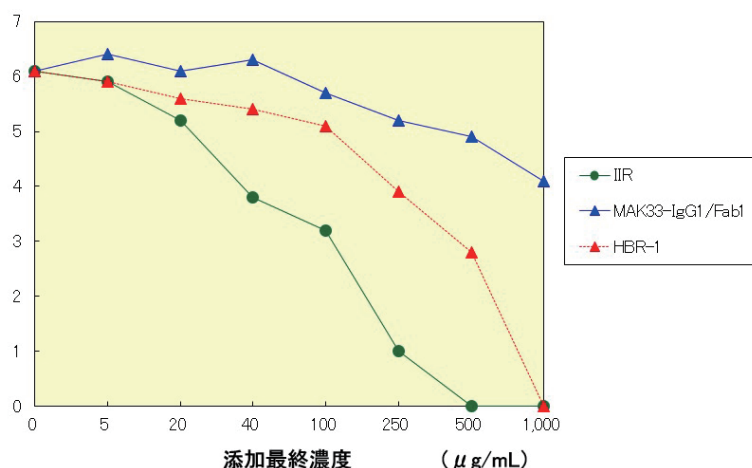
- 異好抗体による測定値への干渉の有無

【明らかにならない点】

- 異好抗体の免疫グロブリンクラス

【解釈と注意点】

- 記載の吸収剤は抗イディオタイプ抗体やフレームワーク領域とのみ反応する HAMA には無効である。その確認には試薬に用いられている抗体そのものにより吸収試験を実施する必要がある。
- HBR-1, IIR, MAK33-IgG1/Fab1 POLY の3種の吸収剤を用いての HAMA 症例に対する吸収効果を比較した結果を以下に示す。症例は IgM 型の HAMA によりタクロリムス無投与ながらも高値を示した症例である。本症例では IIR が最も効果的な吸収剤であった。また、既出の HBR-1 による本症例での吸収効果は、図のように終濃度 500 $\mu\text{g/mL}$ でも確認可能であった。さらに実験のように HBR-1 添加量を増量し、効果の増大を確認する追加試験の必要性はその時の状況によるが、経費的な問題からも約 50% 測定値が低下した終濃度 500 $\mu\text{g/mL}$ でも効果の確認は十分である。なお、症例により効果的な吸収剤が異なるため、1 種類では決められないケースもある。



【参考文献・解析文献】

- 1) 森山隆則, 上原 聡, 鷺尾明子, 信岡 学, 池田久実: ヒト IgM 型抗マウス抗体(HAMA)による血清 CA-125 測定における偽陽性反応の解析, 臨床検査, **40**: 607-610, 1996.
- 2) 阿部正樹, 松浦知和, 俵木美幸, 阿部郁朗, 谷川啓司, 海渡 健: 癌免疫細胞療法実施後に CEA 偽高値を呈した患者血清の検討, 臨床病理, **59**: 763-769, 2011.
- 3) 大澤 進, 細萱茂実, 飯塚儀明, 大久保滋夫, 白井秀明, 芦原義弘, 他: 免疫化学検査の異常データの解釈と対応の仕方 Ver.1.0(2015.6.1), 日臨検査自動化会誌, **40**(Suppl.1): 3-116, 2015.

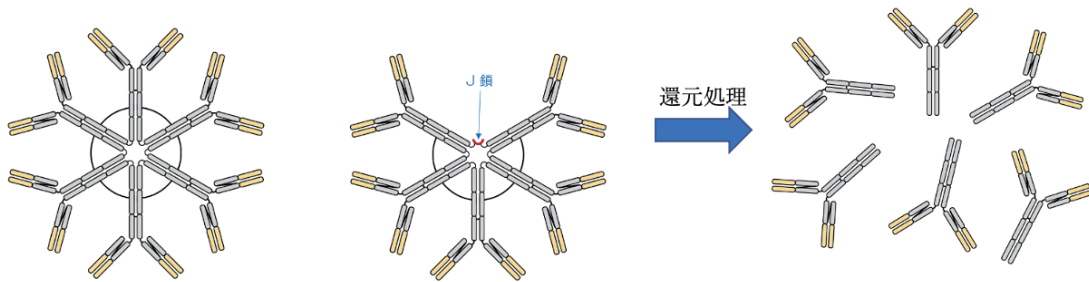
⑪ 還元処理

【目的】

ジスルフィド結合(S-S結合)を還元剤により切断することで、IgMに起因する異常反応であるかの確認を行うため。

【原理】

ジチオトレイトール(dithiothreitol: DTT)もしくは2-メルカプトエタノール(2-mercaptoethanol: 2-ME)などの還元剤を用いて、IgMの6量体もしくは5量体+J鎖を形成しているS-S結合を切断することで、IgMを単量体化し、異常反応の消失の有無を確認する。



