平成18年度　第2回　精度管理講演会

免疫学的測定法の現状と問題点

免疫学的測定における問題点

慶應義塾大学病院中央臨床検査部
石橋みどり

Outline

- 免疫学的測定法の歴史と特徴
- 免疫学的測定に干渉する要因
- 干渉要因の解析
- 免疫学的測定におけるデータ管理
- 免疫学的測定における問題点

免疫学的測定の歴史

1956　Singer ら；ラテックス粒子によるリウマチ因子検査

1960　Berson, Yalowら；ラジオイムノアッセイの開発

‥抗原抗体反応を定量的に測定

1971　Engvallら；エンザイムイムノアッセイの開発

1975　Köller, Milstein；モノクローナル抗体産生の方法論確立

1970~1980　ホモジニアス法(TIA, NIA)の自動化

1980後半~1990前半　Mabを用いたキットの普及
➡ 異常値（非特異反応）報告相次ぐ

1990代　non-RIA化 ➡ 化学発光免疫測定法
生物化学発光免疫測定法

免疫学的測定の特徴(1)

長所　高い特異性 ➡ 直接測定が可能

高感度測定の可能性高まる

短所　地帯現象・hook effect ➡ 抗原 / 抗体最適比

交差反応と共有反応

近似免疫原構造

同一のエピトープを有した異なる抗原(抗体)分子

生物学的製剤試薬であることの限界

純度、結合能

製造ロットによる反応性の相違

免疫学的測定の特徴(2)

1. 測定濃度範囲が広い
2. 反応が化学量論的でない
   （検量線が直線的でない場合が多い）
3. 単一な標準物質が得難い
4. 測定のステップが比較的多い
5. 成分濃度が低い　→　高感度が要求される
6. 試薬のロット間差が相対的に大きい

免疫学的測定の原理・方法

ホモジニアス法　　TIA, NIA, LPIA, LOCI, etc.

B / F分離を行わず、反応相内での抗原・抗体複合物を直接測定する。

➡ 生体成分の影響を受け易い

ヘテロジニアス法　　RIA, EIA, CLIA, CLEIA, ECLIA etc.

固相担体；ウェル、チューブ、ビーズ、磁性粒子、
マイクロ　パーティクル etc.

標識物；RI、酵素、etc.

検出；吸光度法、蛍光法、化学発光法、生物発光法etc.

