

〈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）〉

化学発光酵素免疫測定法を原理とした 新システム「AIA[®]-CLシステム」について

丸尾 直子

Introduction of a new fully automated chemiluminescence enzyme immunoassay system called “AIA-CL[®] system”

Naoko Maruo

Summary This advanced chemiluminescence enzyme immunoassay system, AIA-CL[®] system, has been developed with an innovative chemiluminescent substrate DIFURAT[®] for use on a large model analyzer, AIA-CL2400, with single-use lyophilized reagents designated as the CL AIA-PACK[®]. DIFURAT has high thermal stability, even in an aqueous solution, and enables sensitive measurement on the AIA-CL2400. Using DIFURAT and magnetic microparticles as immunoassay carriers, a more rapid and more sensitive assay for TSH has been constructed with less volume of specimen required as compared to the current AIA assay. Moreover, it has been confirmed that both TRAb and BNP assays on the AIA-CL2400 have better performance and therefore improve the clinical utility. The adjuster set and sample diluting reagent are supplied as a unique stable single-use lyophilized cup. These lyophilized cups are automatically reconstituted on the analyzer and free from operational errors. The AIA-CL system will provide a more useful and easy-to-use testing system for clinical laboratories.

Key words: DIFURAT, CLEIA, AIA-CL, CL AIA-PACK, Lyophilized cup

I. はじめに

近年、超高齢社会にともない病院やクリニックの外来患者数が増加しており、検査の感度、精度はもちろんのこと、迅速性や検体量低減、経済性など検査室へ多種多様な要望がよせられている。迅速検査というと、かつては心疾患など緊急性の高い疾患の入院判断や術中検査、負荷試験などが対象としてあげられていた。しかし、現在では外来迅速検体検査加算導入もあって、ホルモン検査や腫瘍マーカー検査にも迅速性が求められてきている。自動測定装置の進歩

に伴う検査時間の短縮化は、多くの施設で院内診療前検査を可能にし、患者が検査結果を持って医師の問診を受けることが可能となった。実際に、各種検査結果報告までのおおよその所要時間を患者向けに案内している施設も見られる。

また、臨床現場では、デッドボリュームを含めて0.3 mL程度で複数項目の測定ができることが要望されている。従って必要検体量の低減も大きな課題である。

さらに、測定項目によっては、専門外来のある日に検体数が増えるなど、検体数が曜日によって変動することがあるが、必要時に必要数だ

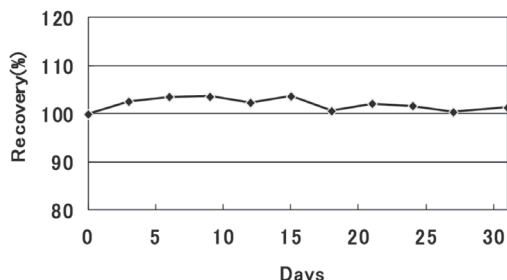
け試薬を消費できるシステムは、オーダー数の変動に対して対応しやすく、コストの低減にも寄与できる可能性がある。

東ソー（株）は、1988年に、モノテスト包装凍結乾燥試薬を用いる全自動酵素免疫測定装置AIA®-1200と専用試薬Eテスト「TOSOH」®試薬を上市し、以来装置については処理能力を増やした大型機、デスクトップ型中型機、狭い検査スペースに対応する小型機をラインアップするとともに、試薬項目ラインアップを拡充してきた。現在使用されているEテスト「TOSOH」® II試薬はモノテスト包装で、反応に必要な成分が1つのカップ内に凍結乾燥状態で封入されており、使用直前まで溶解されないため、比較的試薬が安定で分注誤差が生じにくい仕様であった。ただし、使用している標識用酵素アルカリ性ホスファターゼの検出に蛍光基質（4-メチルウンベリフェリルリン酸）を用いていたこと、及び1ステップ型の反応原理であったところから、測定範囲が狭い、感度が化学発光法に及ばない項目があるなどの課題があった。

