

プレセプシンキット HISCL™ プレセプシン試薬の性能評価

三好 雅士*¹, 西岡 麻衣*¹, 上田 舞*¹, 池亀 彰茂*², 中尾 隆之*¹

*1 徳島大学病院 医療技術部 臨床検査技術部門：徳島県徳島市蔵本町2丁目50-1 (〒770-8503)

*2 香川県立保健医療大学 保健医療学部 臨床検査学科

敗血症は、感染症に対する制御不能な生体反応に起因する様々な臓器機能不全を生じる病態である。重症化前の早期診断・早期治療が重要であることから、様々なバイオマーカーが開発され、用いられている。

プレセプシン（以下、P-SEP）は感染初期から上昇するもので、重症度を正確に反映する臨床的指標として有用性が報告されている。本研究では化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）を測定原理とする新規 P-SEP 測定試薬であるプレセプシンキット HISCL™ プレセプシン試薬（シスメックス株式会社：以下、HISCL プレセプシン試薬）について基礎的性能評価を行った。さらに、血漿分離を含めた測定前段階における変動要因についても検討した。

再現性を評価した結果、併行精度 CV (%) : 3.9 ~ 4.2 %, 中間精度 CV (%) : 2.6 ~ 3.8 % と良好であった。最小検出感度 : 3.48 pg/mL, 希釈直線性 : 30,000 pg/mL まで認められた。また、回帰式 : $y = 1.1x - 44.2$, 相関係数 : $r = 0.98$ と対照試薬との良好な相関が得られ、極端な乖離検体も認められなかった。

1,500 g/2,000 g (5分 / 10分) の各遠心条件にて比較した結果、有意な測定値差はなかった。また、凍結融解を5回繰り返した場合においても、一定の変動傾向はなく、血漿分離や凍結融解による変動は認められなかった。

HISCL プレセプシン試薬は良好な性能を有しており、敗血症の高精度な診断補助に貢献できるものと考えられた。

キーワード

プレセプシン (P-SEP), HISCL プレセプシン試薬, 化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA), 遠心分離

はじめに

敗血症は、感染症に対する制御不能な生体反応に起因する様々な臓器機能不全を生じる病態である^{1,2)}。世界では年間約3,000万人が罹患し、そのうち600~800万人が死亡しているとされており、特に循環不全や細胞代謝異常が持続する敗血症性ショックでの死亡率は高い。

重症化前の早期診断・早期治療が重要とされる一方で、原因となる感染症の確認および起炎菌同定に必要な細菌培養検査は、結果報告までに最短でも数時間を要し迅速性に欠ける。そのため、C反応性蛋白 (CRP)、インターロイキン-6 (IL-6)、プロカル

シトニン (以下、PCT) など、様々なバイオマーカーが開発・評価されてきた^{3~5)}。しかし、その中で最も有用性が高いとされてきた PCT でさえ、炎症時の上昇や、臨床経過を反映しにくいなどの問題があり⁶⁾、感度・特異度に優れ、臨床的有用性の高い新規マーカーの開発が希求されてきた。

これらの従来指標に比し、プレセプシン (以下、P-SEP) は外傷など他因子の影響を受けにくく、細菌性敗血症患者において早期から特異的に上昇し、重症度をより高精度で反映することが報告されており、細菌性敗血症の早期診断や予後判定に寄与する臨床指標

として注目されている^{7,8)}。またこれまでの測定においては、試薬カートリッジ方式を用いた小型分析装置が普及していたが⁹⁾、近年、より簡便で迅速な全自動免疫測定装置に搭載可能な試薬が開発されている¹⁰⁾。

本研究では、化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) を測定原理とする新規バイオマーカーであるプレセプシンキット HISCL™ プレセプシン試薬 (シスメックス株式会社: 以下, HISCL プレセプシン試薬, シスメックス) について、「定量測定法に関するバリデーション指針」¹¹⁾ に基づいて基礎的性能評価を行った。また、P-SEP は攪拌や衝撃など測定前段階での偽高値が報告されていることから^{12~14)}、血漿分離や凍結保存による変動についても検討を行った。