LOCI法の原理

Luminescent
Oxygen
Channeling
Immunoassay

特徴

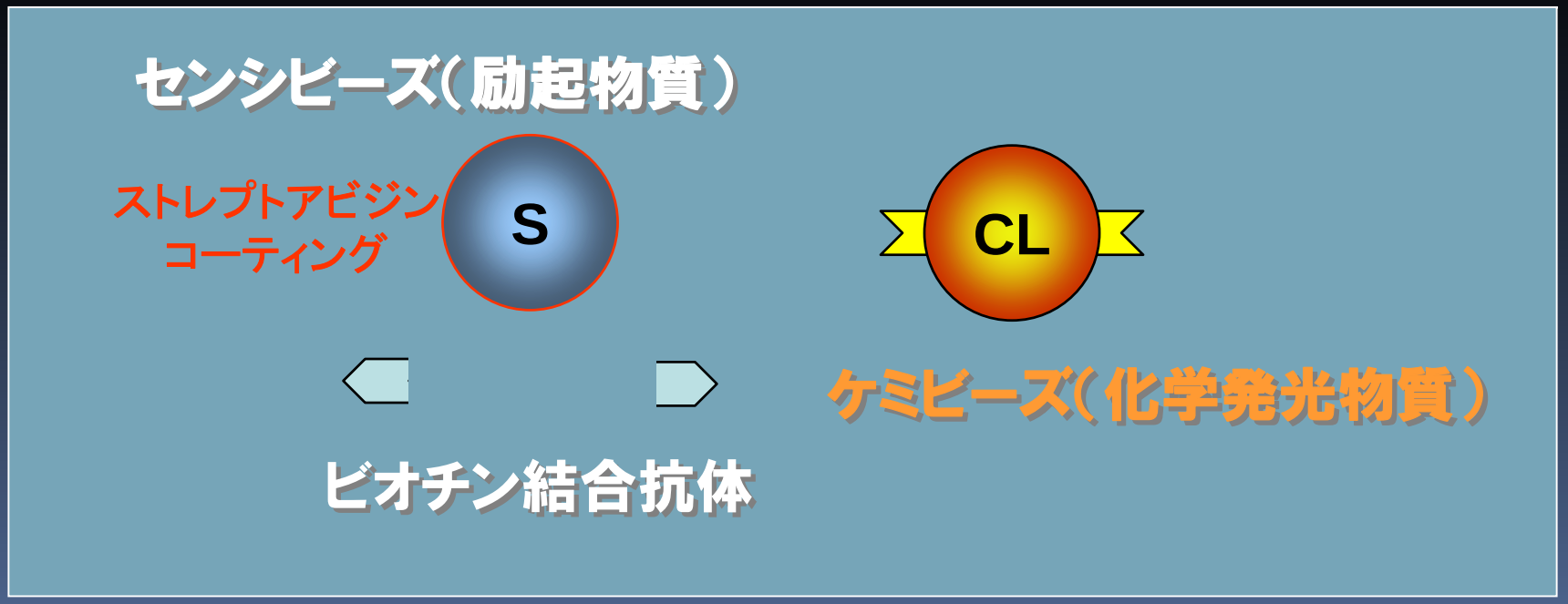
検体量の微量化

短い反応時間

高感度

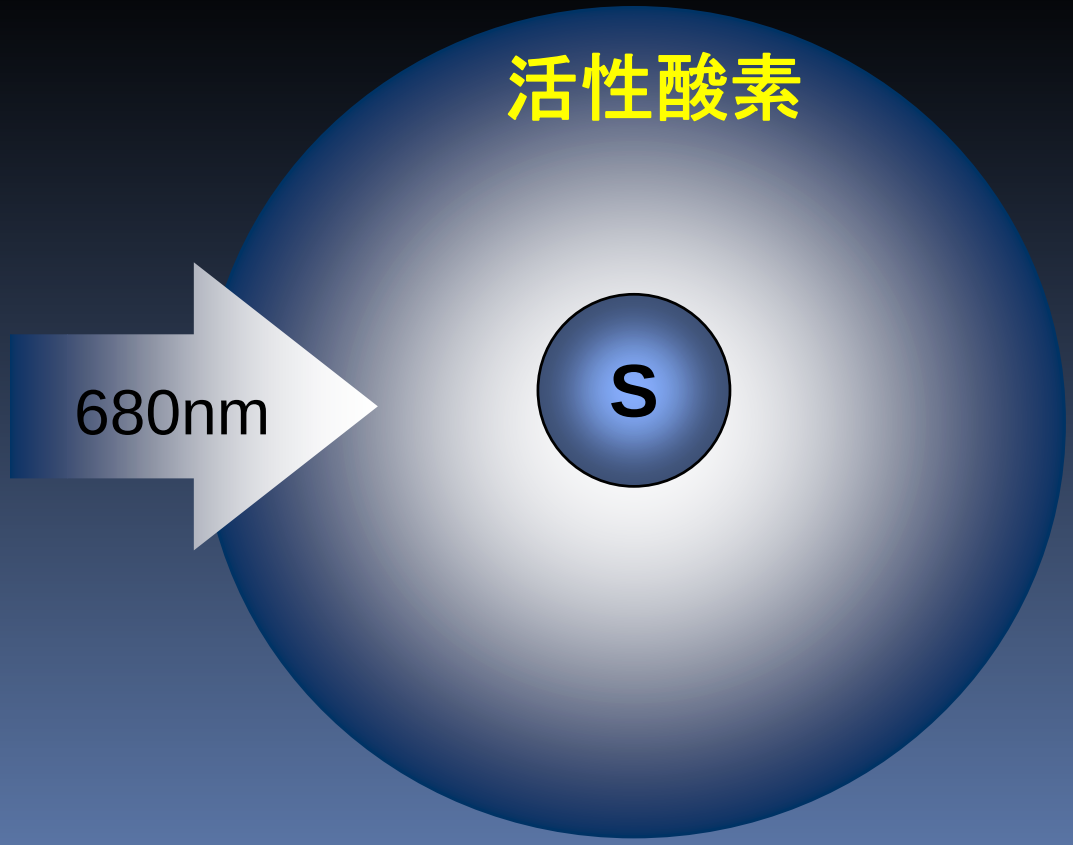
LOCI法の原理

Luminescent **O**xygen **C**hanneling **I**mmunoassay



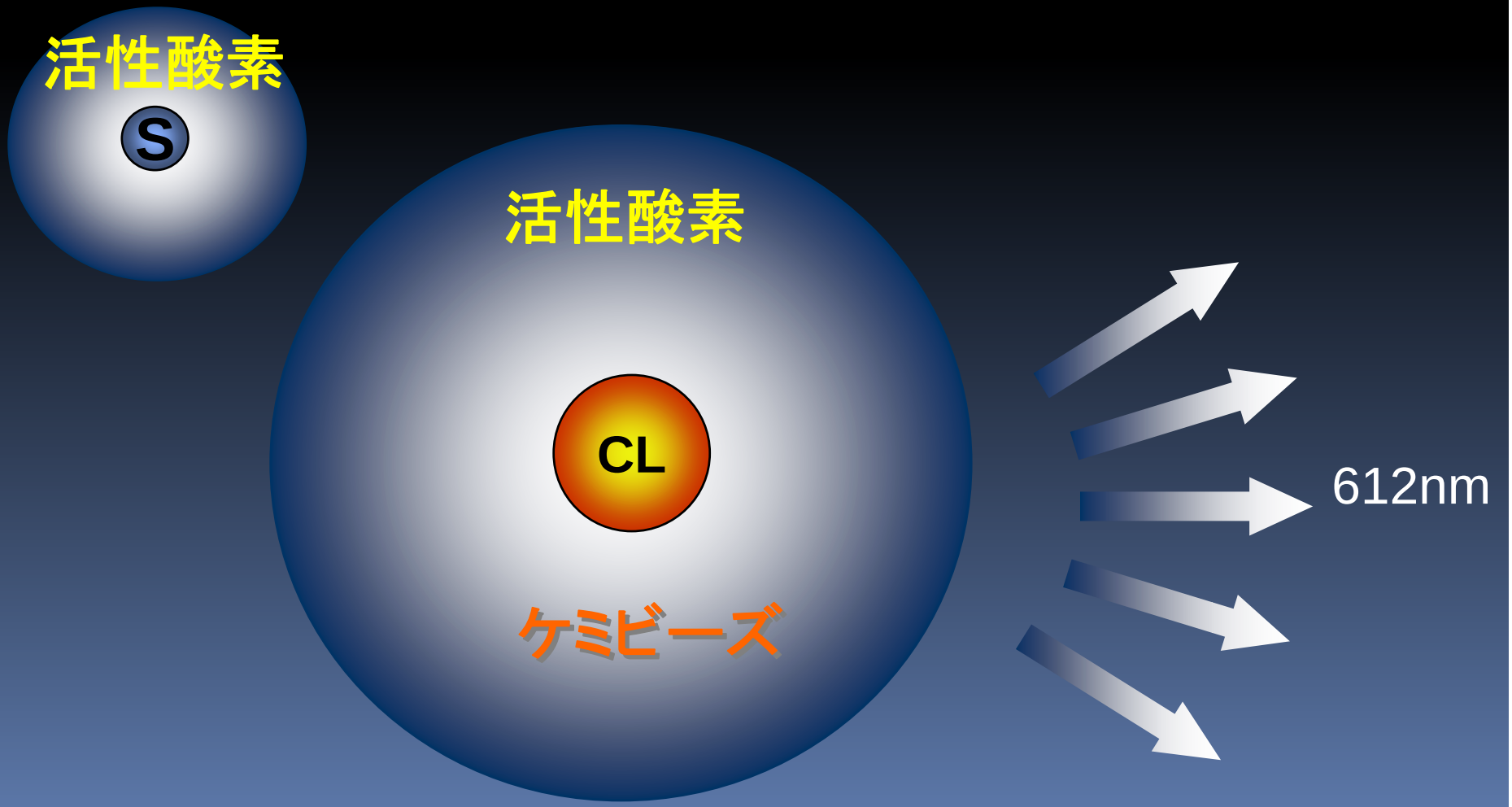
LOCI法の原理

Luminescent **O**xygen **C**hanneling **I**mmunoassay



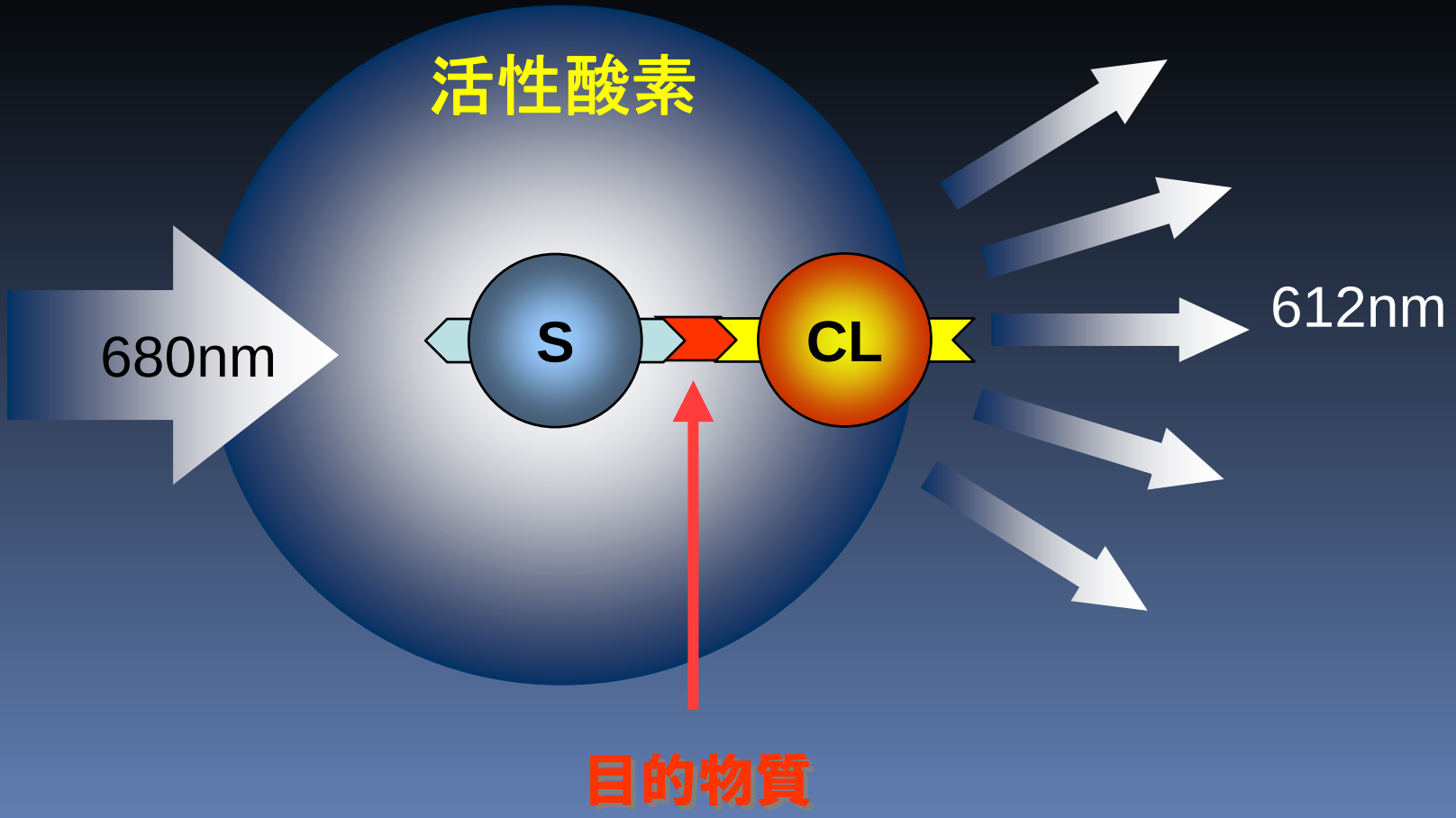
LOCI法の原理

Luminescent **O**xygen **C**hanneling **I**mmunoassay



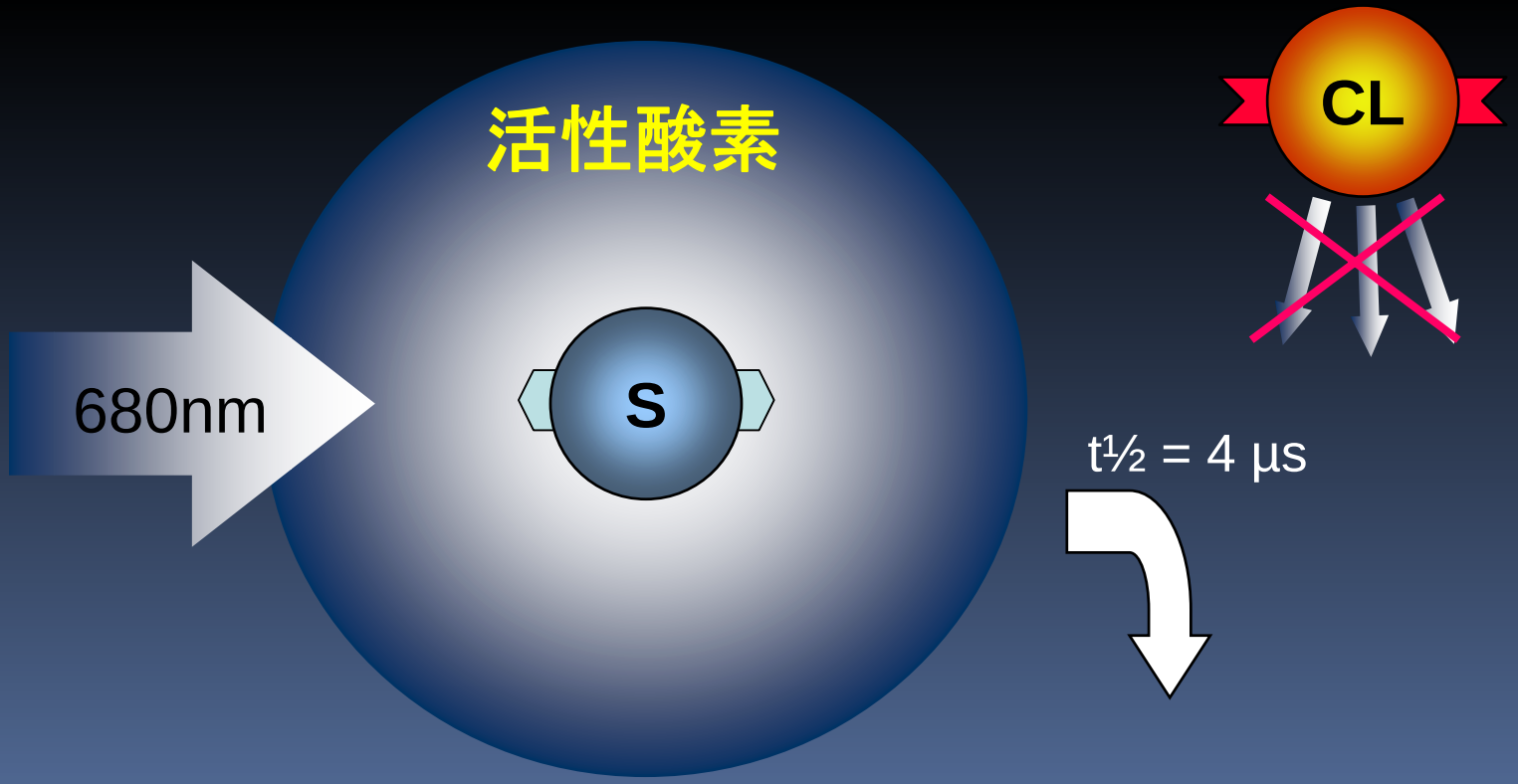
LOCI法の原理