このたび、モノテスト凍結乾燥試薬の形は継承したうえで、検出方法を蛍光法から化学発光法とし、磁性微粒子を用い、多くの項目で2ステップ法を採用した試薬を搭載できるAIA®-CLシステムが新たに開発され、感度、精度、迅速性の向上と、測定範囲の拡大や使用検体量の低減をはかることが可能となった。さらに、使いやすさ、経済性なども考慮した設計を行ったので、以下報告する。

II. AIA-CL システムについて

AIA-CLシステムは化学発光酵素免疫測定法



を原理としており、標識酵素としては従来のAIAシステムと同様にアルカリ性ホスファターゼを使用している。今回、アルカリ性ホスファターゼを検出する新しい化学発光基質として、安定性の高いジオキセタン化合物であるDIFURAT®（3-(5-tert-ブチル-4,4-ジメチル-2,6,7-トリオキサビシクロ [3,2,0] ヘプト-1-イル)フェニルリン酸エステル ジナトリウム塩）が開発された。DIFURAT®の構造式とアルカリ性ホスファターゼによる分解反応を図1に示す。

ジオキセタン構造はゆがんだ四員環であり、O-O結合がねじれて切れやすいため安定性の維持が難しい。DIFURATは、ジオキセタンにフラン環を導入し、加えて、かさ高い置換基の立体反発を利用することで、ねじれを緩和し構造を安定に保つことが可能となっており^{1),2)}、結果として溶液での供給が可能となった。溶液での安定性を40°Cの加速劣化試験と10°Cでの長期安定性試験で確認したところ、図2に示すように40°Cで30日間、10°Cで12ヶ月間まで安定であることが確認された。さらに発光条件の最適化を行うことで、市販発光基質と比較して発光

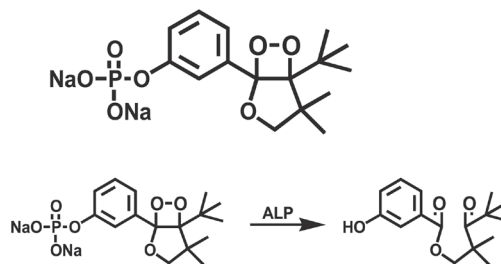


図1 DIFURAT構造式（上）とアルカリ性ホスファターゼ(ALP)による基質分解反応（下）

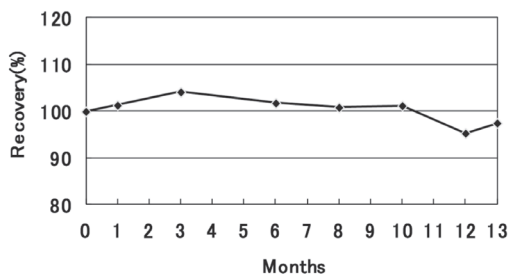


図2 DIFURATの40°Cにおける安定性（左）と10°Cにおける長期安定性結果（右）

効率を高くすることが可能となった³⁾。

AIA-CLシステムの大型機種である全自動化学発光酵素免疫測定装置AIA[®]-CL2400(図3)は、最大240テスト/時の処理能力を有している。試薬及び基質の保冷機能、分注水及び洗浄水の自動調製機能を有しており、分注水、洗浄水は濃縮液を装置内に設置すれば装置内で分注水、洗浄水が自動調製されるため、工数削減とともに、一定品質の分注水、洗浄水を装置に供給することができるという利点がある。基質のバックグラウンド測定及び分注水、洗浄水の品質確認は日常点検時に行うが、この日常点検は予約実行が可能であり、測定が少ない時間帯に予約することで効率的に終了させることができる。

本システムの測定モードとして、2ステップ法(第一反応5分、第二反応3分)、ディレイ1ステップ法(第一反応6分、第二反応3分)、およびこれらの第一反応が15分(ディレイ1ステップ法では16分)に延長されるロング法が搭載さ



