

## ●原 著

## KL-6 迅速検査法の有用性についての検討

森本 耕三 石川 理恵 守屋 敦子 増永 愛子  
 神宮 浩之 安藤 常浩 生島壮一郎 折津 愈

要旨：高分子量のシアロ糖蛋白であり肺細胞抗原のクラスター 9 に分類される KL-6 は、間質性肺炎の診断および活動性の判定補助として有用である。特に急性憎悪時は気胸、肺塞栓、心不全など明らかな他疾患を除外するとともに、KL-6 値の上昇を参考に診断する。今回、院内の既存の全自動化学発光酵素免疫測定システムに対応した、血清および血漿を測定対象に短時間測定を可能とする KL-6 検査法が開発されたことから、その性能を評価した。従来法との相関性を検討した結果、 $y=1.094x-6.849$ 、相関係数 0.986 (N=326) と良好な結果であった。血清及び血漿を用いて測定した KL-6 の比較は、 $y=0.997x-1.211$ 、相関係数 0.997 (N=225) であった。さらに、経過観察症例においても従来法と同様の結果が得られたこと、各種疾患の検体を用いた検討においても、血清 KL-6 値が間質性肺炎で高値であることが確認できた。以上のように、採血から結果報告を 1 時間程度に短縮できることから、外来における診察前検査や急性憎悪を疑う症例における迅速検査法としての有用性が期待される。

キーワード：KL-6、間質性肺炎、化学発光酵素免疫測定、ルミパルス

KL-6, Interstitial pneumonia, Chemiluminescent enzyme immunoassay, LUMIPULSE

## 緒 言

KL-6 は体外診断用医薬品項目として、1999 年に承認され、2000 年に保険収載された。現在、血中 KL-6 の測定試薬として汎用されている方法として、サンドイッチ酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay ; EIA 法) や電気化学発光免疫測定法 (electric chemiluminescent immunoassay ; ECLIA 法) を原理とした自動分析装置による測定<sup>1)~3)</sup>が可能である。しかし手法による検体の前処理操作や測定毎にキャリブレーション同時測定が必要であることなど、全自動の測定でないために操作が煩雑で、結果を得るために時間を要する。今回、我々は院内に既存の全自動化学発光酵素免疫測定システム「ルミパルス Presto II」に対応した新しい KL-6 測定試薬が開発されたことから、その基礎的性能を評価した。

## 研究対象および方法

## 1. 対象

2007 年 4 月から 5 月の間に当センター呼吸器内科を受診した、入院患者検体および外来患者検体 (血清 326 例、血漿 225 例) を対照に検討した。

## 2. 方法

本試薬は、2 ステップサンドイッチ法を原理とする化学発光酵素免疫測定法 (chemiluminescent enzyme immunoassay ; CLEIA 法) による KL-6 測定試薬 (以下、本法) である。抗体結合粒子に抗 KL-6 モノクローナル抗体結合フェライト粒子 (固相)、酵素標識抗体にアルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗 KL-6 モノクローナル抗体、基質には化学発光基質である AMPPD [3-(2'-spiroadamantane-4-methoxy-4-(3"-phosphoryloxy) phenyl-1,2-dioxetane disodium salt) を用いている。本法の測定には全自動化学発光酵素免疫測定システムである「ルミパルス Presto II」を用いた。比較検討には、外注検査で用いられている ECLIA 法を原理とした電気化学発光免疫測定装置「ピコルミ II」を用いた「ピコルミ KL-6」(以下、従来法) の測定値を用いた。

本法の測定対象検体は血清および血漿で、システムに検体と測定試薬をセットした後、以降の測定操作は装置内で自動的に行われる。検体 10 $\mu$ L は自動的に検体希釈液 190 $\mu$ L と混合された内 10 $\mu$ L が検体として、抗体結合粒子 50 $\mu$ L と 37 $^{\circ}$ C で 8 分間反応させる。洗浄後、酵素標識抗体 50 $\mu$ L を加えて 37 $^{\circ}$ C で 8 分間反応させ、未反応の酵素標識抗体を B/F 分離後に化学発光基質 AMPPD を 200 $\mu$ L 加える。37 $^{\circ}$ C で 4 分間インキュベーション後に、ALP の触媒作用により AMPPD 分解に伴い放出される 463nm 付近に発光極大を持つ光の発光量