Luminescent **O**xygen **C**hanneling **I**mmunoassay

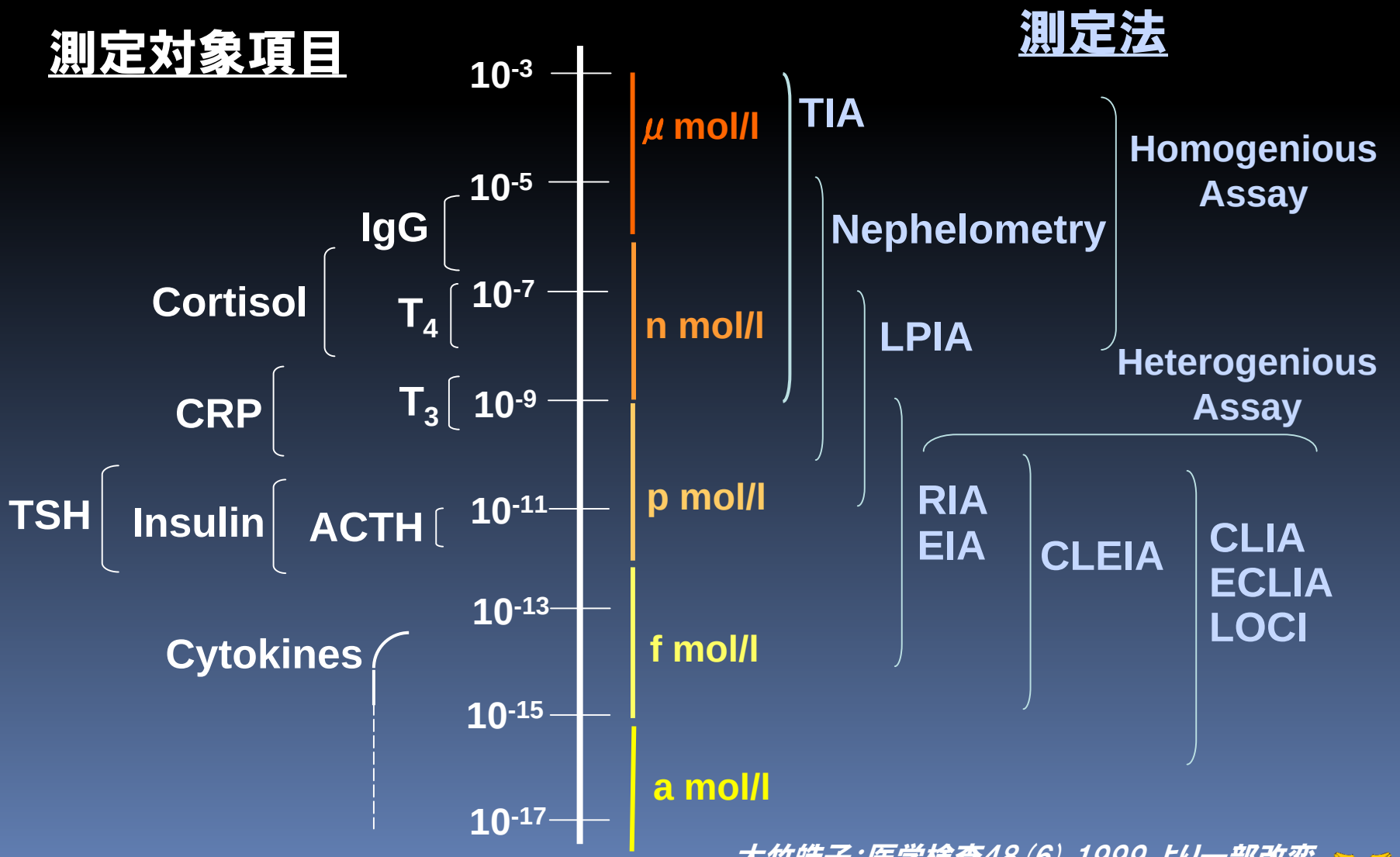


LOCI法の原理

Luminescent **O**xygen **C**hanneling **I**mmunoassay



免疫血清検査項目濃度と測定法の関係



大竹皓子:医学検査48(6),1999.より一部改変

免疫学的測定に干渉する要因

Ⅰ．**特異性**に関する問題点

対象物質の多様性・免疫類似物質
抗原の多様性（分子量、糖鎖、存在形態）
抗体の多様性（免疫グロブリンクラス、Avidity、抗原に対する特異性

Ⅱ．**標準物質**に関する問題

由来動物種、由来臓器
リコンビナント
溶媒のマトリクス

Ⅲ．**非特異反応**

異好性抗体（HAMA,抗BSA抗体, etc.）
生体成分 （RF, クリオグロブリン, M蛋白, 乳びetc.）
不明な反応 （IgM etc）

Ⅳ．**試薬構成成分**

界面活性剤, ブロッキング剤etc.