図3 全自動化学発光酵素免疫測定装置
AIA-CL2400

れている。

測定に用いる専用の反応試薬については、2つのセルからなるマイクロツインカップを用いた新たな試薬形態を採用している。図4にAIA-パックCL[®]TSHの測定原理図を示す。反応試薬の試薬カップには2つのセル(セル(1)、セル(2))があり、セル(1)には磁性微粒子に固定化された抗TSHマウスモノクローナル抗体を含む凍結乾燥体が、セル(2)には酵素としてアルカリ性ホスファターゼが標識された抗TSHマウスモノクローナル抗体の凍結乾燥体が封入されており、封入シールにはQRコードが印刷されている。試薬カップのセル(1)に分注水と検体を、セル(2)には分注水を加え、それぞれ凍結乾燥試薬を溶解し、検体が注入されたセル(1)においては凍結乾燥試薬が溶解すると同時に第一反応が開始する。一定時間、一定温度でインキュベートした後、洗浄水で洗浄することにより、未反応の検体成分を除去する(B/F分離)。B/F分離後、セル(2)の内容物を一定量、セル(1)に移すことにより第二反応が開始し、一定時間、一定温度でインキュベートした後、洗浄水で洗浄することにより、未反応の酵素標識抗体を除去する(B/F分離)。B/F分離後、磁性微粒子に結合した酵素活性を測定するために基質としてDIFURATを添加し、酵素による分解で得られる発光強度を測定することにより、検体中のTSH濃度を算出する。反応固相に磁性微粒子を用いたため抗原抗体反応の速度が上昇しており、AIA-パックCL TSHの場合、第一反応5分、第二反応3分で測定可能十分量の抗原抗体複合物が生成される。アルカリ性ホスファターゼ反応による基質分解で生成する発光測定は4分であり、B/F分離時間を含め測定開始からの

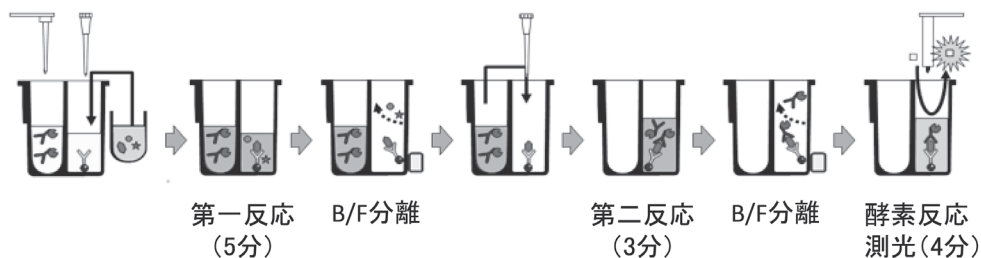


図4 AIA-パックCL TSH 測定原理図

結果報告時間は15分となっている。

本装置はマスターキャリブレーション対応である。測定者は校正試薬を用いてマスターカーブを補正し、検量線を作成する。AIA-パックCL TSHの場合、校正試薬セットは2濃度からなり、校正有効期間は90日となっている。校正試薬も凍結乾燥カップ形状になっており、反応試薬といっしょに装置の試薬ソーター内にセットすることができる。校正実施時には、装置内で必要量の校正試薬が分注水により溶解され校正溶液となり使用される。検体希釈試薬も同様に、検体希釈に必要な成分がマイクロツインカップ内に凍結乾燥体で封入されており、必要時に分注水で溶解されて装置内で検体希釈液が調製される。続いて、あらかじめ設定された希釈倍率に従って必要量の検体が分注され、希釈検体が装置内にて調製される。検体希釈試薬は複数項目で共通の設計となっており、希釈倍率としては4～625倍の間で設定が可能である。このような校正試薬、検体希釈試薬の装置内自動調製は、手作業による誤調製、取り違えなどの人為的ミスを防ぐことができ、また必要量だけを調製するため試薬のムダを少なくすることができる。凍結乾燥試薬形態での校正試薬、検体希釈試薬は、溶液の蒸発やコンタミネーションの不安がなく、未開封であれば13ヶ月、開封後装置に設置してからも180日間使用可能と安定性に優れている。さらに、校正試薬と検体希釈試薬はどちらも分割トレイを採用しており、共通トレイ上に異なる項目の校正試薬や検体希釈試薬の試薬ストリップを組み合わせて設置することが可能であり、試薬ソーター内の試薬設置スペースを減らす工夫がなされている。