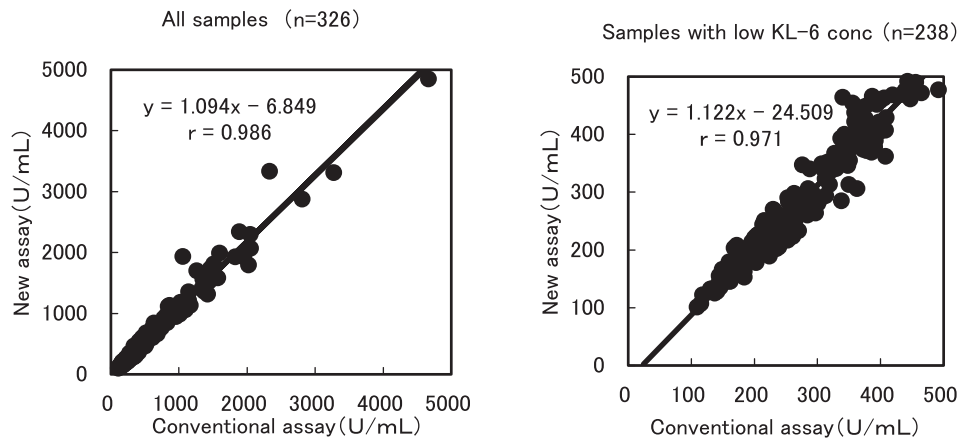


Fig. 1 Correlation of KL-6 levels measured by the new and the conventional assay systems.

を測定する。この発光量から、被検体中の KL-6 濃度を算出する。測定範囲は 1~10,000U/mL である。

検量線の較正は、試薬ロットごとにあらかじめ登録されているマスターキャリブレーションに対して、0 濃度と最高濃度の 2 濃度のキャリブレータのみで事前に補正を行う方式である。

## 成 績

### 1. 基礎的検討

#### 1) 再現性試験

濃度の異なる管理検体 3 例を用いて、6 回連続測定を行ったときの同時再現性は、変動係数 (CV) 1.9~3.3% と良好であった。また、同一試料を 6 日間連続測定を行ったときの日差再現性は、変動係数 (CV) 1.8~3.6% と良好であった。なお、キャリブレーションは初日のみ実施した。

#### 2) 感度試験

0 濃度キャリブレータと低濃度希釈系列で各々 20 回連続測定を行い、その発光量の平均値  $\pm 3SD$  を求め、0 濃度キャリブレータの平均値  $+3SD$  と希釈系列の平均値  $-3SD$  が重ならない最小濃度を検出限界とした。その結果、0.63U/mL と良好であった。

#### 3) 希釈直線性試験

各測定範囲内の 2 濃度の患者血清を専用希釈液で段階希釈したところ、原点を通る直線性が認められた。

#### 4) 干渉試験

市販の干渉チェック・A プラス (シスメックス株式会社) を用いて、3 濃度の患者プール血清を用いて共存物質の影響を検討した。その結果、ビリルビン F 18.1mg/dL, ビリルビン C 19.5mg/dL, 溶血ヘモグロビン 490mg/dL ならびに乳び 2,290 ホルマジン濁度まで測定値への影響は認められなかった。

### 5) 参考基準範囲

肺炎患が認められない健常者 169 例を用いて測定を行い、対数変換後に得られた平均値  $\pm 1.96SD$  による参考基準範囲は 85~371U/mL と従来法と同等の結果であった<sup>5)</sup>。

## 2. 相関性試験

### 1) 従来法との血清相関性試験 (Fig. 1)

患者血清検体 326 例を用いて、相関性試験を実施した。その結果、測定範囲全域で相関係数 0.986、傾き 1.094、y 切片 -6.849 と良好であった。また、健常者領域の 500 U/mL 以下においても、相関係数 0.971、傾き 1.122、y 切片 -24.509 と概ね良好であり、全域および健常者領域ともに従来法測定値との同等性が得られた。

