

〈特集：検査機器・試薬・技術の新たな展開（第26回年次学術集会より）〉

これからの新しい免疫検査のかたち

山本 裕貴

Future vision for Immunoassay

Yuki Yamamoto

Summary Wako Pure Chemical Industries, Ltd. has launched fully automated chemiluminescent Enzyme Immunoanalyzer “Accuraseed[®]”. Since measurement time of Accuraseed[®] is 10 minutes for all parameters, the test result can be provided to doctors at the same timing of general clinical chemistry analyzer. Measurement principle of Accuraseed[®] is chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA). The throughput is 180 tests/h and a maximum number of simultaneous random-access is 24 parameters. New technologies of MAGRAPID[®] and high sensitive luminol derivative L-012 achieved high throughput, high sensitivity and smaller sample volume. Accuraseed[®] has characteristic parameters such as hypertension marker of active renin concentration, aldosterone and cortisol, and additional parameters are currently under development. Reduced reporting time for active renin concentration and aldosterone will accelerate in-hospital measurement of those parameters. We believe Accuraseed[®] can become a new benchmark of automated Immunoanalyzer to support medical examination.

Key words: Immunoanalyzer、High throughput、High blood pressure、ARC、PRA、Aldosterone、Cortisol、Accuraseed[®]

I. はじめに

検体検査結果の迅速報告は、患者の待ち時間短縮につながり、サービスの向上に大きく貢献する。現状、生化学検査では迅速な測定結果報告が行われているが、免疫検査はその測定時間の長さや処理能力の低さから、迅速測定結果報告のボトルネックとなっていた。和光純薬工業株式会社では、生化学検査と同等の処理時間となる全項目約10分の免疫測定を実現する自動化

学発光酵素免疫分析装置Accuraseed[®]を発売した。その特徴とメリットについて紹介する。

II. 現在の検体検査分析装置へのニーズ

現在の進化する臨床現場からの希望に応えるには、迅速検査体制の構築や徹底した精度管理などにより、患者サービスの向上に取り組んで行くことが重要である。検査を行ったその日のうちに、検査結果を見ながら問診を受けること

和光純薬工業株式会社
臨床検査薬事業部
臨床検査薬営業本部 営業推進部
〒540-8605 大阪市中央区道修町3-1-2

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Promotional Support Department Diagnostic Sales
Operations Diagnostics Division
1-2 Doshomachi 3-Chome, chuo-ku, Osaka 540-8605,
Japan

ができる診療前検査も普及してきている。こうした患者サービスの向上を支援するツールとして自動分析装置も進化を遂げ、データの信頼性はもちろんのこと、迅速化、簡便化が求められている。Accuraseed[®]は、これらのニーズに応え、今後の検体検査の発展も視野に入れて開発された分析装置である。

Ⅲ. Accuraseed[®]の特徴

Accuraseed[®]は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)を測定原理とする、処理能力180テスト/時間、最大同時24項目ランダムアクセス測定が可能な自動分析装置である(図1)。3つの特徴を以下に紹介する(図2)。



図1 自動化学発光酵素免疫分析装置
Accuraseed[®]

1. 全項目約10分の迅速測定

最大の特徴は、全項目測定時間約10分の迅速測定である。測定方法は化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)を採用している。固相として用いる磁性粒子表面にあらかじめ抗体を結合させ、検体中の測定対象を特異的に反応させた後、洗浄を複数回行い他の不純物を除去する。固相上の抗体と反応した抗原と酵素標識抗体を反応させ、再び洗浄を行い遊離酵素標識抗体を除去する。この時、固相上にサンドイッチ状の複合体が残るが、この複合体の酵素標識抗体の活性を、化学発光試薬を用いて測定することにより、測定対象の濃度を求める(図3)。

