

〈新技術特集〉

検体前処理法を用いた免疫測定法のポテンシャル

青柳 克己

Potential of immunoassay with effective pretreatment process

Katsumi Aoyagi

Summary In biological fluid samples, it contains not only free target antigens, but also various complexes such as complexes of target antigens and antibodies, and target antigens in virus particles. It have been reported that use a simple specimen-pretreatment process to extract the target antigen in these complexes effectively. This combination of immunoassay with an effective specimen-pretreatment process has been introduced as the 'immunoassay for total antigen including complex via pretreatment (iTACT)' method, and has a significant potential to demonstrate new clinical utility and reduce various pitfalls of immunoassay, especially in autoimmune disease and infectious disease. At first, in immunoassays for host antigen such as thyroglobulin (Tg), there are known interferences by endogenous autoantibodies to host antigen. An application of iTACT for autoimmune disease, a novel immunoassay for Tg was developed without the interference of the autoantibody to Tg (TgAb) by introducing an automated iTACT. For infectious diseases, we developed sensitive immunoassays for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and hepatitis C virus core antigen (HCVcAg) with high clinical utilities. By introducing iTACT in each immunoassay, various specific interference substances can be inactivated, and the target antigen can be released from complex. The combination of immunoassay and pretreatment process can cover the many disadvantages of conventional immunoassay compared to nucleic acid amplification testing or LC-MS/MS analysis, and can be applied to other target antigens with the potential for new clinical utility and reducing the pitfalls in routine testing.

Key words: immunoassay, iTACT, pretreatment, thyroglobulin, hepatitis B virus surface antigen, hepatitis C virus core antigen

富士レビオ株式会社
研究開発本部長
〒192-0031 東京都八王子市小宮町51番地
TEL: 042-645-4740
FAX: 042-646-8325
E-mail: katsumi.aoyagi@miraca.com

R&D Division Head, FUJIREBIO INC.
51 Komiya-machi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0031 Japan
TEL: +81-42-645-4740
FAX: +81-42-646-8325

I. はじめに

免疫測定法は、様々な生体試料中の測定対象物を、簡便に高感度・高特異性で検出・測定することが可能であり、感染症、癌、各種疾患の診断や、患者の病態把握や治療モニタリングなど、臨床現場で広く用いられている。この測定対象物としては、抗原測定法と抗体測定法に分類され、さらに抗原測定法には、遊離した抗原として存在しているもの、何らかの修飾体化されたもの、複合体や粒子中に含まれているものに分類される。これらの抗原の存在様式を認識し、適切な抗体や反応環境向上のツールを開発し、免疫測定法を構築することが重要である。本報告では、近年核酸増幅検査や質量分析装置の技術的進화가めざましいことと比較すると、免疫測定法が技術的に停滞しているように感じられるが、免疫測定法に検体前処理法を導入することにより、さらなる高感度化、高い正確性をもつ検査へと大きく進化できると考える。

II. 抗原検出免疫測定法の測定対象物の存在様式

測定対象の抗原は、血液、尿、脳脊髄液などの生体試料の違いで異なる存在様式をもつ場合や、試料採取時の患者状態による抗原様式の多様性が知られており、個々の測定対象抗原の臨床的特徴を十分に検証することが必要である。

例えば、甲状腺疾患マーカーであるサイログロブリン (Thyroglobulin: Tg) は、特異的に甲状腺濾胞細胞で産生されるが、Tgに対する自己抗体 (Anti-Thyroglobulin: TgAb) が血中に存在した場合は、その多くは血中でTg-TgAbの複