### 2) 血清血漿の相関性試験 (Fig. 2)

本法における血清と血漿との測定値の同等性を検討するため、患者血清・血漿ペア検体 225 例を用いて、相関性試験を実施した結果、測定範囲全域で相関係数 0.997、傾き 0.988、y 切片 -1.211 であった。

### 3. 本法および従来法における KL-6 経過観察比較 (Fig. 3)

経過観察中に病態が改善した患者血清 1 例を用いて、本法および従来法の KL-6 測定値比較を検討したところ、同様の傾向が認められ、本法の KL-6 測定値と従来法の KL-6 測定値の同等性が確認された。

### 4. 各種疾患検体の測定分布 (Fig. 4)

本法における各種疾患における測定値分布を検討したところ、間質性肺炎で測定値が有意に高い結果が得られ、KL-6 は間質性肺炎に特異性が高いことが確認された。

## 考 察

シアロ糖蛋白抗原 KL-6 (Sialylated carbohydrate antigen KL-6; KL-6) は、1985 年に広島大学河野修興らに

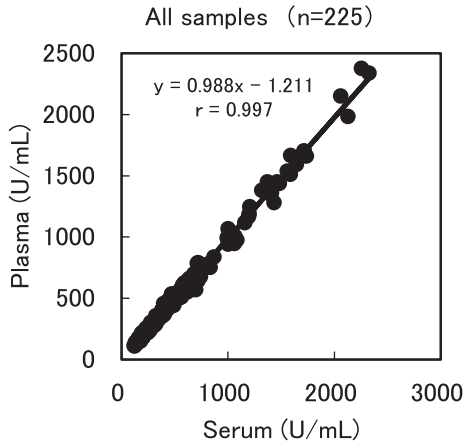


Fig. 2 Comparison of KL-6 levels in sera and plasma measured by the new assay system.

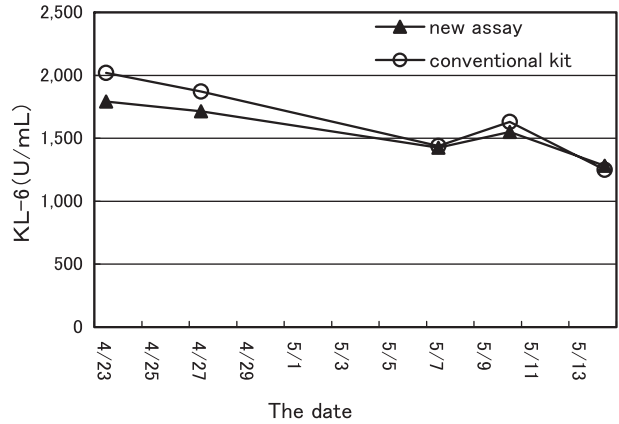


Fig. 3 Comparison of serum KL-6 levels serially measured using both the new and the conventional assay systems in a patient.

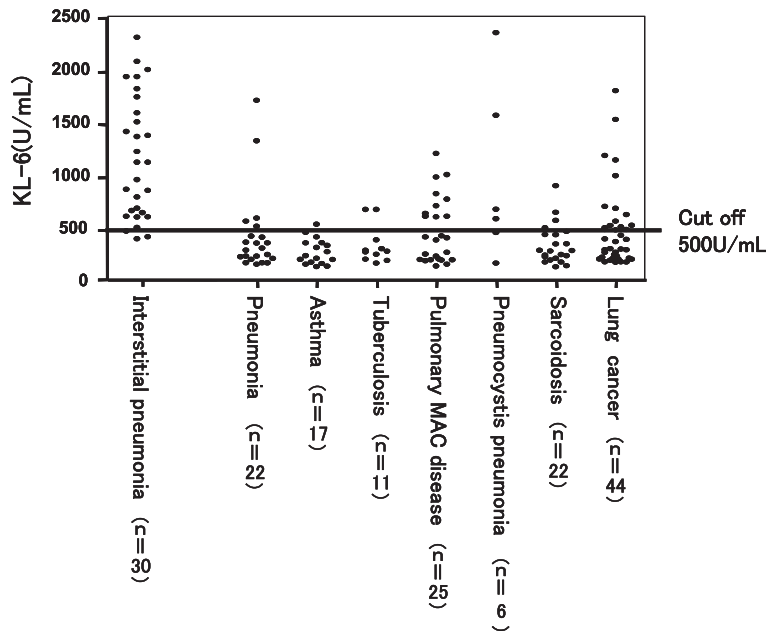


Fig. 4 Serum KL-6 levels in various pulmonary disease measured by the new assay system.