Ⅴ．**その他**

抗凝固剤, 分離剤etc.

免疫学的測定に干渉する要因

Ⅰ.特異性に関する問題点

対象物質の多様性・免疫類似物質

抗原の多様性(分子量、糖鎖、存在形態)

抗体の多様性(免疫グロブリンクラス、Avidity、抗原に対する特異性)

Ⅱ.標準物質に関する問題

由来動物種、由来臓器

リコンビナント

溶媒のマトリクス

Ⅲ.非特異反応

異好性抗体(HAMA,抗BSA抗体etc.)

生体成分 (RF, クリオグロブリン, M蛋白, 乳びetc.)

不明な反応 (IgM etc)

Ⅳ. 試薬構成成分

界面活性剤, ブロッキング剤etc.

Ⅴ.その他

抗凝固剤, 分離剤etc.

特異性に関する問題点（抗原系）

免疫類似物質

HCG	LH,FSH
ジゴキシン	DLIF（ジゴキシン様物質）
C-ペプチド	プロインスリン

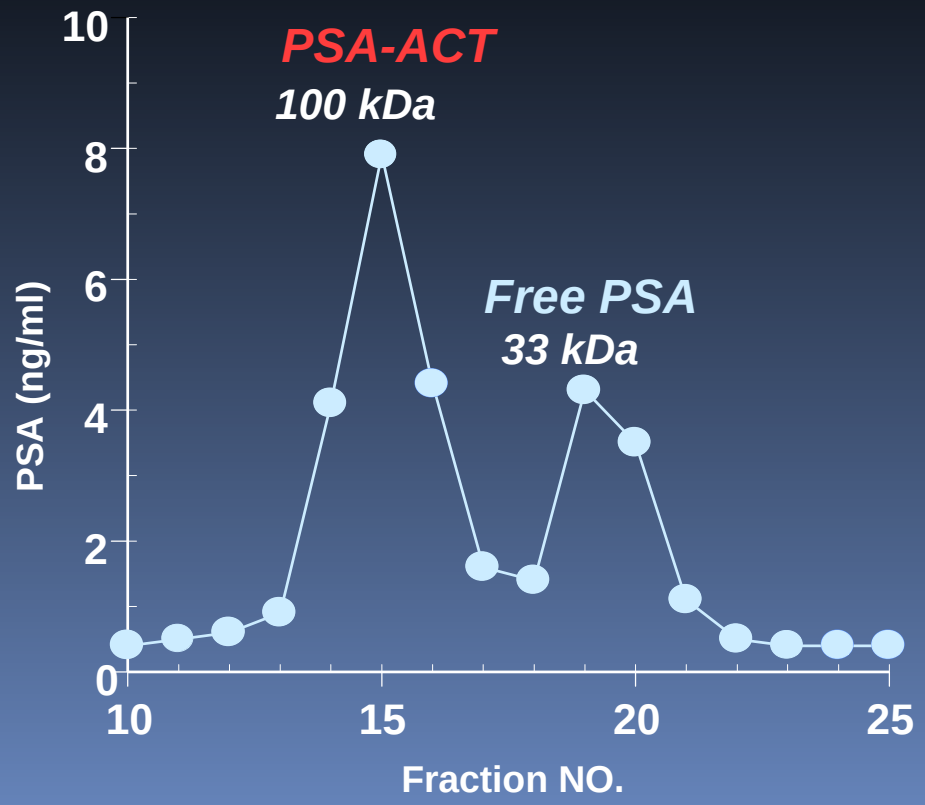
抗原の多様性（分子量、糖鎖、存在形態）

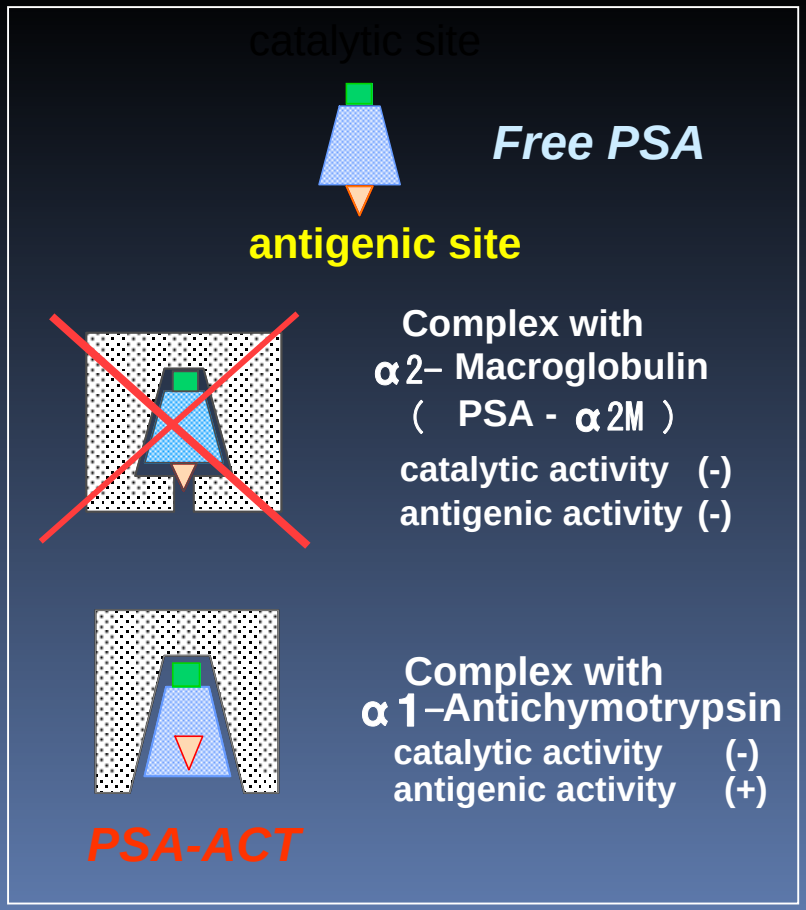
分子量が不均一	D-Dimer, ヒアルロン酸, Ⅳ型コラーゲン
糖鎖	CA19-9
存在形態	PSA (Free PSA : PSA-ACT)
	Hormon

