◆原 著◆

Latex Photometric Immunoassay (LPIA) による 尿中 FDP-E 測定の基礎的検討

海 津 嘉 蔵^{*1}, 伊 藤 寧 子^{*1}, 瓜 生 康 平^{*1}
橋 本 修^{*2}, 小 嶺 憲 国^{*2}, 江 藤 澄 哉^{*2}

The measurement of urinary FDP-E by latex photometric immunoassay

Kazo KAIZU^{*1}, Yasuko ITO^{*1}, Kohei URIU^{*1} Osamu HASHIMOTO^{*2},
Norikuni KOMINE^{*2} and Sumiya ETO^{*2}

Key words: urinary FDP-E, urinary FDP, latex photometric immunoassay, latex agglutination test

This study is to establish the measurement of urinary FDP-E using latex photometric immunoassay (LPIA).

pH values of urine and urinary substances such as albumin, glucose, urea, bilirubin, ascorbic acid and hemoglobin did not affect the measurement of urinary FDP-E (Fig. 1~3).

Urinary FDP-E concentrations were not changed after storage for 7 days at room temperature and for 28 days at 4°C, -20°C, -80°C, both with and without 0.1 mol of transaminocaprinic acid (Fig. 4). Normal values of urinary FDP-E are 0.27 ± 0.31 ng/ml (N=36), 264.52 ± 310.38 ng/day (N=35) (Fig.5).

These results suggested: (1) Urinary FDP-E can be measured without any disturbance by pH, and abnormal substance which were excreted into urine. (2) Storages of urine for 7 days at room temperature and 28 days below 4°C did not affect the measurement of urinary FDP-E.

はじめに

各種腎疾患の進展・増悪因子の1つに腎内凝固・線溶が関与しており、その指標として尿中FDPが有力であることは、すでに報告されている^{1)~3)}。尿中FDP測定法には、赤血球凝集

阻止反応⁴⁾, radioimmunoassay⁵⁾, staphylococcus clumping test⁶⁾, ラテックス凝集反応⁷⁾が用いられている。そのうち、広く用いられているのは、ラテックス凝集反応で、すでに広く臨床応用されている。しかし、この方法は、簡便であるという反面、半定量法であり、

^{*1} 産業医科大学腎センター〔〒807 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1〕: Kidney Center, University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu, Japan, 807

^{*2} 産業医科大学第一内科〔〒807 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1〕: 1st Department of Internal Medicine, University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka Yahatanishi-ku, Kitakyushu, Japan, 807, 受付: 1990. 9. 19, 受理: 1990. 11. 16

かつ測定感度が悪い。またラテックス粒子に抗ヒト・フィブリノーゲンを結合させているため、実際には、尿中には FDP のみでなく、尿中のフィブリノーゲンをも測定してしまう等の短所を有している。近年、これらの短所を一挙に改良した測定法が開発された。それが、Latex photometric immunoassay 法 (LPIA) である⁸⁾。本法の特長は、ラテックス凝集反応のもつ迅速性や簡便性を失うことはなく、従来のラテックス凝集反応にみられた偽陽性を除去し、radioimmunoassay に匹敵する高感度、高精度を実現し、免疫血清検査の自動化を可能としたシステムである。

LPIA の測定原理は、次のごとくである。即ち FDP-E 抗体で感作されたラテックスと検体中の FDP-E との凝集反応を 940 nm に中心波長を有する発光ダイオードを光源とした rate turbidimetry で測定するのである。

対象と方法

標準品を希釈液で希釈し、0, 240, 480, 960, 1920 ng/ml の濃度に調整し、前もって測定して検量線を作成した。プラスチックセルに、200 μ l の安定化液を入れておき、検体を 5 μ l 加える。プラスチックセルを比色枠に入れセットし、LPIA-100 (三菱化成) にて測定した。測定器では、自動的にラテックス試薬の注入及び攪拌が行われ、32秒のプレインキュベーション後、3秒間隔で10回濁度を測定する。その平均変化率を求めて、反応速度を計算し、検量線より濃度が求められる。

結 果

正常尿を 1500rpm で 10 分間遠心し、その上清に、2 種類の濃度の standard FDP-E を添加して検体とした。

(A) 尿の pH による影響 (Fig. 1)

検体の pH を、5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 に 0.1 N の NaOH と HCl にて調整し、それぞれの FDP-E 値を測定した。Fig. 1 にその結果を示すが、4 種類の濃度について、前述の異なった pH の尿の FDP-E 値は、全く差がなかった。

Fig. 1 The effect of urinary pH on urinary FDP-E measurement.