【方法】

DTT 処理：0.005～0.01 mol/L DTT with PBS(pH 7.3～7.4)を等量の試料(血清もしくは血漿)と混和し、37℃で30～60分インキュベートを行う。

2-ME 処理：0.2 mol/L 2-ME with PBS(pH 7.3～7.4)を等量の試料(血清もしくは血漿)と混和し、37℃で15分インキュベートを行う(0.1 M 2-MEの場合は37℃、60～120分程度)。

いずれも、希釈コントロールとしてPBSのみを試料と等量混合したものも準備しておく。

【明らかになる点】

異常反応へのIgMの関与

【明らかにならない点】

- IgMの作用機序
- 異常反応物質の同定

【解釈と注意点】

- 多量体のIgMを単量体化する条件設定に注意が必要である。必要以上に還元処理を行うとμ鎖間のS-S結合や、IgGなど他の免疫グロブリンのS-S結合を切断してしまうことになる。
- 適切な条件で還元処理が行われた場合、還元処理によって異常反応が消失すれば、IgMが関与していたことが明らかとなる。異常反応が消失しなければ、他の原因を考えることとなる。

【参考文献・解析文献】

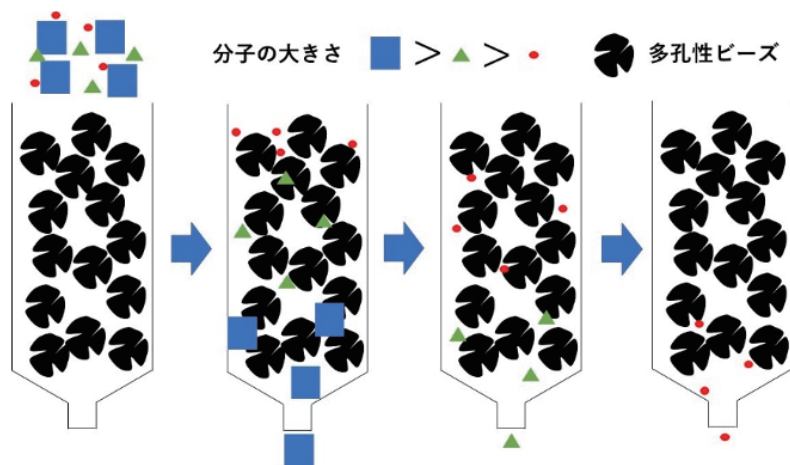
- 1) Keyt BA, Baliga R, Sinclair AM, Carroll SE, Peterson MS: Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies, Antibodies (Basel), 9: 53, 2020.

- 2) 大澤 進, 細萱茂実, 飯塚儀明, 大久保滋夫, 白井秀明, 芦原義弘, 他: 免疫化学検査の異常データの解釈と対応の仕方 Ver.1.0(2015.6.1), 日臨検自動化会誌, **40**(Suppl.1): 3-116, 2015.
- 3) 川上圭子, 塚田敏彦, 中山年正, 北村元任: Dithiothreitol 前処理による CA125 酵素免疫測定法における偽陽性の回避法, 臨床化学, **20**: 210-216, 1991.
- 4) Frank MM, Humphrey JH: Spontaneous re-aggregation of IgM subunits and restoration of antibody activity after reduction and alkylation of rabbit anti-Forssman antibody, Immunology, **17**: 237-247, 1969.
- 5) Blagg LN: Sulfhydryl treatment of serum or plasma for the reduction of IgM antibodies, Immunohematology, **34**: 135-139, 2018.