合体として存在している^{1)~3)} (Fig. 1)。また、B型肝炎ウイルス (Hepatitis B Virus: HBV) の抗原 (HBsAg) は、血中ではDane粒子、HBV-DNAを含まない様々な粒子膜に貫通した形でHBsAgが存在している⁴⁾ (Fig. 2)。感染初期では、血中にHBsAg粒子が分泌されるが、感染継続によって、宿主から抗体 (Anti-HBsAg; HBsAb) が生産され、HBsAg粒子とHBsAbとの複合体が存在することになる^{5)~7)}。このように、血中で遊離しているTg、Tg-TgAbの複合体、粒子膜に貫通しているHBsAg、そのHBsAg粒子とHBsAbの複合体といった、患者状態の変化の中で各測定対象抗原は様々な存在様式をとる。これら抗原性の多様性によっては、現状の免疫測定法では正確な測定ができないケースが認められ、これを解決できる免疫測定技術の向上が必要である。これらの多様性に影響を受けないiTACT (immunoassay for Total Antigen including Complex via preTreatment) 法という検体前処理工程を含んだ免疫測定法を提案する⁸⁾。

III. 抗原検出免疫測定法のピットフォール

抗原検出免疫測定法は、その抗原に対して高い親和性と特異性をもつ抗体を用いて、高い正確性をもって測定することが必要である。一方、Table 1に示すような多くのピットフォールと呼ばれる課題が知られている。これらのピットフォール現象は、免疫測定法の歴史的な課題であり、各試薬では様々な対応策がとられている。たとえば、抗体を変える、抗体エピトープを増やす、Human anti-mouse antibody (HAMA) 対策としてマウス抗体の添加や、過剰量の吸収剤

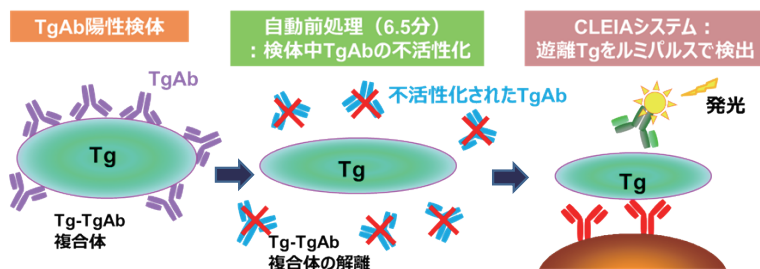


Fig. 1 iTACTを用いた新規サイログロブリン測定法の測定原理

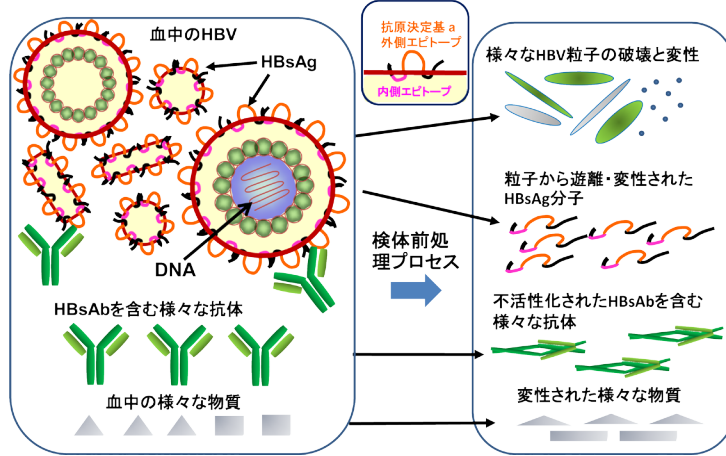


Fig. 2 iTACT-HBsAg測定法における前処理法による検体の変化

Table 1 抗原検出免疫測定法のピットフォール

抗原検出免疫測定法のピットフォール	
特異的な免疫反応阻害物質の存在	
①感染症抗原に対する宿主由来抗体の影響	様々な細菌、ウイルスなどの感染性病原体抗原に対する宿主由来の抗体が、抗原の正確な測定に影響を与える
②内分泌マーカー、腫瘍マーカーなどに対する自己抗体	サイログロブリンやインシュリンなど、およびCEA, CA125, CA19-9などの腫瘍マーカーに対する自己抗体が生じ、抗原の正確な測定に影響を与える
③各種レセプターや結合タンパク	各種ステロイド系の性ホルモンに対する結合タンパク質の存在や、免疫抑制剤などの薬剤に対する結合タンパク質の存在が、正確な抗原測定に影響を与える
④試薬コンポーネントに対する結合タンパク	試薬中のマウスモノクローナル抗体に対する抗マウス抗体 (human anti-mouse antibody; HAMA) などの影響により特異性が低下する
非特異的な免疫反応の阻害物質の存在	
⑤疎水性・イオン性相互作用物質の存在	RF, Mタンパクなどの影響により特異性の低下をおこす