(B) 共存物質の影響

1) BSA による影響 (Fig. 2)

検体に BSA (和光純薬) を加え、蛋白濃度が 125, 250, 500, 1000 mg/dl となるように調整した尿の FDP-E を測定した。低濃度と高濃度の 2 種類での FDP-E 添加尿で、FDP-E 値の変化を検討したが、BSA による尿中 FDP-E 測定への影響はみられなかった。

2) 糖による影響 (Fig. 2)

検体にブドウ糖 (関東化学) を添加し、尿中の糖濃度が 250, 500, 4000, 8000 mg/dl とした際に、尿中 FDP-E 濃度を測定した。低濃度、高濃度の FDP-E 添加尿のどちらでも、尿中 FDP-E 値は変化しなかった。

3) 尿素による影響 (Fig. 2)

検体に尿素 (Schwarz/Mann) を添加し、尿中の尿素濃度が 1.5, 3.0, 6.0 g/dl となるようにした際の、尿中 FDP-E 濃度を低濃度と高濃度の FDP-E 添加尿で測定した。両濃度共、尿中 FDP-E 濃度は変化しなかった。

4) ビリルビンによる影響 (Fig. 2)

検体にビリルビン (Merck) が 0.5, 4.0, 8.0 mg/dl とした場合の尿中 FDP-E 濃度を測定した。低濃度と高濃度の両方の FDP-E 添加尿で尿中 FDP 濃度を測定した。両濃度共、尿中 FDP-E 濃度は変化しなかった。

Fig. 2 The effect of bovine serum albumin, glucose, urea, and bilirubin on urinary FDP-E measurement.

5) アスコルビン酸による影響 (Fig. 3)

検体にアスコルビン酸を 50, 100, 200 mg/dl の濃度になる様に添加し, 尿中 FDP-E の濃度を低濃度と高濃度添加尿で測定した。アスコルビン酸 200 mg/dl 添加の際の高濃度 FDP-E 尿で上昇傾向はみられたものの, それ以外では, 変化がなかった。アスコルビン酸添加による尿中 FDP-E 測定への影響は少ないものと考えられた。

6) ヘモグロビンによる影響 (Fig. 3)

ヘモグロビン作製について: 正常人よりヘパリン採血して, 生食で充分洗浄し, 洗浄赤血球

液を作製した。-80°C で凍結し, その後解凍して, 充分量の生食を加え, 5000 rpm で 30 分間遠心し, その上清のヘモグロビン濃度を測定した。この上清を希釈し, 尿中ヘモグロビン濃度が 50 mg/dl, 500 mg/dl になるように検体にヘモグロビン液を添加して, 尿中 FDP-E 濃度を測定した。FDP-E の低濃度, 高濃度の両方の尿では共に, FDP-E 値の変動はなかった。

(C) 保存条件 (温度と期間) による影響 (Fig. 4)

温度条件として室温, 4°C, -20°C, -80°C の 4 種で, 室温は 1, 3, 7 日, 4°C, -20°C, -80°C は

Fig. 3 The effect of ascorbic acid and hemoglobin on urinary FDP-E measurement.

Fig. 4 The effect of temperature on urine storage concerning urinary FDP-E measurement.

◎: urine with 0.01 M of t-amino-methyl-cyclohexane carboxylic acid (t-AMCHA)

○: urine without t-AMCHA

1,3,7,14,28日保存した。検体の尿中 FDP-E は3濃度で、低濃度、中濃度、高濃度の3種類を用いて保存条件の検討を行った。また、保存

の際、抗プラスミン剤のトランサミンを1/100モル検体に添加し、その有無による尿中 FDP-E の変化も検討した。その結果を Fig. 4 に示

Fig. 5 Normal value of urinary FDP-E in 36 healthy subjects were collected for 24 hours at 4°C. One sample was excluded, since the urine volume was not accurate.

しているが、室温であれば7日間、4°C 以下であれば28日間は検体保存が可能であった。また、トランサミンは必ずしも必要ではなかった。

(D) 尿中 FDP-E の正常値 (Fig. 5)

健常人36名に24時間尿所蓄尿を実施し、尿量を測定し、その1部を1500 rpm で10分間遠心し、その上清を検体として用いた。36例中35例については50~100倍にミニコン簡易濃縮器(アミコン社製、カットオフ15,000)濃縮して、FDP-E濃度を測定した。36検体中1検体は尿量が不明なため、1日排泄量として計算できたのは35検体であった。尿中FDP-Eの濃度は、 0.27 ± 0.31 ng/ml で、1日排泄量としては 265 ± 310 ng/day であった。

考 案

LPIA (Latex photometric immunoassay) system による FDP-E 測定は、ラテックス凝集反応によって生じた凝集塊の粒径の増大を、940 nm の近赤外線をあてることによって透過