⑫ ゲル濾過分析

【目的】

蛋白質や多糖類などの分子を分子量の差で分離することで、測定項目や非特異反応物質の分子量を推定するために行う。



【原理】

サンプルを多孔性ビーズが充填されたカラムに流すと、分子量の小さな物質は孔に入り込みながら流れ、大きな物質はそのまま流れる。よって、分子量の大きな物質から順に流れ落ちるため、分子の大きさに応じて分離することができる。

【方法】

ゲル濾過分析の手順は以下の通りである（詳細な方法は各装置の添付文書を参照）。

- ①カラムの平衡化
- ②サンプルの添加
- ③サンプルの溶出
- ④分画の回収
- ⑤各分画の精査

【明らかになる点】

- 測定対象物質または非特異反応物質の分子量

【明らかにならない点】

- 非特異反応物質の同定

【解釈と注意点】

- 分子構造によって、アミノ酸配列から推定される分子量の溶出位置に分離されないことがある。
- 回収した溶出分画は、溶出液で希釈されていることに注意する必要がある。
- 溶離液、サンプル溶液量、流速などを至適化し、使用するカラムの分離能を考慮する必要がある。
- 分子量マーカーを溶出し、溶出位置を確認することが必要である。

【参考文献・解析文献】

- 1) 阿部正樹, 俵木美幸, 阿部郁朗, 海渡 健, 高木一郎: IgM型HAMAによるDUPAN-2偽高値について, 臨床病理, **60**: 1065-1069, 2012.
- 2) 八木道隆, 阿部正樹, 渡邊孝子, 鈴木晴美, 中村由佳, 高橋加奈, 他: AIA-900によるSCC抗原測定法の検討ならびに他法との反応性の比較について, 医学検査, **64**: 91-97, 2015.

⑬ ウェスタンブロット法

【目的】

蛋白質の混合物から特定の蛋白質を検出・同定する。また、患者検体から特異的な抗体を検出・同定する。

【原理】

SDS-ポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)などを用いて、電気泳動により蛋白質を分子量で分離させた後、ポリビニリデンジフロライド(PVDF)膜などのメンブランに蛋白質を転写し、特異的な抗体を用いて抗原抗体反応を行う。最終的に抗体に結合した酵素や蛍光物質を発色や化学発光させることにより特定のタンパク質を検出・同定する。

【方法】

ウェスタンブロット法の手順は以下の通りである。

- ① 試料の前処理
- ② SDS-PAGE 電気泳動
- ③ PVDF膜の前処理とゲルの平衡化
- ④ PVDF膜への転写(ブロッティング)
- ⑤ ブロッキング
- ⑥ 一次抗体との反応
- ⑦ HRP 標識二次抗体との反応
- ⑧ 酵素発色法, 化学発光法

【明らかになる点】

- 特定の蛋白質に対する確認検査
- 特定の蛋白質と抗体の反応

【明らかにならない点】

- 特定の蛋白質のバンドが認められない場合、蛋白質変異なのか抗体の非特異なのかを確認出来ない。
- 特定の蛋白質が複数バンド認められる場合、蛋白質変異なのか抗体の非特異なのかを確認出来ない。
- 患者の抗体を確認する際、特定の蛋白質にバンドが認められた場合の非特異を確認出来ない。

【解釈と注意点】

- 患者検体の蛋白質を同定する場合と患者検体の抗体を同定する場合において解釈が異なる。
- 使用する抗体について、特定の蛋白質が検出できる抗体を購入すること。
- 目的とする蛋白質の分子量に応じたアクリルアミド濃度を選択すること。
- 適切なブロッキングを行うことが必要である。

【参考文献・解析文献】

- 1) 竹縄忠臣 編：タンパク質実験ハンドブック，羊土社，東京，2003。

⑭ シアテスト(Sia euglobulin precipitation test)

【目的】

自動分析装置による血清・血漿測定において、マイナスの測定値や類まれな高値・低値例、およびエラーフラグを伴う測定値が得られた場合、病態を反映していない異常値の可能性が考えられる。このような症例に遭遇した時に、シアテストは異常反応のスクリーニング試験を目的として実施される。

【原理】

検体中の異常反応を引き起こす蛋白質は疎水性のアミノ酸に富む構造であることが多く、精製水との混合によって不溶性(難溶性)の白濁沈殿物を形成する。シアテストは、このような強い疎水性を示す蛋白質を検出することで異常反応の存在を可視化することができる。また、得られた白濁沈殿物を回収し、解析することで、異常反応の直接の原因となった蛋白質の同定に繋がる可能性がある。