迅速な測定を実現するため、免疫反応に用いる固相粒子として理想的な磁性粒子「マグラピッド[®]」を三洋化成工業株式会社と共同開発した。この磁性粒子は、高い磁気応答性と素早い分散性という、両立し難い性能を併せ持つ直径約2 μ mの磁性粒子である。免疫反応を迅速かつ感度良く行うためには抗体が多く必要である。固相の粒子径が小さいほど表面積が大きくなるため反応に関わる抗体量が多くなるが、粒子径が小さいと集磁時間も長くなり、分散性も悪くなるのが一般的である。つまり、迅速かつ高感度に測定を行うためには、粒子径が小さくても集磁速度が速く、分散性の高い粒子が最適

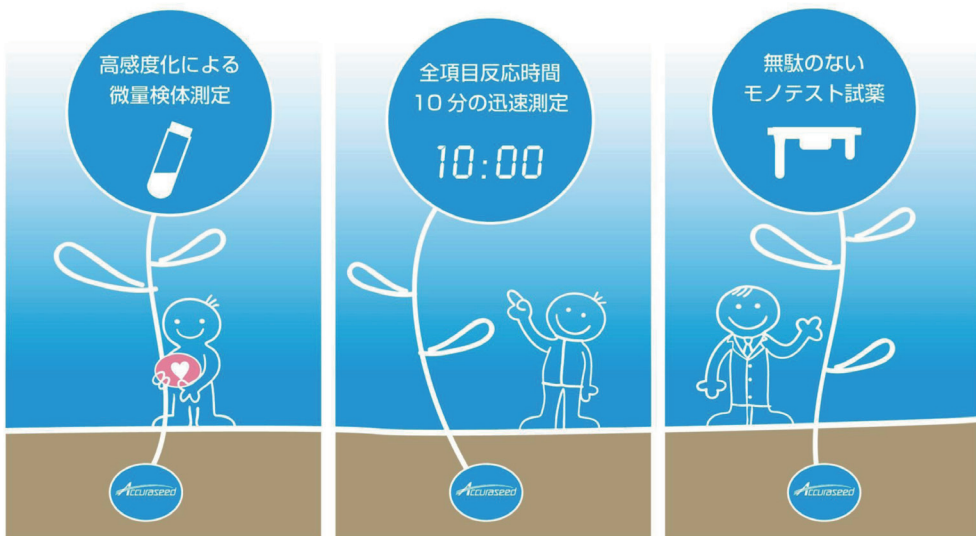


図2 Accuraseed[®] 3つの特徴

ということになる。マグラピッド®は集磁と分散の迅速性により、高い洗浄効率を得ることができた。相反する特性を持つ秘密は、粒子の内部構造にある。

磁性粒子は、高分子化合物の中に金属が分散

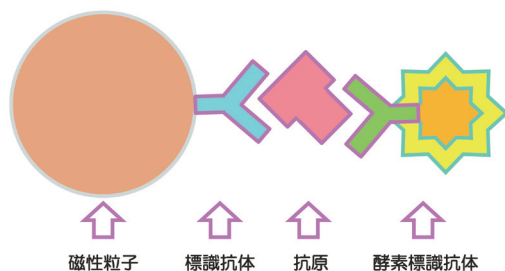


図3 測定原理 (CLEIA法)

している構造になっている。金属粒子が小さいと集磁時間が長くなり、大きいと集まりは早くなるが、粒子自体が磁力を帯びることで粒子同士が磁力で引き合い、分散性が悪くなる。マグラピッド®は、微細な金属粒子を高密度に含む内部構造になっている。このような構造では金属を多く含むために、集磁が速く、かつ、ひとつひとつの金属が小さいため磁力を帯びず、分散性が高くなる (図4)。