特異性に関する問題点（その1）

PSA

存在形態の多様性





特異性に関する問題点（その1）

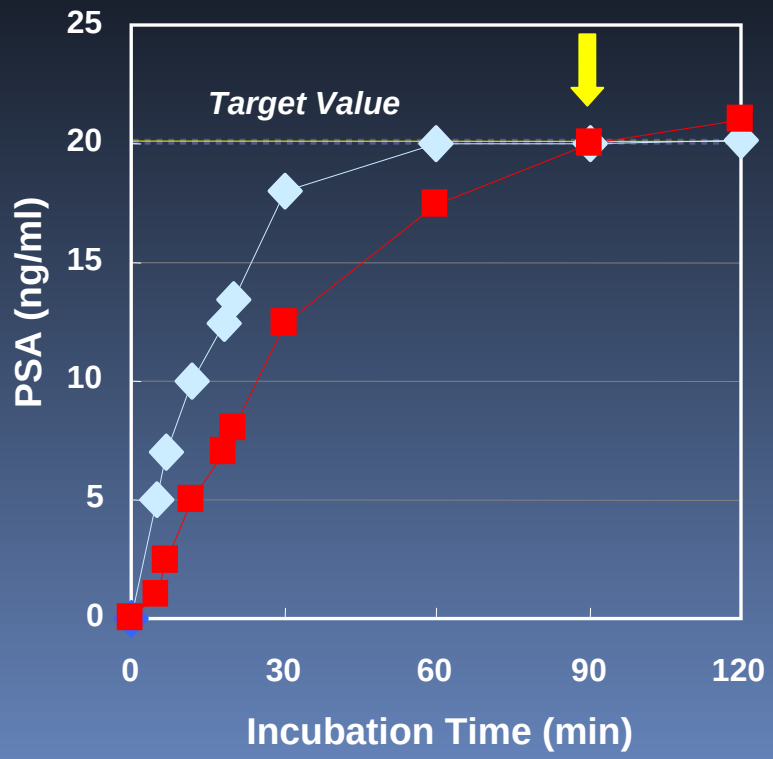
PSA

存在形態の多様性

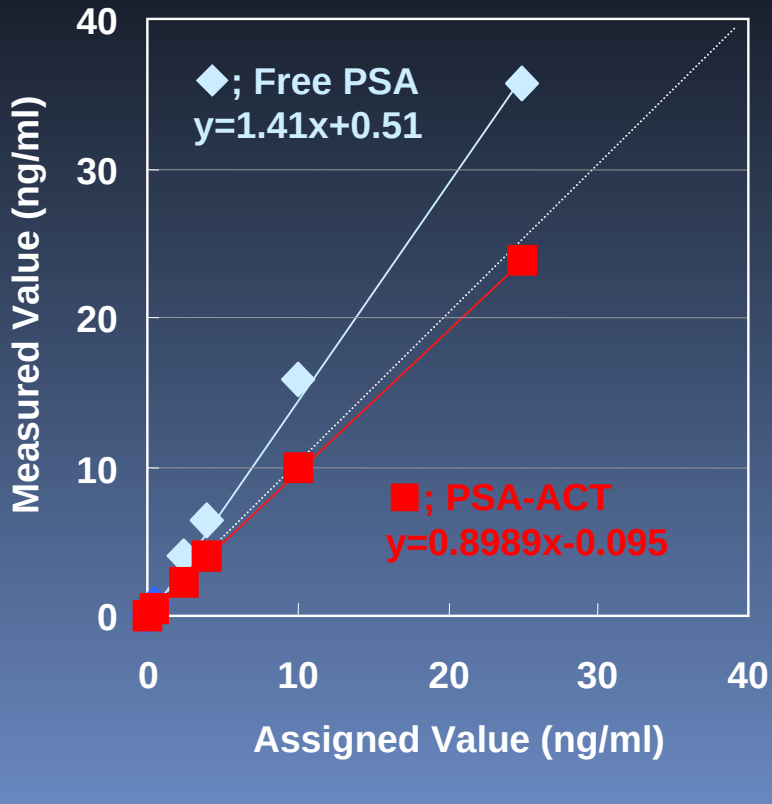
◆; Free PSA

■; PSA-ACT

インキュベーション時間による反応性の相違



希釈試験による反応性の相違



免疫学的測定に干渉する要因

Ⅰ.特異性に関する問題点

対象物質の多様性・免疫類似物質

抗原の多様性（分子量、糖鎖、存在形態）

抗体の多様性(免疫グロブリンクラス、Avidity、抗原に対する特異性）

Ⅱ.標準物質に関する問題

由来動物種、由来臓器
リコンビナント
溶媒のマトリクス

Ⅲ.非特異反応

異好性抗体（HAMA,抗BSA抗体etc.）
生体成分 （RF, クリオグロブリン, M蛋白, 乳びetc.）
不明な反応 （IgM etc）

Ⅳ. 試薬構成成分

界面活性剤, ブロッキング剤etc.

Ⅴ.その他

抗凝固剤, 分離剤etc.

特異性に関する問題点(抗体系)

抗体の多様性

免疫グロブリンクラス、サブクラス

抗原に対する特異性

Avidity

抗原がMixture

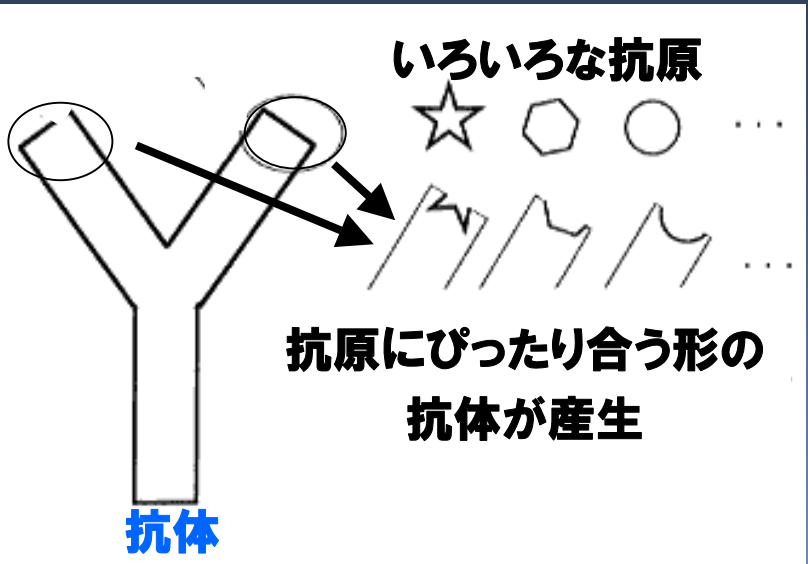
抗A抗体とは？

Aに結合する全ての免疫グロブリンの総称

抗A抗体価とは？

A抗原に結合する抗体量の指標

検体中に存在する抗体濃度ではない



特異性に関する問題点(その2)

抗DNA抗体

抗体の多様性

免疫グロブリンクラス:IgG型、IgM型、IgA型が存在する。

測定法により検出するIgクラスが異なる。

RIA法;全免疫グロブリンクラス

ELISA法;IgG

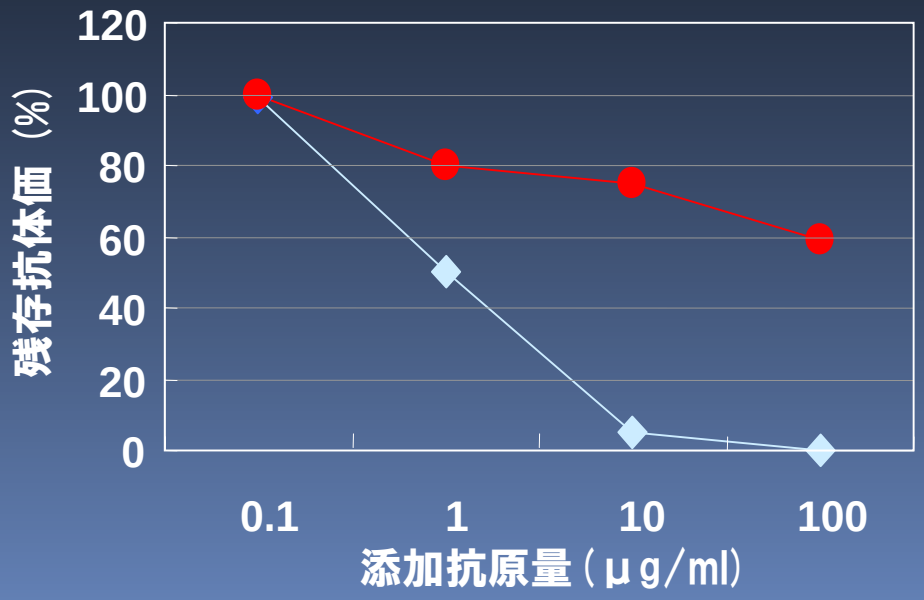
凝集法;IgM＞IgG

特異性に関する問題点（その2）

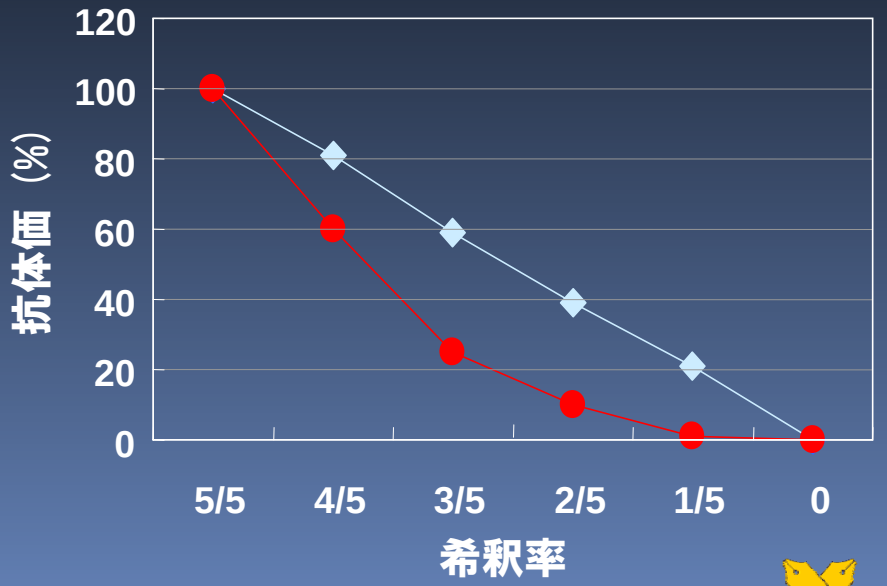
抗DNA抗体

Avidity (親和性)

抗体吸収率



希釈直線性



免疫学的測定に干渉する要因

Ⅰ.特異性に関する問題点

対象物質の多様性・免疫類似物質

抗原の多様性（分子量、糖鎖、存在形態）
抗体の多様性（免疫グロブリンクラス、Avidity、抗原に対する特異性）

Ⅱ.標準物質に関する問題

由来動物種、由来臓器
リコンビナント
溶媒のマトリクス

Ⅲ.非特異反応

異好性抗体（HAMA,抗BSA抗体etc.）
生体成分 （RF, クリオグロブリン, M蛋白, 乳びetc.）
不明な反応 （IgM etc）

Ⅳ. 試薬構成成分

界面活性剤, ブロッキング剤etc.