反応試薬、校正試薬、検体希釈試薬は試薬トレイだけでなく、試薬ストリップ及び個々のカップのシールにもQRコードが印刷されており、装置上の各カップの位置認識に役立つだけでなく、項目名やロット、有効期限、オンボード日数などの情報を使用前にコントローラー画面上で確認することが可能である。さらに、測定後のデータから、測定に用いた試薬ロットなどの情報をレビューすることも可能であり、トレーサビリティを確保した設計となっている。

Ⅲ. 試薬性能の紹介

AIA-パックCL試薬項目の中から、以下の3項目について性能を紹介する。

1. TSH（甲状腺刺激ホルモン）

AIA-パックCL TSHは必要検体量50 μ L、結果報告時間15分の測定試薬であり、基本性能についてはすでに既報にて報告されている^{4),5)}。社内で取得したプレジジョンプロファイルを図5に示すが、CV 20%を与える濃度は、従来試薬Eテスト「TOSOH」II (TSH) で0.0080 μ IU/mL、今回開発されたAIA-パックCL TSHでは0.0023 μ IU/mLとなり、両者とも第三世代の感度を有していたが、AIA-パックCL TSHはさらに高感度化されていることが示された。また、AIA-パックCL 試薬においては、TSH、FT3（検体必要量20 μ L）、FT4（検体必要量5 μ L）の3項目を測定するのに必要な総検体量は75 μ Lであり、従来試薬Eテスト「TOSOH」II (TSH) の1項目分の必要検体量（100 μ L）を下回ることが可能となった。高齢者や乳幼児患者の検査においては、採血が容易でなく十分な検体量が確保できないことはよく経験されることであり、検体量の低減は臨床現場で有益であると考えられる。

甲状腺疾患別のTSH濃度分布図を図6に示す。健常人（n=25）に比べ甲状腺機能低下症（n=30）ではTSHが上昇しており、他方甲状腺中毒症であるバセドウ病（未治療）（n=26）及び無痛性甲状腺炎（n=22）、亜急性甲状腺炎（n=21）では値が低下していることが確認された。さらに、