マグラピッド®の集磁と分散は、従来の磁性粒子と比較しても格段に早く、これが迅速かつ正確な反応を可能にした大きなポイントである (図5)。

2. 高感度化による微量検体測定

Accuraseed®では、発光反応にPOD-ルミノー



図4 一般的な磁性粒子とマグラピッド®の集磁、分散時間の比較

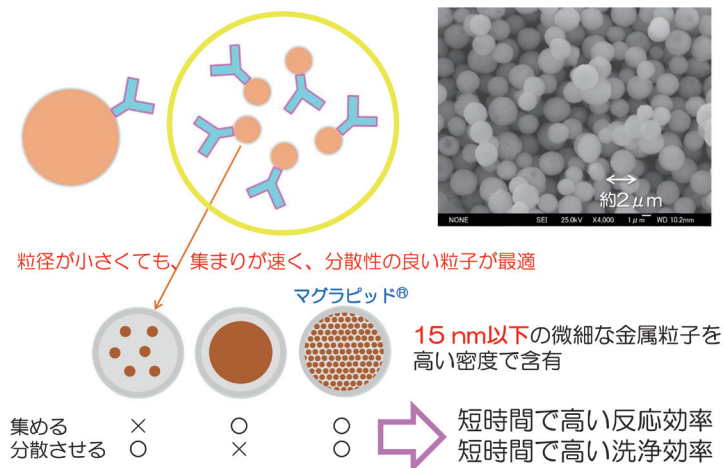


図5 磁性粒子 マグラビッド®

ル系を用いている。通常の項目ではSphereLight Wakoでも使用している従来の発光物質ルミノールを使用している。一方、活性型レニン濃度 (ARC) のような感度を必要とする項目のキーマテリアルが、ルミノールの高感度化誘導体であるL-012である。ルミノールと比較し、低濃度域で1.5倍程度、高濃度域で2倍以上の発光強度が得られている。これにより、短時間かつ少ない検体量で十分な感度を得ることが可能になった。項目の特性に合わせて発光物質を使い分けている (図6)。

反応条件の最適化による高感度化に伴い、検

体使用量の減量も可能となった。甲状腺3項目 (TSH、FT3、FT4) での検体量はSphereLight Wakoの100 μL (デッドボリュームを除く) に対し55 μLとなり、大幅な減量に成功した。検体採取量の少ない小児検体などにおける免疫項目の測定に貢献できるのではないかと期待されている¹⁾。

測定性能は広範囲で高精度である (図7)。TSHではn=20の同時再現性はL (低濃度)、M (中濃度)、H (高濃度) の3濃度ですべて1%台であり、低濃度から高濃度まで良好な結果となっている。

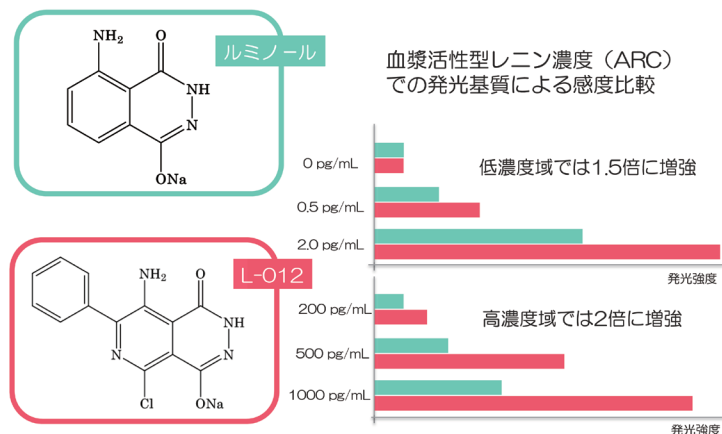


図6 発光物質ルミノールとルミノール高感度化誘導体L-012

	L	M	H	
n	20	20	20	
mean	0.397	4.804	30.303	($\mu\text{IU/mL}$)
Range	0.021	0.198	1.618	
SD	0.005	0.051	0.466	
C.V.	1.3%	1.1%	1.5%	