Ⅴ.その他

抗凝固剤, 分離剤etc.

標準物質に関する問題点

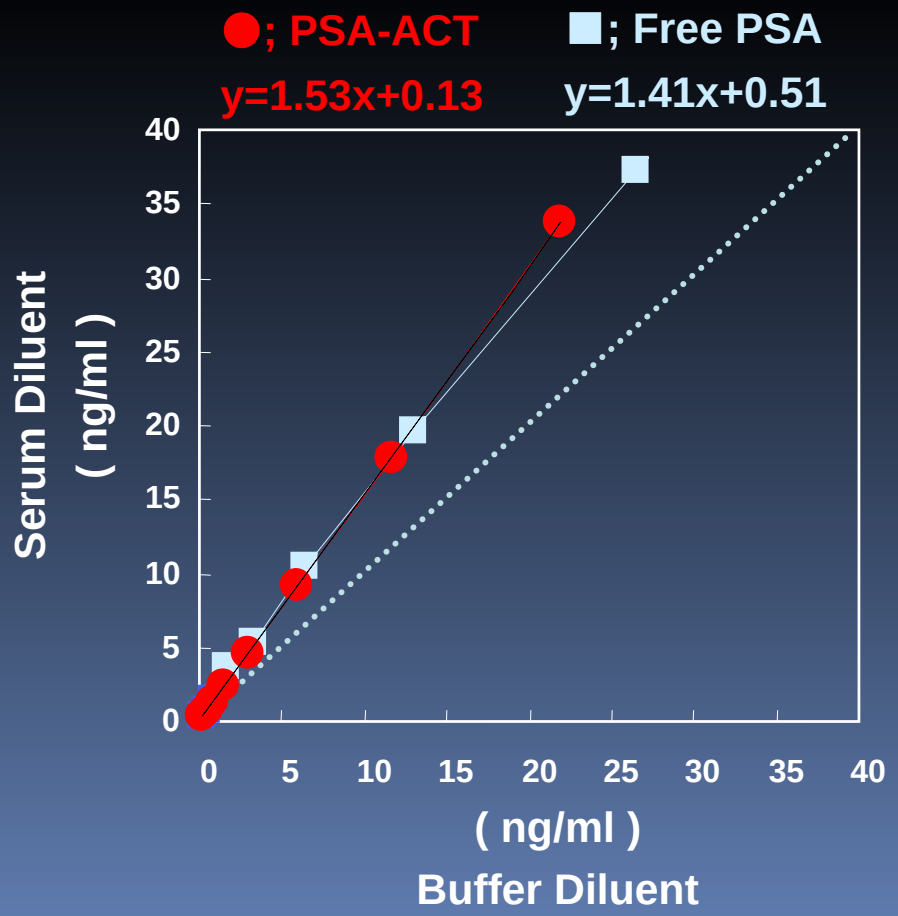
溶媒のマトリクス

PSA

由来動物種、由来臓器
リコンビナント

精製PSA試料を用いた希釈試験

1. Serum baseで反応性が高い
2. Free PSAとPSA-ACTで反応性の違いに差がある。



加野象次郎;日本臨床検査標準協議会会誌.vol.21(1), 2006. より一部改変

免疫学的測定に干渉する要因

Ⅰ.特異性に関する問題点

対象物質の多様性・免疫類似物質

抗原の多様性（分子量、糖鎖、存在形態）
抗体の多様性（免疫グロブリンクラス、Avidity、抗原に対する特異性）

Ⅱ.標準物質に関する問題

由来動物種、由来臓器
リコンビナント
溶媒のマトリクス

Ⅲ.非特異反応

異好性抗体（HAMA,抗BSA抗体etc.）
生体成分 （RF, クリオグロブリン, M蛋白, 乳びetc.）
不明な反応 （IgM etc）

Ⅳ. 試薬構成成分

界面活性剤, ブロッキング剤etc.

Ⅴ.その他

抗凝固剤, 分離剤etc.

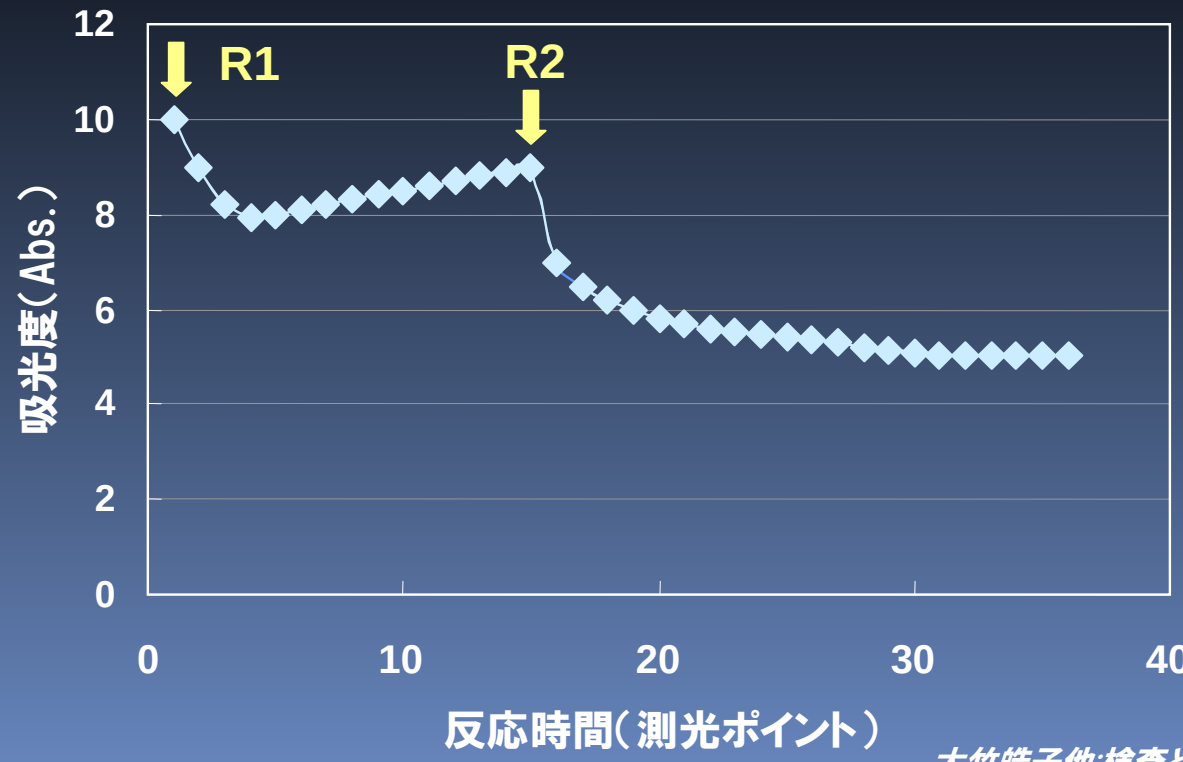
非特異反応(その1: RF)

CRP

TIA法に干渉したRF(R1中のPEGと反応)