光の減少の程度を知ることにより、コンピューター処理にて検体中の光源の濃度を求める方法である⁹⁾。本法による FDP-E 測定は、血清を対象として使用されてきたが、本研究では、尿中 FDP-E 測定のための基礎的検討を実施した。尿を検体とする場合、pH が5.0~9.0まで、幅広く変動する可能性があるため、尿 pH による影響を検討したが、ほとんど影響をうけないことが判明した (Fig. 1)。尿に BSA 添加した結果から、腎臓における高度蛋白尿による影響は少ないと考えてよいと思われるが、腎疾患の蛋白尿は、単にアルブミンのみならず、種々の濃度のグロブリンもはいっているため、蛋白の影響はないと断言はできないが、その場合でも、主体はアルブミンであることから、影響は少ないと考えられる。糖、尿素、ビリルビン、ヘモグロビン、アスコルビル酸はいずれも影響はなく、充分正確に測定可能であった。次に、保存について、尿中には正常人でもウロキナーゼが入っており、D や E 分画の低分子 FDP でも、さらに分解されていく可能性があり、かつ保存によって抗原性が変化するかもしれない。しかし、今回の結果は、室温でも7日間、4°C 以下ならば28日間は保存が可能であり、しかも、トランサミンの添加が不要であるということ、尿中の FDP-E は比較的安定しているものと考えられた。尿中には、ウロキナーゼ等、線溶亢進作用のある分解酵素が多く含まれているが、トランサミンの添加なく室温で蓄尿可能なことは、臨床上便利であろう。しかし、患者尿中には、フィブリノーゲンやその高分子 FDP が含有されている可能性があるため、実際にはなるべく冷所蓄尿で、トランサミンを入れた状態で蓄尿した方が望ましいことはいうまでもない。

尿中 FDP-E の正常値について、米原ら¹⁰⁾は、健常人39名の尿中 FDP-E を測定しており、平均値は 2.38 ± 2.42 ng/ml、正常範囲は0~7.1 ng/ml としている。しかし、これは記載されていないので不明であるが、恐らく随時尿を用いたものであると思われ、濃度のみしか記載がない。今回の著者の成績は24時間冷所蓄尿で、50~100倍濃縮して FDP-E 濃度と1

日排泄量をもとめた。Fig. 4 に示したごとく、1日尿では全例1.0 ng/ml 以下、1100 ng/day 以下であった。したがって、米原らの基準値の7.1 ng/ml はかなり高いと思われ、本測定法の感度からみても、5 ng/ml 以下としておくべきであろう。

結 語

Latex photometric immunoassay (LPIA) による尿中の FDP-E の測定のための基礎的検討を行い、次のことが明らかとなった。(1) 尿の pH が5.0~9.0の範囲では尿中 FDP-E 測定は影響をうけない。(2) 共存物質の影響: 種々の BSA 濃度 (125, 250, 500, 1000 mg/dl), 糖 (250, 500, 4000, 8000 mg/dl), 尿素 (1.5, 3.0, 6.0 g/dl), ビリルビン (0.5, 4.0, 8.0 mg/dl), アスコルビン酸 (50, 100, 200 mg/dl), ヘモグロビン (50, 150, 300 mg/dl) は尿中 FDP-E 測定に影響を与えない。(3) 保存条件: 室温では7日間, 4°C, -20°C, -80°C では28日間, 保存可能であり, その際, トランサミンの添加の有無でも影響はない。(4) 尿中 FDP-E の正常値は濃度では 0.27 ± 0.31 ng/ml (1.0 ng/ml 以下), 1日排泄量では 264.52 ± 310.38 ng/day であった。

文 献

- 1) 海津嘉蔵: 腎疾患における尿中 FDP の臨床的意義, 日腎誌, **18**: 371~387, 1976
- 2) 海津嘉蔵, 岡 治道, 波多野道信: 尿中 FPA と腎内血液凝固, 血液と脈管, **11**(2): 309~316, 1980
- 3) 海津嘉蔵, 瓜生康平: 腎疾患と血液凝固線溶系—進展・増悪因子として—, 循環器科, **19**(3): 236~243, 1986
- 4) Merskey, C., Kleiver, G. J. & Johnson, A. J.: Quantitative estimation of split products of fibrinogen in human serum, relation to diagnosis and treatment. *Blood* **28**: 1~18 1966
- 5) 藤巻道男, 池松正次郎, 加藤正俊, 他: 血液凝固における凝血因子抗原性の変化, 臨床病理, **26**: 298~304, 1978
- 6) Hawiger, J., Niewarowski, S., Gurewich, V., et al.: Measurement of fibrinogen and fibrin degradation products in serum by staphylococcal clamping test. *J. Lab. Clin. Med.*, **75**: 93~108, 1970
- 7) Sameraro, N., Donati, M. B., Vermeylen, J.: Detection of fibrinogen-related antigen in urine with latex techniques. *Proc. of IV th Intern. Congr. Soc. Thromb. Haematostasis, Vienna, June, 19~22, 1973*
- 8) 沢井政信, 右田俊介: ラテックス凝集反応の初速度による免疫定量法と応用, 検査と技術, **10**: 555~559, 1982
- 9) 筒井聡明, 須藤忠満: ラテックス凝集反応の光学的測定法, 検査と技術, **12**(7): 581~587, 1984
- 10) 米原ヤス子, 秋富由美子, 宮地隆典: 臨床検査機器・試薬, **10**(5): 965~971, 1987

1) 海津嘉蔵: 腎疾患における尿中 FDP の臨床的意