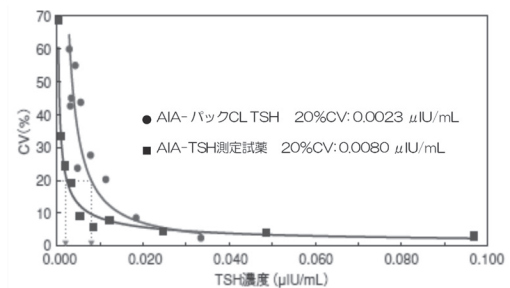


図5 AIA-パックCL TSH 定量限界

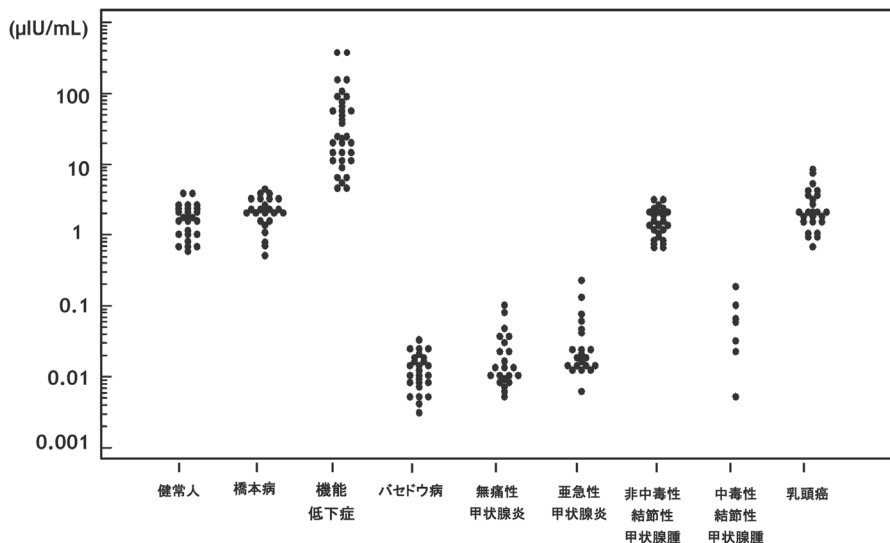


図6 健常人及び各種甲状腺疾患におけるTSH値

今回検討症例数は少ないものの、破壊性甲状腺炎に比べてバセドウ病ではTSHの値がより低い傾向が認められた。森田らの報告⁶⁾において、破壊性甲状腺炎における測定感度以上のTSH測定値の割合がバセドウ病の場合より著しく高いことが示されており、この理由として、破壊性甲状腺炎ではバセドウ病に比べ、急激なホルモン増加に対する下垂体の反応が遅れTSH抑制が不完全であるとの考察がなされている。他方、現在市販されているTSH測定試薬6キットを評価した報告⁷⁾では、バセドウ病、亜急性甲状腺炎、無痛性甲状腺炎の間でTSH値分布に明確な傾向が認められず、甲状腺中毒症の鑑別診断の補助としてTSHの抑制の程度を用いることは困難であると報告されている。AIA-パックCL TSHで得られた結果は、症例数こそ少ないが、森田らの報告と同様にバセドウ病に比べ破壊性甲状腺炎のTSH値が高い分布傾向となっており、測定法の感度が向上したことにより破壊性甲状腺炎のTSHを精度よく測定できた結果、バセドウ病との測定値分布の違いが生じた可能性が考えられた。この点については今後症例数を増やした詳細検討が必要と考える。

2. TRAb (抗TSHレセプター抗体)

AIA-パックCL[®] TRAbは検体量40μL、結果報告時間25分（第一反応15分、第二反応3分の

ロング法を採用)の測定試薬であり、抗TSHレセプターヒトモノクローナル抗体(M22)を用いた2ステップ競合法を測定原理としている。本試薬の基本性能については、AIA-パックCL[®] TPOAb、AIA-パックCL[®] TgAbとともに既報にて報告されている⁸⁾。測定に必要なTSHレセプターは、磁性微粒子に固定化されマイクロツインカップ内に凍結乾燥状態で封入されており、測定直前まで溶解されないため安定である。そのため、本試薬においても較正有効期間を90日とすることが可能となった。

甲状腺疾患別のTRAb測定結果を図7に示す。甲状腺ホルモン正常、エコー正常である健常人94例ではすべて値が0.9 IU/L未満であったが、バセドウ病では高値を呈しており、鑑別診断におけるTRAbの有用性が示された。また、バセドウ病77例と無痛性甲状腺炎22例の鑑別につきROC分析を行ったところ、TRAb 0.7 IU/Lにおいて感度100%、特異度95.5%で最も高い診断効率を示し、特異度100%となる値はTRAb 1.2 IU/L(感度94.8%)であった。ただし、今回の検討における症例数が少ないことから、カットオフ値については今後さらに症例数を増やした研究の成果で決められるべきであると考えられる。