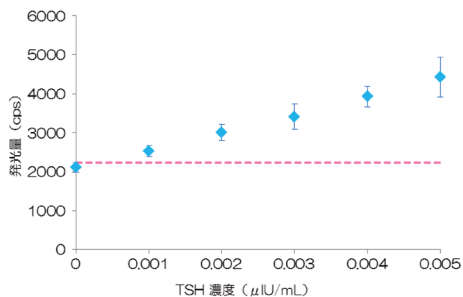


図7 TSH 同時再現性、最小検出感度

0 ~ 0.005 $\mu\text{IU/mL}$ に調整をした各試液 (n=10) の発光量のmean-2SDが、0濃度の発光量のmean+2SDと重ならない最小の濃度は0.001 $\mu\text{IU/mL}$ であり、少ない検体量、短時間測定でありながら高感度、高精度を実現した。なお、最小検出感度は0.005 $\mu\text{IU/mL}$ としている。

3. 無駄のないモノテスト試薬

使いやすさを追求し、測定に必要な試薬が1つに封入されたモノテスト方式とした(図8)。B/F分離液以外の5種類の試薬(抗体結合粒子、免疫反応緩衝液、酵素標識抗体、発光試薬、過酸化水素液)を1つのカートリッジに封入している。試薬保冷庫を有した装置にカセットを架設後、測定ごとに1カートリッジずつ自動開封するため、試薬開封後の期限を気にせず有効期限まで使用することができる。

カートリッジはR0からR4の4つのセルに分けられ、それぞれのセルに反応に必要な試薬を封入している(R0:抗体結合粒子、R1:免疫反応緩衝液、R2:酵素標識抗体、R3:発光試薬、R4:過酸化水素液)。R0には固相となる磁性粒子マグラピッド®が入っており、そこへ検体とR1の免疫反応緩衝液を入れ、反応をスタートさせる。

R0槽は反応槽の役割をする。この反応槽の楕円形が、反応液や洗浄液を効率よく対流させ、液の吐出のみで磁性粒子を完全に分散させてい

る。免疫測定を行うための最適な磁性粒子と、それを最大限に活かす装置設計がなされている。これらの技術の集約により、約10分間での高感度、高精度測定が可能になった。

IV. ユーザービリティ

1. 消耗品

測定に必要なものは試薬カセット、チップラック、B/F分離液の3点のみである。

1) 試薬は調製の必要がなく、カセットごと装置にセットするだけである。試薬カセットにはロット番号、試薬有効期限等の試薬情報が登録されたQRコードがついており、装置で読み取った後、保冷庫にセットし使用する(図9)。基本検量線シートのQRコードを装置で読み取り、基本検量線、試薬ロット、有効期限を登録する。マスターカーブ方式の採用により、キャリブレーションを行うのは2ポイント(濃度)である。1カセットには20テスト分のカートリッジが入っており、3カセット(60テスト)で1つの包装形態としている。

2) 検体サンプリングは検体間のコンタミネ

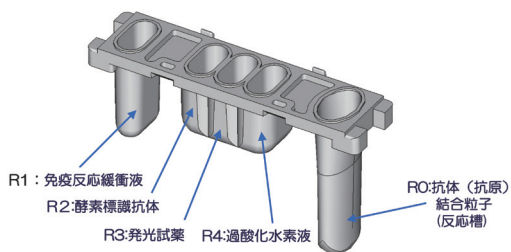


図8 モノテストタイプの試薬



図9 試薬カセット

ーションを防止するため、ディスプレイサブルチップを使用し、テスト毎に1本使用する（図10）。チップは1ラックに70本入りで、4ラック（計280本）を機械内に架設することができる。

3) B/F分離液は装置下部に格納し、最大2つ架設可能である。1つ目のB/F分離液がなくなると自動的に2つ目のB/F分離液に切り替わる。

これら3つの消耗品は、測定中にいつでも交換、追加が可能で、消耗品追加時の処理能力の低下は最小限に抑えられている。また、機械内部にあるチップ、試薬カートリッジの廃棄箱は、取り出し時に廃棄箱上面にカバーが引き出る仕組みとなっている。そのため、測定中に廃棄箱満タンとなった場合も、測定を止めることなくチップ、試薬カートリッジの廃棄が行える。