【方法】

シアテストの手順は以下の通りである(特殊な試薬や器具器材は不要なため、随時実施可能)。

- ① 対象検体、精製水^{*1}、各種スピッツ・試験管、ピペット(スポイトでも代用可)を用意する。
^{*1}塩類を豊富に含む生理食塩水や緩衝液では、蛋白質を可溶化させるため使用不可。
- ② 用意したスピッツ・試験管に、精製水1 mLに対して対象検体100 μLを滴下^{*2}する。
^{*2}精製水：対象検体=10：1が目安、検体量が多いほど③の判定と④の白濁沈殿物の回収が容易。
- ③ ②の滴下の直後、目視で白濁沈殿物の形成が確認された場合はシアテスト陽性と判定する。
- ④ シアテストで得られた白濁沈殿物を回収する場合、3,000 rpm 5分の遠心後にpH 7.2のリン酸緩衝液で溶解して用いる。

【明らかになる点】

- ・シアテスト陽性の場合、通常のヒト検体中には存在しない異常な蛋白質の存在が示唆される。
- ・シアテストで得られた白濁沈殿物を回収し、解析することで、異常反応の原因となった蛋白質の同定も可能である。

【明らかにならない点】

- ・感度・特異度ともに100%ではないため、完全に異常反応を肯定・否定することはできない。
- ・簡易的な定性試験のため、異常反応の原因となる蛋白質の同定には種々の解析が必要となる。

【解釈と注意点】

- ・上記のとおり、あくまでも異常反応に対するスクリーニング試験の位置づけとして用いること。
- ・シアテストの反応が弱い検体もあるため、検体滴下時の白濁沈殿物の形成を見落とさないこと。

【参考文献・解析文献】

- 1) 藤田清貴：臨床検査値に異常を及ぼす体液成分—発見から報告の仕方まで 序論—異常反応について、生物理化学，51：223-226，2007。

⑮ 検体の不活化

【目的】

補体はC1～C9などが知られており、ヒト体内において異物からの防御機構としての抗原抗体反応を助け、オプソニン効果による貪食細胞の活性化にも寄与する。検査の目的や方法によっては、これらの補体活性を消去した上で精査する必要がある。これを目的とした操作を検体の不活化(非働化)という。また、免疫複合体の可溶化能を軽減化させる目的で利用される場合がある。

【原理】

補体の活性化は、古典経路・別経路・レクチン経路から構成される。補体成分の多くは易熱性であるため、56℃、30分の検体加温によって活性が失われる。具体的には、古典経路を構成するC1、C2と別経路を構成するFactor B、および全経路共通のC5、C8、C9に作用し補体の活性経路を遮断する。

【方法】

検体の不活化の手順は以下の通りである。

- ① 対象検体を目的の検査に必要な液量を取り、56℃ 30分加温^{*1,2}する。

^{*1} 60～63℃加温で3～5分に短縮する方法も報告されている。

^{*2} 5 mmol/L(終濃度)となるようDTTを添加(37℃・30分加温)する方法や50 mmol/L(終濃度)となるEDTAを添加する方法もある。

- ② 検体の不活化を行った検体を翌日以降用いるときは、56℃ 10分加温して用いる場合がある。

【明らかになる点】

- 検体中の補体活性が検査結果に影響を与えているか否かの確認が可能となる。影響を与えていた場合、検体の不活化によって正しい検査結果が得られる。
- 意図せずに検体中のBence Jones 蛋白(BJP)やパイログロブリンの検出の端緒となり得る。

【明らかにならない点】

- 補体の活性に異常がある場合、具体的にどの成分が原因なのかの特定は困難である。

【解釈と注意点】

- 検体加温を伴うため、酵素活性やプロテオーム解析のための二次試料としては使用しないこと。
- 低温下で補体の活性化が起こる検体があり、疑われる場合は37℃保存した検体を用いること。

【参考文献・解析文献】

- 1) 馬越由伸：生体内における補体による免疫複合体の可溶化に関する研究，岡山医学会誌，**102**：1051-1060，1990。
- 2) 加藤亮二，利光 央 編著：免疫検査に必要な基礎技術—不活化(非働化)，日本臨床検査学教育協議会 監，臨床検査学実習書シリーズ 免疫検査学 実習書，医歯薬出版，東京，2010。
- 3) 万木紀美子，小島裕人，平位秀世，菱田理恵，藤井直樹，大久保和俊，他：HLA抗体検査における血清非働化の必要性について—血清の非働化によりHLA抗体強陽性を判定しえた2症例の経験から，日輪細治会誌，**59**：462-469，2013。

⑩ ノイラミニダーゼ処理

【目的】

- A. シアル化された糖鎖抗原における非特異反応を確認するため.
- B. 電気泳動法によるアルカリホスファターゼ(ALP)アイソザイムの分析において, 易動度が近似している肝型ALPと骨型ALPを鑑別するため.