実験材料および方法

1. 対象

検討には、当院検査部に提出された 48 例の患者残余検体、健常者検体および精度管理用試料 HISCL™ プレセプシンコントロール (シスメックス) を使用した。なお本研究は、徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会の承認後 (承認番号 1919・承認番号 3335)、匿名化し実施した。さらに健常者検体は全例についてインフォームドコンセントを実施し、同意書の取得を行った。

2. 測定機器および試薬

P-SEP の測定は EDTA 血漿を試料とし、全自動免疫測定装置 HISCL™-5000 (シスメックス) および HISCL プレセプシン試薬を用いて行った。また、比較対照として免疫発光測定装置による測定を実施した。

3. 検討内容

1) 併行精度

2 濃度の精度管理用試料を連続 20 回測定し、併行精度を確認した。

2) 中間精度

初回測定時のみキャリブレーションを実施、その後はキャリブレーションを実施せず 2 濃度の精度管理用試料を 20 日間 (n=2) 測定し、中間精度を確認した。

3) 希釈直線性

高濃度試料を専用希釈液にて 10 段階に希釈、各 2 重測定し、希釈直線性を確認した。

4) 最小検出感度

低濃度試料を 7 段階に希釈、各試料について 10 重測定を実施し、 $\pm 2.6SD$ 法にて検出限界を確認した。

5) 相関

患者残余検体 48 例および健常者検体 10 例について、比較対照試薬 (全血) との相関を確認した。

6) 遠心条件

健常者検体 5 例について、1,500 g/2,000 g (5 分/10 分) の各遠心条件にて測定値を比較した。

7) 凍結融解の影響

合計 10 例の患者残余検体および健常者検体を用い、凍結融解を 5 回まで繰り返し測定値の変動を確認した。

結果

1) 併行精度

2 濃度の精度管理用試料を連続 20 回測定し、併行精度を確認した結果、次のとおりであった (表 1-A)。

Control Level 1

平均値: 292.6 pg/mL, CV (%): 4.2 %

Control Level 2

平均値: 1,011.3 pg/mL, CV (%): 3.9 %

2) 中間精度

2 濃度の精度管理用試料を 20 日間 (n=2) 測定し、中間精度を確認した結果、次のとおりであった (表 1-B)。

Control Level 1

平均値: 298.8 pg/mL, CV (%): 3.8 %

Control Level 2

平均値: 1,007.3 pg/mL, CV (%): 2.6 %

3) 希釈直線性

高濃度試料を専用希釈液にて 10 段階に希釈し、希釈直線性を確認した結果、30,000 pg/mL までの直線性が認められた。さらに実測カウント値 (発光強度) による評価では、30,000 pg/mL を超える直線性を認めた (図 1)。

表 1. 再現性

A. 併行精度 (n=2)		
	Control Level 1	Control Level 2
平均値 (pg/mL)	292.6	1,011.3
標準偏差 (pg/mL)	12.39	39.53
CV (%)	4.2	3.9
B. 中間精度 (20 日間 /n=2)		
	Control Level 1	Control Level 2
平均値 (pg/mL)	298.8	1,007.3
標準偏差 (pg/mL)	11.24	26.58
CV (%)	3.8	2.6