2. 操作画面

17インチのカラーの液晶に、タッチパネルで操作をする。メイン画面には使用頻度の高い「測定依頼」や「測定結果」などを並べ、ワンタッチで表示できるGUIになっている。また、リアルタイムに試薬・消耗品の状態が一目で分かるようになっており、交換、追加が必要な部分は黄色や赤色に変わり、見逃さない工夫がなされている。

V. 特徴ある測定項目

甲状腺関連項目（TSH、FT3、FT4）、腫瘍マーカー項目（AFP、CEA、CA19-9、PSA）、心筋マーカー項目（NT-proBNP、トロポニンT）、ホルモン（C-ペプチド、インスリン）をラインナップ。さらに高血圧マーカー（活性型レニン濃度（ARC）、アルドステロン、コルチゾール）という特徴的な項目をそろえている（表1）。現在、その他腫瘍マーカーや感染症等、14項目を開発中である。

1. 高血圧におけるレニン、アルドステロン、コルチゾール測定について

本邦における2010年の高血圧有病者数は約4300万人（男性2300万人、女性2000万人）と試算された^{2),3)}。高血圧は心臓や血管、さらに他臓器にも障害をきたし、心肥大・脳卒中・心不全・冠動脈疾患（狭心症、心筋梗塞）・腎不全等、様々な疾患の発生原因となる。高血圧患者のう



図10 検体サンプリング用チップ

表1 測定項目一覧

高血圧	レニン、アルドステロン
ホルモン	コルチゾール、C-ペプチド、インスリン
甲状腺	FT3、FT4、TSH
循環器	NT-proBNP、トロポニンT
腫瘍マーカー	AFP、CEA、CA19-9、PSA

ち、二次性高血圧の患者が約1割程度存在し^{4),5)}、治療によっては根治可能な原発性アルドステロン症患者も含まれる。この原発性アルドステロン症のスクリーニングや病型分類で測定されるのがレニン、アルドステロン、コルチゾールである。

原発性アルドステロン症のスクリーニングとして、ARR（アルドステロン/レニン）の値を用いることが高血圧ガイドラインで推奨されている（図11）。また、治療方針決定の為の病型分類ではコルチゾールとアルドステロンを測定する⁶⁾。

2. レニン活性と活性型レニン濃度

レニン測定にはレニン活性（PRA）と活性型レニン濃度（ARC）の2種類がある。従来主に測定されてきたレニン活性（PRA）は、アンギオテンシノーゲンからレニンによって生成されるアンギオテンシンIの量を測定し間接的にレニンの量を算出していた。一方、活性型レニン濃度（ARC）はレニンの活性部位を認識し、直接レニン蛋白量を測定している（図12）。