よって開発された抗 KL-6 モノクローナルが認識する肺細胞抗原のクラスター 9 に分類されている MUC-1 に属する膜貫通型ムチンの 1 種である<sup>4)~7)</sup>。通常、KL-6 は I 型肺胞上皮細胞には発現せず、II 型肺胞上皮細胞、呼吸細気管支上皮細胞、気管支腺細胞で正常でも若干発現する分子量 100 万以上の分子である。血清 KL-6 値が間質性肺炎患者において特異的に高値を示し、これは II 型肺胞上皮細胞が過形成により産生が増加し、肺胞上皮—毛細血管バリアの破綻により肺胞被覆液中から容易に血中に移行するためとされる<sup>4)~7)</sup>。これにより間質性肺炎と他疾患との鑑別、間質性肺炎の病態把握（活動期と非

活動期の鑑別）および間質性肺炎の治療経過観察の補助として臨床有用性が認められている<sup>8)~12)</sup>。特に急性増悪時は気胸、肺塞栓、心不全など明らかな他疾患を除外するとともに、KL-6 値の有意な上昇を参考に診断し、早期治療の開始が可能となることから、迅速な KL-6 測定値を得ることが臨床現場で強く要望されていた。

我々は院内に既存の全自動化学発光酵素免疫測定システム「ルミパルス Presto II」に対応した新しい KL-6 測定試薬の検討を実施した。その結果、再現性試験において、同時再現性 CV 1.9~3.3%、日差再現性 CV 1.8~3.6%、感度試験において検出限界感度は 0.63U/mL、希

積直線性試験において原点を通る直線が得られ、干渉試験において影響は認められず、参考基準範囲において従来法と同等の結果が得られ、基礎的な試薬性能は良好であった。また、本法は従来法と同じ抗体を用いているため、従来法との相関性において、相関係数0.986、傾き1.094、y切片-6.849と良好で、SPSSによる有意差検定においても有意確率<0.05で有意に相関しており、本法を用いてもこれまでと同等の測定値を得られ、切り替えるに際しても測定値の継続性が高いことが確認できた。治療経過観察を確認できた1症例における測定値比較においても、従来法との測定値の同等性が得られ、本法が臨床的応用に支障がないことが確認できた。

さらに、各種疾患検体の測定値分布を用いた評価において、測定値が500U/mL以上の症例率は肺炎22.7% (5/22)、喘息5.9% (1/17)、結核18.2% (2/11)、肺MAC症40% (10/25)、ニューモシスチス肺炎66.7% (4/6)、サルコイドーシス13.6% (3/22)、肺癌32.5% (13/40)と比較して、間質性肺炎では80% (24/30)と顕著に高い結果であった。間質性肺炎以外に肺炎、ニューモシスチス肺炎、肺癌など疾患の一部で高い症例が認められたもののSPSSによる有意差検定においてニューモシスチス肺炎 (P 0.414)を除いて有意確率<0.05で有意に相関しており、血清KL-6値が間質性肺炎患者において特異的に高値を示すことが確認でき、臨床適用に十分満足できる結果であった。ニューモシスチス肺炎がKL-6高値を示すことは一般に知られているが、MAC症の40%に500U/mL以上を認めたことは、重症度が比較的高い症例が多く、間質の線維化が影響しているものと思われる。今後症例毎の検討を行っていく予定である。