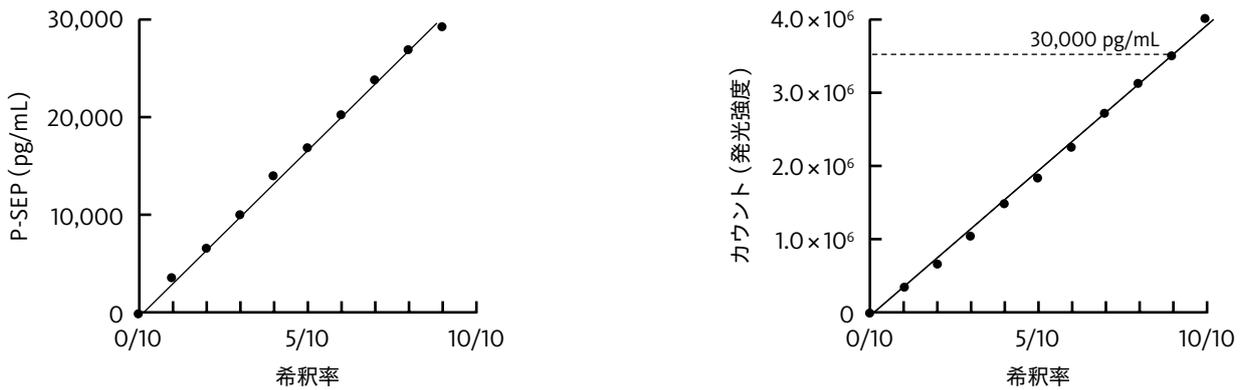


図 1. 希釈直線性

4) 最小検出感度

低濃度試料を 7 段階に希釈し、 ± 2.6 SD 法にて検出限界をみた結果、検出限界は 3.48 pg/mL であった (図 2)。

5) 相関

患者残余検体 48 例および健常者検体 10 例の計 58 例について、比較対照試薬との相関を確認した結果、回帰式： $y = 1.1x - 44.2$ 、相関係数： $r = 0.98$ となり良好な相関が得られた (図 3)。また、

極端な乖離検体も認められなかった。

6) 遠心条件

1,500 g/2,000 g (5 分 / 10 分) の各遠心条件にて比較した結果、有意な測定値の差は認められなかった (表 2)。

7) 凍結融解の影響

凍結融解を 5 回まで繰り返し測定値の変動を確認した結果、一定の変動傾向は認められなかった (図 4)。

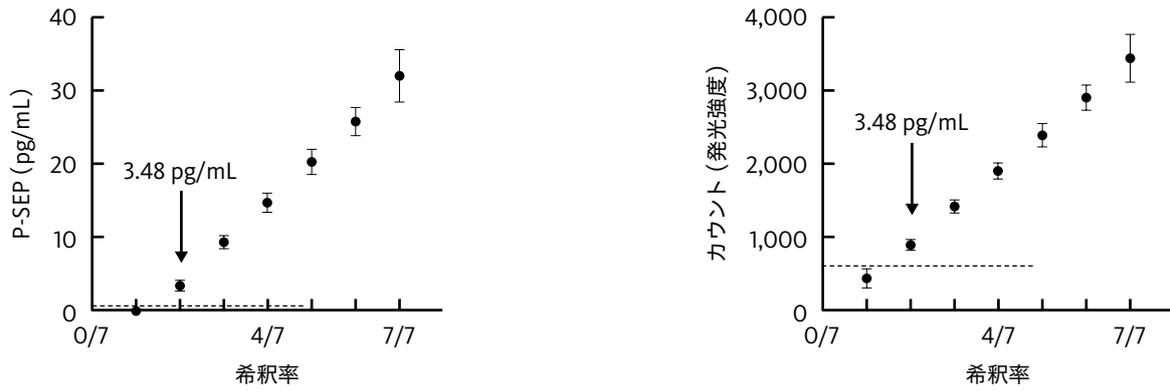


図2. 最小検出感度

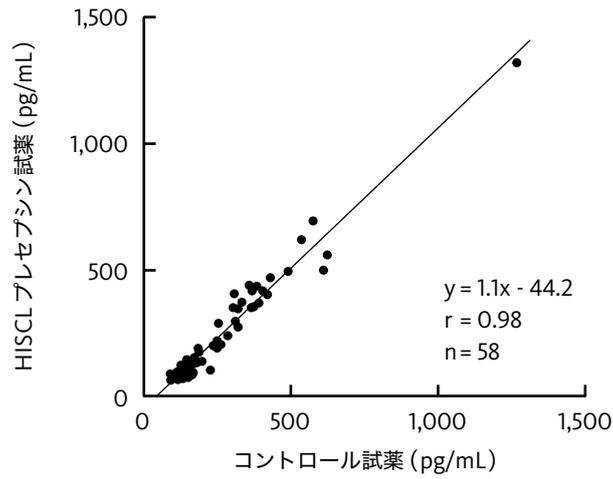


図3. 相関

表2. 遠心条件

	(pg/mL)			
	1,500 g (5分)	1,500 g (10分)	2,000 g (5分)	2,000 g (10分)
1	89.3	95.8	81.1	79.9
2	101.0	95.5	111.0	115.1
3	99.4	108.4	129.7	99.5
4	86.4	136.3	109.2	95.1
5	147.3	140.8	135.9	109.5

p-value (vs 1,500 g/5分)