を添加するなど試薬構成主要素の改良である。これらの解決法のひとつとして、免疫測定の前に検体中の問題となる成分の破壊や不活性化などを行う処理プロセスを積極的に組み入れたiTACT測定法が効果的である。前処理でHAMA活性を完全に不活性化できれば、前述したHAMA対策用のマウス抗体添加は原則不要となり、様々な自己抗体などの結合タンパク質の高次構造破壊による不活性化により、ピットフォール現象の低減化が期待できる。

IV. iTACT を用いた抗原検出免疫測定法

検体前処理法と免疫測定法を一連の測定プロセスに組み入れることにより、各測定対象抗原の存在様式の多様性への対応と、多くのピットフォールの低減が可能となる。具体的な測定法構築の流れとしては、下記のポイントが重要となる。

- ① 個々の測定対象抗原のもつ臨床的特徴を十分に検証し、臨床的有用性の最大化のための開発コンセプトの確立
- ② その抗原上の最適なエピトープの選定およ

びその露出プロセスの構築

- ③ 対応可能な抗体などのツールの取得と特徴の解析
- ④ 測定妨害物質の特徴や影響度について、効率的な除去方法の検証を行い、測定法を組み立てる

以下に、iTACTを用いて臨床的有用性が向上した免疫測定法の開発例について記載する。

1. iTACTを用いた新規サイログロブリン (Tg) 測定法

1) Tgと既存測定法の課題

Tgは、分子量約33万の糖蛋白の2量体であり、糖鎖などの分子多様性が知られている。甲状腺濾胞細胞で産生され、臓器特異性が高いため、甲状腺疾患に特異的なマーカーと言える。一方、Tgに対する自己抗体 (TgAb) が、健康人の約10%、分化型甲状腺癌患者の25%以上に存在することが知られており、血中TgAbの存在により、正確なTg濃度を測定できないという歴史的なピットフォールが存在する¹⁾⁻³⁾ (Table 1)。今まで、Tg測定法としては、競合法を原理とするラジオイムノアッセイ (Radio immunoassay; RIA)、サンドイッチタイプの免疫測定法、および近年報告されてきたLiquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) 法の3種類が知られている。Table 2に示したように、各測定法にはメリットと課題が存在する。競合法

の場合は、ポリクローナル抗体の性質にもよるが、一般的には多価結合性のため、血中TgAbと競合するリスクは低減できるが、感度が低い、TgAbによる偽高値のリスク、測定時間が長いなどの課題がある。現在ルーチンで主に使用されているサンドイッチタイプの免疫測定法は、様々な全自動分析システムで簡便・迅速に測定することができる大きなメリットを持っている。一方、TgAbの影響を受けやすいため、各サンドイッチTg測定法では、TgAbの影響低減のために下記のような工夫を行っている。

- ① 親和性の高いモノクローナル抗体の使用：血中TgAbよりも、結合力の強い抗体を一次抗体や標識体に使用する。
- ② 多くの種類のモノクローナル抗体やポリクローナル抗体を用いて、反応可能なエピトープを増やす：血中TgAbと競合するリスクを低減するために、一次抗体や標識体中の抗体数を多くする。

しかしながら、上記の戦略では、患者検体中のTgAbの多様性への完璧な対応は、原理上不十分であり、高親和性、あるいは多量のTgAbが存在した場合は、一次抗体/標識体のエピトープと競合するケースが容易に考えられる。そのため、各試薬の添付文書にはTgAbの影響に対する注意喚起が記載され、TgAb測定値を考慮した総合的な判断が必要となる。