本法は全自動化学発光酵素免疫測定システムであるルミパルス Presto II を用いることにより、検体前処理を含む測定工程が全自動で行われ、簡便かつ迅速に測定することができる。これまで検査センターなど外部への依頼測定のため、確認までに3日以上必要であったKL-6測定値が、本法を院内導入することにより採血から約1時間で得ることが可能になる。そのため、本法を院内導入することにより、迅速な治療が可能になることから、患者への貢献度は非常に高いと考える。

## 引用文献

- 1) 河野修興, 日和田邦男, 小林 淳, 他. 電気化学発光免疫測定法によるKL-6測定キットED066の間質性肺炎に対する診断能. 臨床と研究 1998;75:217—222.
- 2) 西村 順, 伊藤桂子, 浅井義征, 他. 電気化学発光免疫測定法 (Electrochemiluminescence immunoassay : ECLIA 法) を用いたKL-6測定キットの開発と臨床的評価. 分子呼吸器病 1997;1:382—388.
- 3) 竹川啓史, 老田達雄, 柴田洋子, 他. ECLIA法による血清KL-6値測定の検討および臨床的有用性. 医学検査 2001;50:1384—1387.
- 4) Kohno N, Akiyama M, Kyoizumi S, et al. Detection of soluble tumor-associated antigens in sera and effusions using novel monoclonal antibodies, KL-3 and KL-6, against lung adenocarcinoma. Jpn J Clin Oncol 1988;18:203—216.
- 5) Stahel RA, Gilks WR, Lehmann H-P, et al. Third international workshop on lung tumor and differentiation antigens: overview of the results of the central data analysis. Int J Cancer Suppl 1994;8:6—26.
- 6) 河野修興. KL-6. 呼吸 1997;16:391—398.
- 7) Hilken J, Ligtenberg MJL, Vos HL, et al. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. Trends Biochem Sci 1992;17:359—363.
- 8) Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, et al. New serum indicator of interstitial pneumonitis activity: sialylated carbohydrate antigen KL-6. Chest 1989;96:68—73.
- 9) Hamada H, Kohno N, Akiyama M, et al. Monitoring of serum KL-6 antigen in a patient with radiation pneumonia. Chest 1992;101:858—860.
- 10) 河野修興. 臨床におけるKL-6の使い方. 日本内科学会雑誌 2007;95:1858—1862.
- 11) 大成洋二郎, 横山洋二郎, 河野修興. 間質性肺炎と血清マーカー. 呼吸 2005;24:308—313.
- 12) Kohno N, Inoue Y, Hamada H, et al. Difference in sero-diagnostic values among KL-6-associated mucins classified as cluster 9. Int J Cancer Suppl 1994;8:81—83.

**Abstract****Evaluation of KL-6 CLEIA Reagent**

Kozo Morimoto, Rie Ishikawa, Atsuko Moriya, Aiko Masunaga, Hiroyuki Kamiya,  
Tsunehiro Ando, Souichiro Ikushima and Masaru Oritsu  
Department of Respiratory Medicine, Japanese Red Cross Medical Center

KL-6 is a high-molecular-weight sialylated glycoprotein, classified as a cluster 9 pulmonary cell antigens, and is a sensitive marker for the clinical diagnosis of interstitial pneumonia and its activity, especially in the acute phase. Additionally, it is necessary to diagnosis that patient was not pneumothirax, pulmonary thromboembolism and heart failure. In this study, we evaluated a new assay system based on chemiluminescence EIA (CLEIA) on a fully automated analyzer. Both plasma and serum samples were used, and the master calibration method was applied, eliminating the need for a standard curve preparation. The assay time was shortened to less than 1 hour. Good correlations were observed between this assay and conventional assay kits,  $y = 1.094x - 6.849$ ,  $r = 0.986$  using 326 samples, and between serum and plasma  $y = 0.997x - 1.211$ ,  $r = 0.997$  using 225 paired samples. In addition, the alteration of KL-6 concentration in patients undergoing chemotherapy treatment resulted in similar results that with conventional kits, and elevated KL-6 concentrations were observed in samples from patients with interstitial pneumonia. These results underscore the usefulness of this new assay kit as a rapid test, particularly for the medical examination of outpatients and the treatment of emergency cases in the acute phase of interstitial pneumonia.