日本甲状腺学会が作成している甲状腺疾患診断ガイドラインの中に「バセドウ病の診断ガイドライン」があり、この中の検査所見の項にお

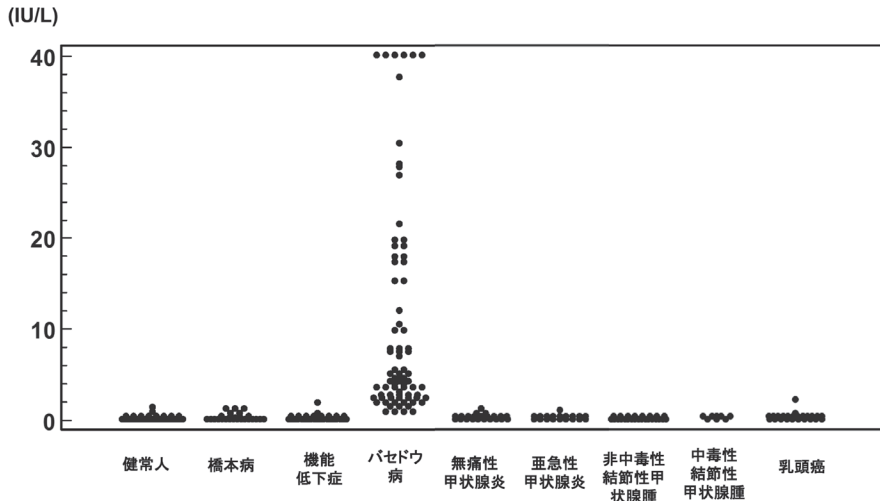


図7 健常人及び各種甲状腺疾患におけるTRAb値

いては、甲状腺関連ホルモンに加え抗TSH受容体抗体 (TRAb, TBII) 陽性、または刺激抗体 (TSAb) 陽性の場合、確からしいバセドウ病と判断し治療を開始しても良いとされている。以前から、甲状腺関連ホルモン項目に比べTRAbは測定に時間を要する項目であり、どちらかという事後確認の位置づけの検査であったが、自動測定系の進歩で、院内測定が可能なレベルまで測定時間が短縮されてきた。TRAb値が来院当日中に得られることで、確からしいバセドウ病として治療を開始できること、あるいはTRAb値を見ながら抗甲状腺薬の投薬量を調節できることは、患者にとっても医療側にとってもメリットが大きい。さらに本試薬のように結果報告時間25分であれば、診療前検査としての

TRAb測定も実施可能であり、患者の来院回数、待ち時間を減らし、患者の症状や病態にあった確な処方につながるため、甲状腺診療への貢献が期待できる。

3. BNP (脳性ナトリウム利尿ペプチド、B-タイプナトリウム利尿ペプチド)

AIA-パックCL[®] BNPは検体量10 μ L、結果報告時間15分の測定試薬である。表1に示す通り、2ステップ法を採用したこと、磁性微粒子を用いることで、従来試薬であるEテスト「TOSOH」II (BNP) の測定時間19分に比して測定時間の短縮化がはかられ、測定範囲の拡大がなされている。校正有効期間はAIA-パックCL TSH同様90日である。

表1 BNP測定試薬比較表

	Eテスト「TOSOH」II (BNP)	AIA-パックCL BNP
測定原理	1ステップサンドイッチEIA	2ステップサンドイッチCLEIA
測定範囲	4.0 ~ 2,000 pg/mL	2.0 ~ 5,000 pg/mL
結果報告時間	19分	15分
検体種/検体量	EDTA血漿/50 μ L	EDTA血漿/10 μ L
プレシジョンプロファイル法 10%CVとなる濃度	3.0 pg/mL	0.85 pg/mL
検量線有効期間	90日	90日

本試薬の性能データとして、プレジジョンプロファイルを図8に示すが、10% CVとなる濃度は0.85 pg/mLと、従来試薬の3.0 pg/mLと比して高感度化が達成されている。また、図9に示すように、従来試薬との相関が良好であることが確認されている⁹⁾。

測定範囲上限の5,000 pg/mLへの拡大は、検査現場において再検数の低減へつながることが期待される。また、本試薬では測定範囲下限も従来の4.0 pg/mLから2.0 pg/mLになり、上述のように低濃度域の精度が向上している。BNP及びNT-proBNPの血中濃度は、Body Mass Index (BMI) と逆相関することが以前より報告されていたが¹⁰⁾、近年になって血中遊離脂肪酸濃度と心臓のBNP産生量の間に逆相関関係が報告され、肥満さらにインスリン抵抗性との関連についても考察されている¹¹⁾。加えて男性では、低BNP濃度が安定虚血性疾患のリスク因子となっていることも報告されており¹²⁾、今後メタボリ

ックシンドロームとの関連において低濃度BNP値の臨床的有用性について研究が進展することが予想される。臨床現場での心不全の診断、病態把握、経過観察や予後予測への貢献はもちろんのこと、循環器分野での臨床研究におけるBNP測定にも、高感度化したAIA-パックCL BNPが貢献できる可能性があると考えられる。

IV. まとめ

AIA-CLシステムは、化学発光基質DIFURATを用いた化学発光酵素免疫測定法を原理とし、専用試薬として磁性微粒子を用いたモノテスト凍結乾燥試薬であるAIA-パックCL試薬を使用することで、従来よりも高感度化、使用検体量の低減、測定時間の短縮化などを達成することができた。さらに、凍結乾燥技術をベースに、反応試薬だけでなく校正試薬、検体希釈試薬の凍結乾燥カップ形態での製品化を実現し、各試薬の保存安定性を高め、有効期限切れによる廃棄量の削減など経済性も考慮した設計を実施した。今後は、さまざまな現場のニーズに対応し、外来患者の院内診療前検査や入院患者の病態管理に適応できるように、測定項目の拡充と、さらなる性能向上に努めていきたいと考えている。