Accuraseed[®]で測定するレニンは、活性型レニン濃度（ARC）である。今までのレニン濃

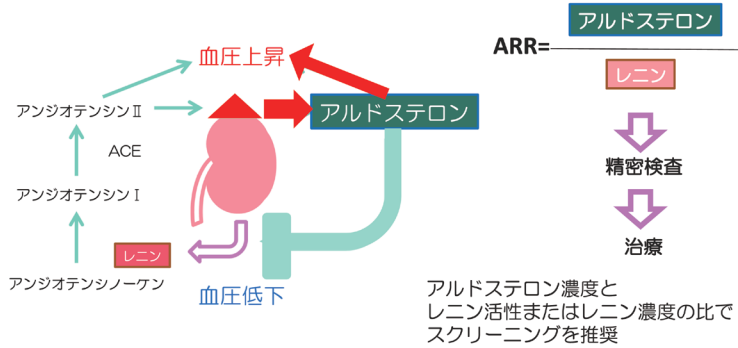


図11 原発性アルドステロン症 スクリーニング

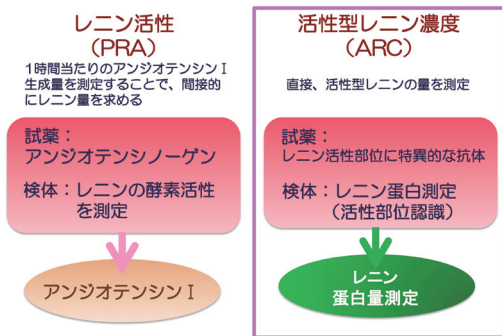


図12 活性型レニン濃度 (ARC) とレニン活性 (PRA)

度測定では見ることのできなかつた低値での測定が可能になった (表2)。

Accuraseed®は高血圧マーカー (活性型レニン濃度、アルドステロン、コルチゾール) を1台で測定できる初めての全自動測定装置である。従来、用手法・RIA法で測定していた活性型レニン濃度、アルドステロン測定を自動化・NonRIA化することにも成功した。これにより、外注から院内測定が可能となった。測定時間も短くなることから、診療前検査として利用でき、

表2 活性型レニン濃度 (ARC) とレニン活性 (PRA) 比較

	血漿活性型レニン濃度 (ARC : Active Renin Concentration)		血漿レニン活性 (PRA : Plasma Renin Activity)
測定対象	活性型レニンの濃度		レニン活性 (1時間あたりに産生される アンジオテンシン I の量)
単位	pg/mL		ng/mL/Hr
正常値下限	2.5 pg/mL		0.3 ng/mL/Hr
測定方法	RIA	CLEIA	RIA
測定時間	3時間以上	10分	2日間
検体量	200 μL	25 μL	25 μL
測定範囲	5~500 pg/mL	0.5~500 pg/mL	0.2~40 ng/mL/Hr
有効期間	8週間	12ヶ月	6週間
診療報酬	111点		103点

かつ高感度・高精度な検査方法として高血圧診断・治療に貢献できると考えられる。

VI. おわりに

Accuraseed[®]は従来の免疫自動分析装置では実現できなかった10分間の迅速測定を可能にした。生化学検査と同等の結果報告が可能となり、待ち時間が軽減されることにより、患者サービスの向上につながると考えられる。また、活性型レニン濃度 (ARC)、アルドステロンといった特色ある項目も加えられた。高血圧マーカーとして新たな診断、治療に貢献できると期待している。

Accuraseed[®]がこれからの新しい免疫検査のかたちとして診療支援につながれば幸いである。

【参考文献】

- 1) 井上直哉、畑伸顕、小杉暉恵、他. 自動化学発光酵素免疫分析装置AccuraseedによるTSH、FT3およびFT4測定試薬の基本性能評価. 医療と検査機器・試薬, 39 : 271-279, 2016.
- 2) 三浦克之 (研究代表者)、他. 厚生労働省科学研究費補助金循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業「2010年国民健康栄養調査対象者の追跡開始 (NIPPON DATA2010) とNIPPON DATA80 / 90の追跡継続に関する研究」平成24年度総括・分担研究報告書、2013.
- 3) Miura K, Nagai M, Ohkubo T. Epidemiology of hypertension in Japan. *Circ J*, 77 : 2226-2231, 2013.
- 4) Sinclair AM, Isles CG, Brown I, Cameron H, Murray GD, Robertson JW. Secondary hypertension in a blood pressure clinic. *Arch Intern Med*, 147 : 1289-1293, 1987.
- 5) Anderson GH Jr, Blakeman N, Streeten DH. The effect of age on prevalence of secondary forms of hypertension in 4429 consecutively referred patients. *J Hypertens*, 12 : 609-615, 1994.
- 6) 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会 編; 島本和明 他: 高血圧治療ガイドライン 2014, 121-122, 日本高血圧学会, 東京 (2014).