* Paired T test

p=0.358

p=0.350

p=0.623

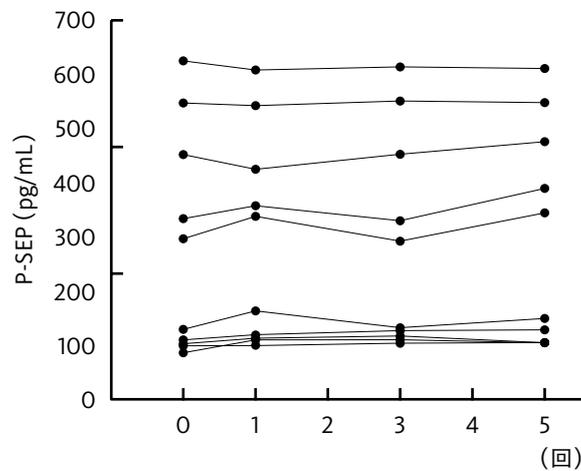


図4. 凍結融解の影響

考 察

HISCL プレセプション試薬について性能評価を行った結果、本試薬は良好な基礎的性能を有しており、日常検査において有用であると考えられた。

併行精度、中間精度は5%以下であり、良好な再現性が得られた。希釈直線性の検討においては30,000 pg/mLまでの直線性が確認でき、実測カウント値（発光強度）による評価ではそれ以上の直線性を示唆する結果が得られた。また、最小検出感度は3.48 pg/mLであり、必要十分な測定範囲を有していると考えられた。従来試薬である免疫発光測定装置では、約20～20,000 pg/mLの測定範囲を有することが示されている⁹⁾。これを超える高濃度検体に遭遇する可能性は低いと考えられるが、本試薬は従来試薬よりも広い測定範囲を有し、超高濃度の検体であっても希釈することなく測定が可能と考えられた。

従来試薬との相関は良好であり、大きく乖離する検体も認められなかった。ただし抗原抗体反応を原理とするため、試薬組成や抗体認識部位による反応性差に起因する測定値の乖離が生じる可能性は否定できない。さらにはHAMA（Human Anti-Mouse Antibody）に代表される異好性抗体や自己抗体による影響も不可避である。B/F分離を行う本測定法にお

ける非特異反応の発生頻度は比較的少ないと考えられるが、臨床症状との不一致や乖離が認められた際には、吸収試験などの精査が必要であると考えられる。

遠心強度や遠心時間など血漿分離条件の違いによる測定値差は認められず、凍結融解を繰り返した際にも一定の変動傾向を生じなかった。全血測定が可能である免疫発光測定装置とは異なり、遠心分離を必要とするものの前処理段階における変動は小さく、施設任意条件下での処理が可能と考えられた。

本試薬は全自動免疫測定装置 HISCL™ シリーズ（HISCL™-5000/800 など：シスメックス）に搭載可能であり、測定操作の簡略化、効率化、測定範囲の向上、多検体高速処理など多数の利点を有する。診断までの迅速性では、ベッドサイドで検体採取から測定・報告までが完了する免疫発光測定装置に劣るものの、簡便性や効率性の面では優位であり、特に HISCL シリーズを使用している施設においては、新規装置を購入する必要がないため導入に際する課題も少なく、高い費用対効果が期待される。中央検査室での測定となるため、採血・搬送条件などの運用に関する注意点はあるものの、院内導入による臨床貢献度は高いと考えられた。

結 論

HISCL プレセプシン試薬は良好な性能を有しており、敗血症の高精度な診断補助に貢献できるものと考えられた。また、P-SEP は採血時の攪拌や搬送時の衝撃により偽高値を呈することが報告されているが、本研究の検討条件においては、血漿分離や凍結保存による測定値への影響は認められなかった。