謝辞

AIA-パックCL TSH、AIA-パックCL TRAbなどの甲状腺関連測定試薬開発においてご指導いただきました。岡本甲状腺クリニック・岡本泰之先生、浜田昇先生に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 松本正勝：CIEEL型高効率化学発光基質の設計と合成. 有機合成化学協会誌, 61: 595-604, 2003.
- 2) 松本正勝, 渡辺信子, 小林久子ほか：特許公報第4567107号, 2010.
- 3) 山田雅士：公開特許公報 2014-141642, 2014.
- 4) 早川明子, 山口ひろ子, 水本好美ほか：全自動化学発光酵素免疫測定装置AIA-CL2400を用いたTSH、FT4、FT3測定の基礎的検討. 日本臨床検査自動化学会誌, 40: 257-264, 2015.
- 5) 井上直哉, 畑 伸頭, 兒嶋 嵩ほか：全自動化学発光酵素免疫測定装置AIA-CL2400によるTSH、

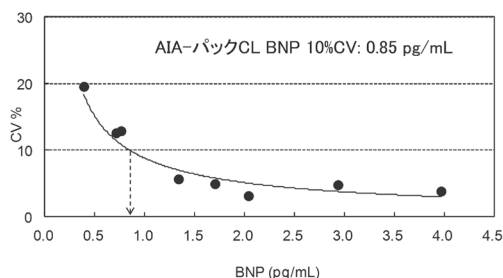


図8 AIA-パックCL BNP 定量限界

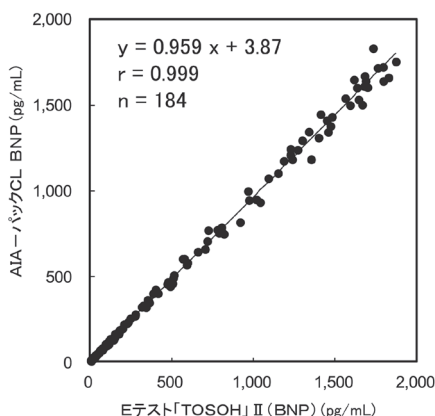


図9 BNP 従来試薬との相関

- FT3、FT4測定試薬の基本性能評価. 医療と検査機器・試薬, 39 : 47-56, 2016.
- 6) 森田新二, 河合岳郎, 池田直子ほか : 全自動化学発光免疫測定システムによる血中FT4, FT3, TSH測定の基礎的および臨床的検討. 日本臨床検査自動化学会会誌, 32 : 843-848, 2007.
 - 7) 古田島伸雄, 中嶋清美, 町田哲男ほか : 甲状腺関連ホルモン測定における測定機種間差の検討. 日本臨床検査自動化学会会誌, 39 : 667-672, 2014.
 - 8) 井上直哉, 畑 伸顕, 小杉暉恵ほか : 全自動化学発光酵素免疫測定装置AIA-CL2400によるTgAb、TPOAbおよびTRAb測定試薬の性能評価. 医療と検査機器・試薬, 39 : 143-153, 2016.
 - 9) 飛田明子, 下坂浩則, 奥山恵理子ほか : AIA-CL2400によるBNP測定試薬の基本的性能評価. 日本臨床検査自動化学会会誌, 40 : 468, 2015.
 - 10) Taylor JA, Christensen RH, Rao K, et al. : B-Type natriuretic peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide are depressed in obesity despite higher left ventricular end diastolic pressures. *Am Heart J*, 152 : 1071-1076, 2006.
 - 11) Mizuno Y, Harada E, Katoh D, et al. : Cardiac production of B-type natriuretic peptide is inversely related to the plasma level of free fatty acids in obese individuals – possible involvement of the insulin resistance. *Endocrine J*, 60 : 87-95, 2013.
 - 12) Minai K, Ogawa T, Kawai M, et al. : The plasma B-type natriuretic peptide levels are low in males with stable ischemic heart disease (IHD) compared to those observed in patients with non-IHD. *PLoS One*, 9 : e108983, 2014.