LA-CRP濃度：0.5mg/dl
TIA-CRP濃度：-14.5mg/dl

RF陽性血清でのTIA法におけるCRP反応タイムコース

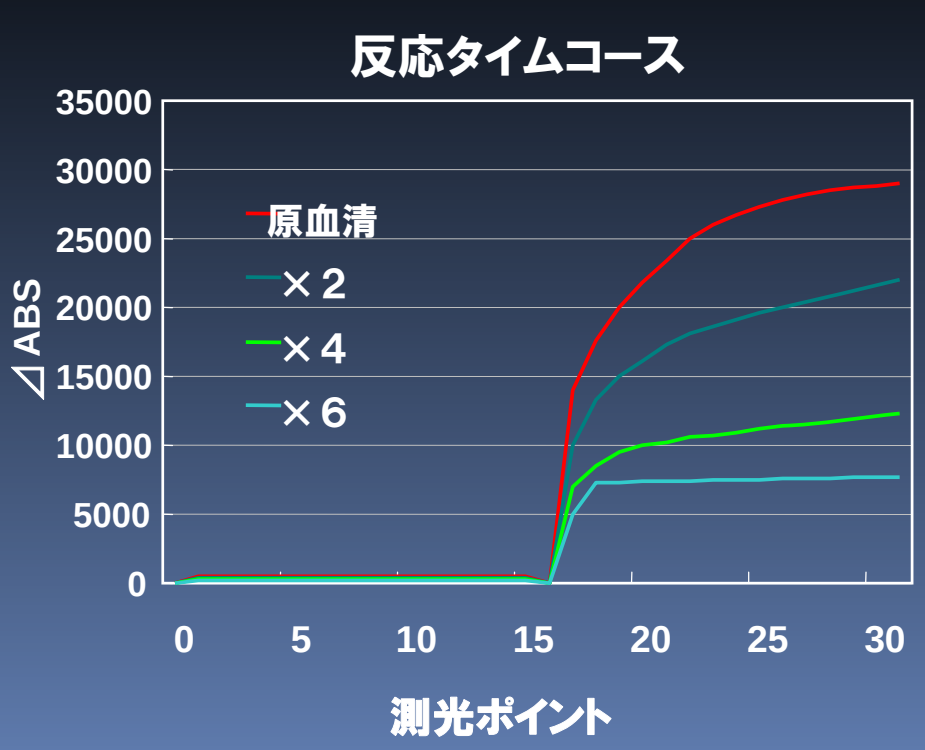


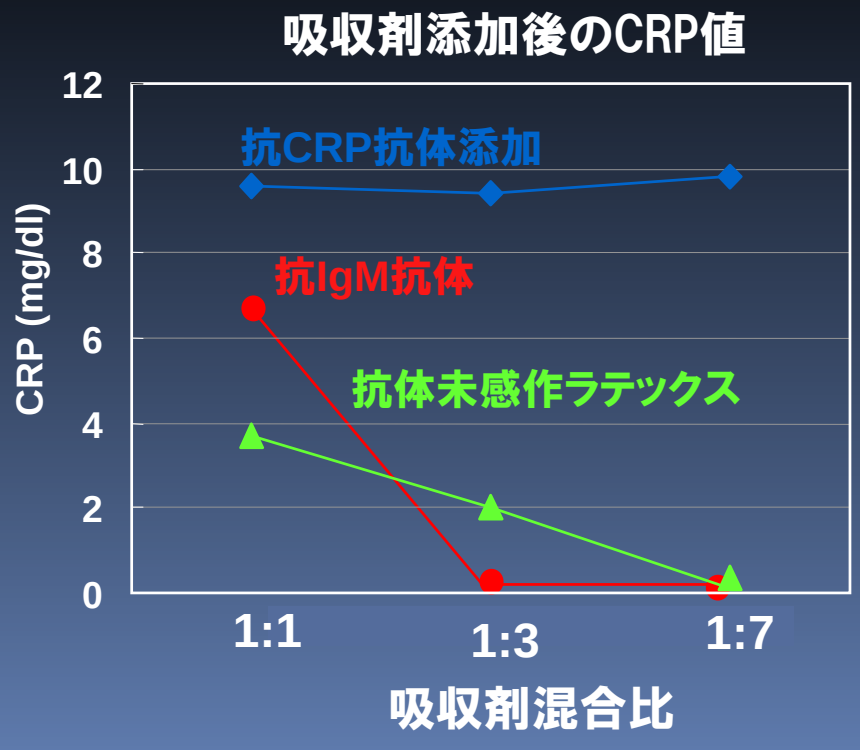
大竹皓子他:検査と技術,vol.25,1997より一部改変

非特異反応(その2: IgM)

CRP

TIA 法	0.1mg/dl	IgG	259mg/dl
LA 法	9.4mg/dl	IgA	120mg/dl
		IgM	1.220mg/dl

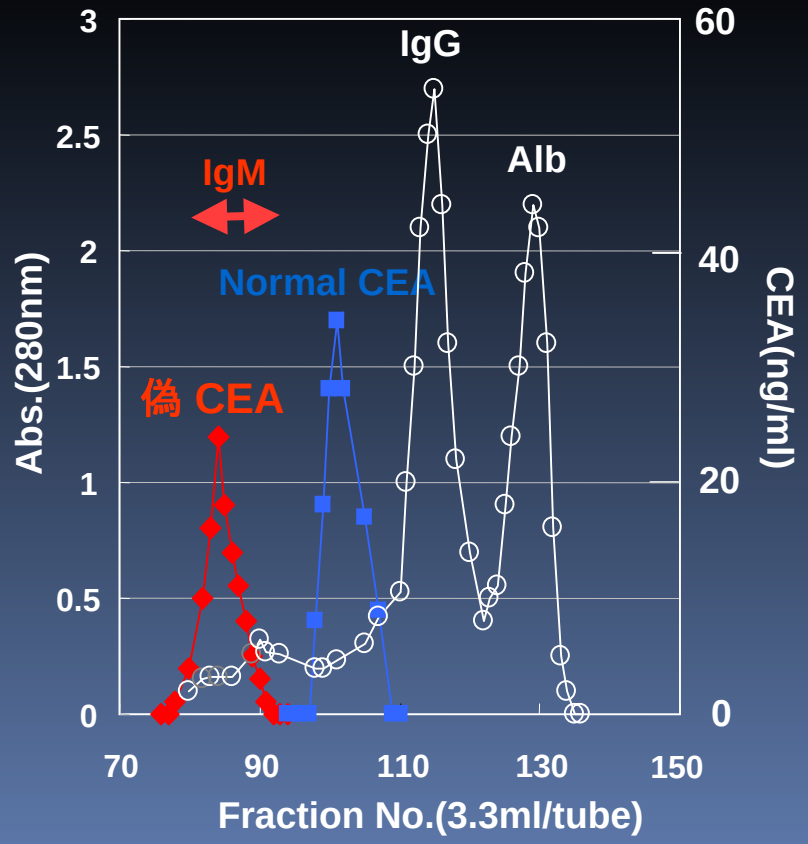




非特異反応(その3: IgM)

CEA

2-site immunometric assayに干渉したヒトIgM



測定法	測定原理	CEA	Cut off 値
A	IEMA (1 step)	180	5.6
B	IEMA (1 step)	130	5.0
C	IEMA (1 step)	16.8	2.5
D	IEMA (2 step)	3.5	4.4
E	RIA	2.1	2.5
A'	HAMA 除去剤添加 →		5.8
A''	抗ヒトIgM 抗体による吸収 →		15.2