【原理】

ノイラミニダーゼ(Neuraminidase)は, ノイラミン酸の糖鎖末端のシアル酸を切断する酵素(グリコシド結合を切断するグリコシダーゼ)であり, シアリダーゼ(Sialidase)とも呼ばれる.

- A. 非特異反応によるものであれば処理後も測定値は変わらないが, 真値であれば脱シアル化により測定値は低下する.
- B. ALPにはシアル酸を含む糖鎖が結合しており, これが電気泳動における易動度に影響を及ぼす. ノイラミニダーゼがALPアイソザイムのうち骨型の陰性に荷電したシアル酸残基を肝型より速く切断することを利用して骨型の電気泳動度を低下させ, 肝型との分離を強調する.

電気泳動法では, 小腸由来のALP以外は陰極側に泳動される. 移動度の変化は, 骨型・肝型ALPで大きく, 胎児型ALPと高分子ALP, 肝癌ALPでは小さく, シアル酸を含まない小腸ALPでは変化がない.

【方法】

ノイラミニダーゼ前処理の手順は以下の通りである(詳細は文献を参照).

- A. 非特異反応
 - ① 100 mU/mLに調整したノイラミニダーゼ溶液と血清を等量混和する.
対照は0.1 mol/L酢酸-酢酸Na緩衝液(pH 5.5)と血清を等量混合
 - ② 密栓して37℃一晩加温後測定
- B. ALPアイソザイム
 - ① 試料にセパレータ(*Vibro cholerae*菌由来:ヘレナ)を混合する.
 - ② 室温にて一定時間放置後電気泳動法で分析

【明らかになる点】

- A. 非特異反応の可能性の有無
- B. 肝性ALP, 骨性ALPおよび小腸ALPの判別.

【明らかにならない点】

- A. 非特異反応の同定
- B. 癌の産生する肝型ALPは骨型ALPに似てくる.

【解釈と注意点】

- 試料, 使用装置および電気泳動法に用いる支持体により, ノイラミニダーゼの種類や前処理条件を決定する.
- ノイラミニダーゼ処理した臓器非特異型ALP分子は, 本来の2量体4量体を形成しやすい.

【参考文献・解析文献】

- 1) 大澤 進, 細萱茂実, 飯塚儀明, 大久保滋夫, 白井秀明, 芦原義弘, 他: 免疫化学検査の異常データの解釈と対応の仕方 Ver.1.0(2015.6.1), 日臨検自動化会誌, **40**(Suppl.1): 3-116, 2015.
- 2) 飯野四郎, 他: アルカリフォスファターゼは真のアイソザイムか, 生物理化学 **25**: 232, 1981.
- 3) Moss DW, Edwards RK: Improved electrophoretic resolution of bone and liver alkaline phosphatases resulting from partial digestion with neuraminidase, Clin Chim Acta, **143**: 177-182, 1984.
- 4) 星野 忠, 篠崎隆次, 橋本寿美子, 熊坂一成, 河野均也: Neuraminidaseを用いた血清アルカリホスファターゼアイソザイムの簡易分別定量法の検討, 生物理化学, **33**: 125-128, 1989.
- 5) 菰田二一, 他: 1. ALP. 最新 電気泳動実験法, 日本電気泳動学会 編, 医歯薬出版, 東京, pp.275-280, 1999.

臨床化学

第54巻 補冊1号(2025)

2025年7月31日発行

●予約年間購読料：10,000円(補冊を含む・消費税込)

●編集・発行：〒104-0033 東京都中央区新川一丁目28番23号 東京ダイヤビルディング5号館9階

(株)エム・シー・アイ内

一般社団法人日本臨床化学会 事務局

TEL：03-6367-6225 FAX：03-6367-6235

E-mail：jssc@mc-i.co.jp

ホームページ：https://www.jssc-jp.gr.jp

●制作：(株)エム・シー・アイ

Copyright© 2025 by Japan Society of Clinical Chemistry

Japan Society of Clinical Chemistry

c/o MCI Co., Ltd.

9F, Tokyo Dia Building No. 5, 1-28-23, Shinkawa, Chuo-ku, Tokyo, 104-0033, JAPAN

TEL: 03-6367-6225 FAX: 03-6367-6235

○入退会・会費のことなど学会活動に関するお問い合わせ、ならびに本誌に関するお問い合わせは、
一般社団法人日本臨床化学会 事務局にご連絡ください。