全自動免疫測定装置 HISCL™-5000：医療機器製造販売届出番号 28B1X10014000011

全自動免疫測定装置 HISCL™-800：医療機器製造販売届出番号 28B1X10014000012

プレセプシンキット HISCL™ プレセプシン試薬：体外診断用医薬品製造販売承認番号：22900EZX00062000

参考文献

- 1) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992; **101**(6): 1644–1655.
- 2) Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003; **29**(4): 530–538.
- 3) 金子 守, 岡村佳和. 新規敗血症マーカーとしての「プレセプシン」. *生物試料分析*. 2014; **37**(5): 311–320.
- 4) Castelli GP, Pognani C, Meisner M, et al. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Crit Care*. 2004; **8**(4): R234–242.
- 5) Assicot M, Gendrel D, Carsin H, et al. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*. 1993; **341**(8844): 515–518.
- 6) Dupuy AM, Philippart F, Péan Y, et al. Role of biomarkers in the management of antibiotic therapy: an expert panel review: I—currently available biomarkers for clinical use in acute infections. *Ann Intensive Care*. 2013; **3**(1): 22.
- 7) Yaegashi Y, Shirakawa K, Sato N, et al. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *J Infect Chemother*. 2005; **11**(5): 234–238.
- 8) Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of septic in a multicenter prospective study. *J Infect Chemother*. 2012; **18**(6): 891–897.
- 9) 依田尚文, 白川嘉門, 川村雅英. CLEIA 法による敗血症マーカー「プレセプシン」の迅速測定法の開発. *臨床化学*. 2019; **48**(3): 260–268.
- 10) 軍場麻紀, 出口松夫, 鍵田正智, 他. 化学発光酵素免疫測定法を原理とする「ステイシア CLEIA Presepsin」の性能評価. *日本臨床検査自動化学会会誌*. 2019; **44**(1): 68–72.
- 11) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会. 定量測定法に関するバリデーション指針. *臨床化学*. 2011; **40**: 149–157.
- 12) Nagata T, Yasuda Y, Ando M, et al. Clinical impact of kidney function on presepsin levels. *PLoS One*. 2015; **10**(6): e0129159.
- 13) 今川朱美, 魚住恵理子, 潮田友紀, 他. プレセプシン値に及ぼす腎機能障害の影響. *医学検査*. 2015; **64**(2): 169–172.
- 14) Miyoshi M, Inoue Y, Nishioka M, et al. Clinical evaluation of presepsin considering renal function. *PLoS One*. 2019; **14**(9): e0215791.

Performance Evaluation of "HISCL™ Presepsin Assay Kit"

Masashi MIYOSHI*¹, Mai NISHIOKA*¹, Mai UETA*¹, Akishige IKEGAME*² and Takayuki NAKAO*¹

*¹ Department of Medical Technology, Tokushima University Hospital, 2-50-1, Kuramoto-cho, Tokushima-shi, Tokushima, 770-8503, Japan

*² Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural University of Health Sciences

Sepsis is a life-threatening condition that involves uncontrolled biological responses to infections, resulting in organ dysfunctions. Early diagnosis and treatment of sepsis are important to control disease severity. Indicators with high sensitivity and specificity and thus having extensive clinical utility have been developed for this purpose. In this context, presepsin levels are high specifically in the early stages of sepsis and accurately reflect disease severity, aiding in early diagnosis and prognosis.

In this study, we evaluated the basic performance of "HISCL™ Presepsin Assay Kit (Sysmex Corporation)" using a fully automated immunoassay system, and also identified the factors that changed during the pre-measurement stage, including plasma separation.

The coefficients of variation (CV) for within-run and between-day precision analyses were 3.9–4.2 % and 2.6–3.8 %, respectively. The HISCL Presepsin Assay Kit detection limit was 3.48 pg/mL, and linearity was achieved up to 30,000 pg/mL.

HISCL Presepsin Assay Kit showed strong correlation with a control reagent (regression equation (y) = 1.1x-44.2, correlation coefficient (r) = 0.98) and no divergent samples were observed.

No significant difference was observed between values measured for centrifugation under 1,500 g or 2,000 g, for 5 min or 10 min. Furthermore, repeated freeze-thaw cycles (up to 5 times) did not result in fluctuation in the measured values.

Additionally, plasma separation and cryopreservation had no effect on the measured values. Thus, HISCL Presepsin Assay Kit demonstrated good performance and may be a potential early and accurate diagnostic tool for sepsis.

Key Words Presepsin (P-SEP), HISCL Presepsin Assay Kit, CLEIA, Centrifugation