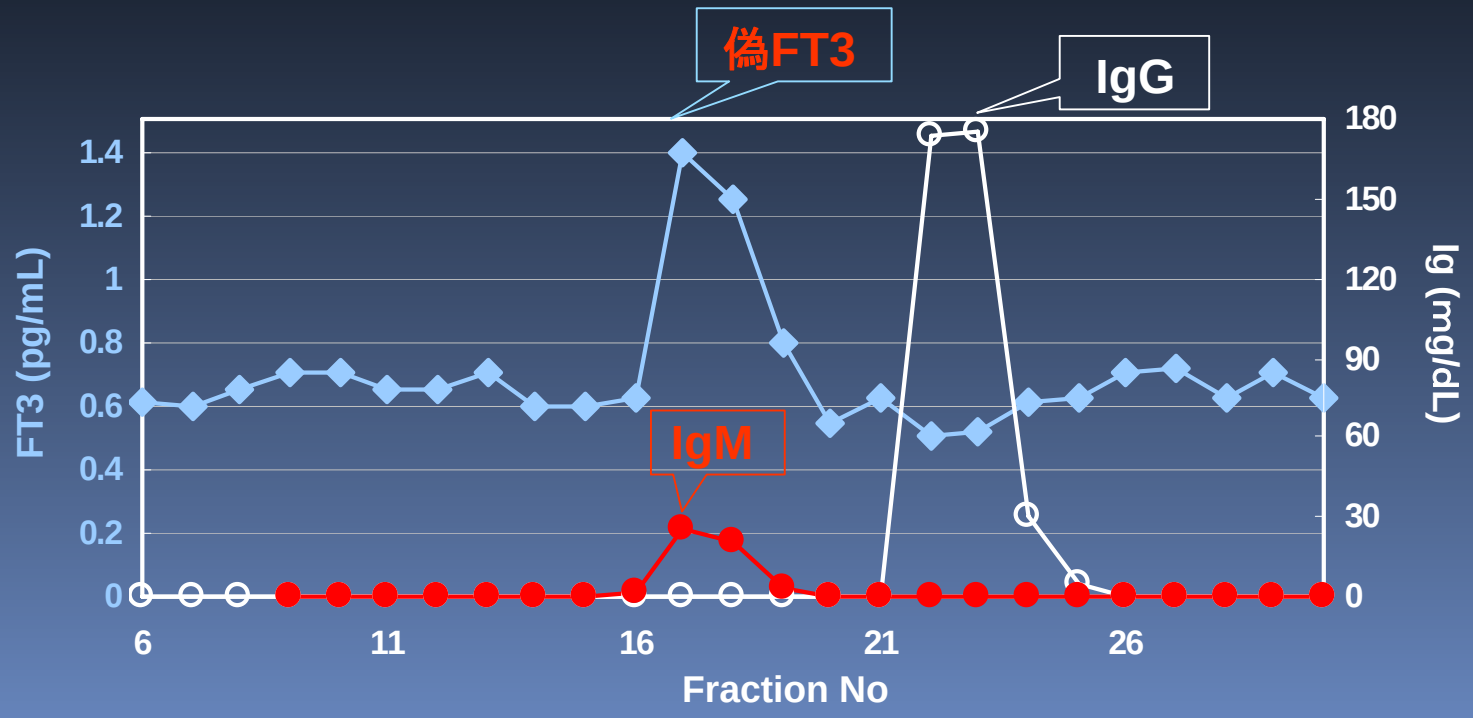
大竹皓子他:検査と技術.vol.25,1997より一部改変

非特異反応(その4: IgM)

FT3

IgM型抗T3抗体の存在が疑われる症例

		PEG添加	Protein A添加
TSH		0.20 (103%)	0.25 (113%)
FT4		1.20 (150%)	1.38 (162%)
FT3		2.94 (160%)	4.04 (155%)



免疫学的測定に干渉する要因

Ⅰ.特異性に関する問題点

対象物質の多様性・免疫類似物質

抗原の多様性（分子量、糖鎖、存在形態）
抗体の多様性（免疫グロブリンクラス、Avidity、抗原に対する特異性）

Ⅱ.標準物質に関する問題

由来動物種、由来臓器
リコンビナント
溶媒のマトリクス

Ⅲ.非特異反応

異好性抗体（HAMA,抗BSA抗体etc.）
生体成分 （RF, クリオグロブリン, M蛋白, 乳びetc.）
不明な反応 （IgM etc）

Ⅳ. 試薬構成成分

界面活性剤, ブロッキング剤etc.

Ⅴ.その他

抗凝固剤, 分離剤etc.

採血管添加物

Ⅰ.EDTA

IgG-κ型M蛋白と反応し、沈殿物を形成

➡ 血小板の軽度増加と白血球の異常増多

藤田清貴ら. 臨床病理 49:7,2001「検査に影響を及ぼすM-蛋白」

Ⅱ.ヘパリン中和剤（プロタミン硫酸類似物質）

➡ TP-PA（凝集法）で偽陽性反応

「免疫血清検査における異常現象－その実例と対策－」

Ⅲ.血清分離剤

➡ ラテックス凝集法でAFPの異常高値

「免疫血清検査における異常現象－その実例と対策－」

Ⅳ.遊離脂肪酸

➡ FT4の偽高値　*野村隆ら.日内誌 63,752-772,1987*

干渉起因物質と発見の糸口

原因物質	項目	測定原理	現象
RF	IgA	NIA 法	元血清値と希釈再検値の矛盾
	CRP	LA 法	
	C3, C4	NIA 法	異常高値
異好性抗体	CRP	TIA 法	二法間のデータ乖離
IgM	IgM	TIA 法	異常低値
		LA 法	前回値との乖離
	CRP, ASO	LA 法	異常高値
M蛋白	IgA	LA 法	元血清値と希釈再検値の矛盾
	IgG	TIA 法	前回値との乖離

「免疫血清検査における異常現象－その実例と対策－」より

測定法による干渉要因

干渉物質	現象	回避策
濁り	ブランク反応異常	LPL添加 界面活性剤
M蛋白	R1成分との反応	塩類添加
RF	PEG と凝集	免疫動物の選択
	試薬中の動物抗体と反応	F(ab')2抗体使用
IgG	各種交叉反応	Protein A/G添加
IgM	PEG と凝集	DTT, 2-ME添加
異好抗体	偽抗原抗体反応	異好性阻止試薬

タンパク質の性質を利用した解析

性質	処理
疎水性	PEG処理
親和性	Protein A / G 処理 （HAMA 確認試験）
分子サイズ	ゲルろ過処理 ゲル電気泳動
電荷	等電点電気泳動

主な乖離検体解析法の特徴

PEG処理

- タンパク質の変性が少ない
- 生体高分子物質をまとめて除去（非特異的）
- 疎水性、分子量により目的物質も除去される可能性

Protein A/G処理

- IgGを特異的に除去（IgG Fc領域に強い親和性）
- IgG以外の免疫グロブリンの特定は不可

ゲルろ過処理

- 複数の要因に対する非特異反応の確認が可能

HAMA吸収剤

- 試薬に添加可能→特殊処理が不要
- 通常レベルのHAMA濃度では検出不可

Protein A/GのIg結合における種特異性

		Protein A	Protein G		Protein A	Protein G
ヒト	IgG1	++	++	ラット	−	+
	IgG2	++	++	ヤギ	−	++
	IgG3	−	++	ヒツジ	−	++
	IgG4	++	++	ウシ	++	++
	IgA	+	−	ウサギ	++	++
	IgD	−	−	ニワトリ	−	−
	IgE	−	−	Guinea pig	++	+
	IgM	+	−	ウマ	−	++
マウス	IgG1	+	++	イヌ	++	+
	IgG2a	++	++	ブタ	++	++
	IgG2b	++	++			
	IgG3	−	++			
	IgG4	−	−			

異常反応の検出と解析手順

A. 異常高値、異常低値に対する注意
B. 自己抗体、RF, M蛋白陽性患者のチェック
C. 時系列的データの観察
D. 項目間データ矛盾の抽出
E. 臨床病態の確認（病態との矛盾は？）

1. 希釈直線性試験
2. 反応タイムコースの確認
3. 他法(測定原理)による測定
4. 干渉物質の非特異的除去・・・PEG処理
5. 抗対象抗原抗体、抗原による吸収確認
6. 抗体未感作ラテックスによる吸収確認
7. 非特異反応関与IgGの除去・・・ Protein A/G 処理
8. HAMA確認試験
9. 試料の透析処理
10. 免疫電気泳動による異常蛋白の検出
11. ゲルろ過処理による非特異反応原因物質の分子量的推定

異常反応への対応

試料成分

M蛋白、RF、免疫複合体
クリオグロブリン、
異好性抗体、脂質成分　他

目的外抗原抗体反応
非特異凝集
交叉反応

試薬成分

動物蛋白
界面活性剤
他

発見

異常高値、異常低値
データエラー（ブランクエラー、
データ矛盾（関連項目間、前回値、別法）
RF,M蛋白陽性？

確認

機器・試薬不良？
反応タイムコース
希釈直線性確認
別法による測定

解析

吸収試験、ウェスタンブロット、免疫電気泳動
ゲルろ過分析、PEG添加試験、DTT還元処理
臨床背景

臨床への報告
病態確認

対応法の確立
試薬の改良
新知見の可能性

「免疫血清検査における異常現象－その実例と対策－」より

免疫学的測定における問題点

まとめ

- 免疫学的測定法は異常反応のリスクがあることを把握する。
- 精度管理の一環として異常反応発見の システムを構築する。
- 原因究明の手段を常備し、技術を身に付ける。
- 異常現象（反応）が疑われた場合は臨床への連絡を行う。
- 異常反応症例データを公開し、情報を共有する。

異常現象の発見と要因の解析は・・・・

技師の能力（知識、観察力、技術）が重要

免疫機構の新たな事実発見に繋がる可能性

ご清聴ありがとうございました