Table 2 各サイログロブリン測定法の特徴と課題

測定法	メリット	課題
競合法 (RIA法)	・ポリクロの多価結合性のため、血中TgAbと競合するリスクを低減	・一般的に低感度、測定レンジが限定 ・反応時間が長い、複雑な工程で自動化不向き ・試薬有効期限が短い ・TgAbによる偽高値の影響
サンドイッチ法	・簡便/高感度で広い測定レンジ ・短時間自動化、多検体処理可能	・少なくとも2つ以上の反応エピトープが必要で、血中TgAbと競合するリスクが高い
LC-MS/MS法	・TgAb含む血中タンパクの断片化により、TgAbの反応性低減	・プロテアーゼ処理によるTgの断片に対する特異的な抗体や免疫沈降濃縮プロセス構築が必要 ・分析前のプロセスの各ステップの回収率など検証必要 ・測定前プロセス含む測定時間が長い。費用が高い

2) iTACT-Tg測定法

これら既存Tg測定法の課題を解決し、原理的にTgAbの影響を受けず、今後ゴールドスタンダード測定法となりうる簡便、高感度な血中Tg測定法が必要である。今回、ルミパルスシステム（富士レビオ）を用いた全自動化された前処理法と高感度免疫測定法を組み入れた新規Tg測定法（iTACT-Tg測定法）が開発された（Fig. 1）。

iTACT-Tg測定法における6.5分の全自動前処理プロセスでは、検体中TgAbが不活性化され、同時にTg-TgAb複合体の解離によりTgが遊離される。その後、化学発光酵素免疫測定法（Chemiluminescent enzyme immunoassay: CLEIA）により、遊離されたTgは、サンドイッチタイプ測定法で定量される。本試薬は、国際標準品IRMM（BCR-457）に準拠した定量値が得られ、かつ第二世代Tg測定法以上の高感度定量が可能である。また、典型的な既存試薬との相関性をFig. 3に示した。TgAb陰性検体群の測定（Fig. 3-A）においては、既存試薬とほぼ完全に一致し、高い相関性を示している。TgAb陽性検体群の場合（Fig. 3-B）、既存試薬に対するiTACT-Tg法の測定値比率が100%に分布すれば、測定値は一致となるが、既存試薬で検出限界（0.04 ng/mL）以下であっても、9例はiTACT-Tg測定法で検出可能であること、および既存試薬低値群において、iTACT-Tg測定法で高値を示している検体が多数みられ、1,300%の高い測定値

を示した検体も認められた。他の既存試薬との相関性においても、同様にTgAb陽性検体群では、iTACT-Tg測定法が陽性あるいは高値を呈し、既存他法では検出できない、あるいは極めて低値となる多数の検体が確認されている。これらの乖離した検体群は、希釈試験、TgAbを加えた吸収試験、およびゲル濾過解析などを行い、iTACT-Tg測定法が極めて高い特異性・正確性を有していることが確認されている。

以上のように、iTACT-Tgは、第二世代Tg測定法と同等以上の高感度を示し、かつTgAb陽性検体においても甲状腺特異的のマーカであるTgを正確に測定可能であり、新規の臨床応用に大きな可能性をもつ第三世代のTg測定法と期待される。

3) iTACT-Tg測定法の期待される活用

甲状腺腫瘍診療ガイドラインでは、分化癌症例で甲状腺全摘術を施行した患者では、4～6ヵ月ごとのTgAbとTg測定が術後経過観察として推奨されているが、新規高感度iTACT-Tg測定法により、より簡便に正確に術後経過観察が可能となることが期待される。また、American Thyroid Association Guidelinesでは、甲状腺癌の場合、TgAb陰性であればTg測定、TgAb陽性であれば、LC-MS/MS法でTg測定が推奨されている。甲状腺全摘術後の経過観察、術後の再発や転移の診断において、Tg値0.1～1.0 ng/mLが基準になっており、高感度iTACT-Tg測定法は、この感度基準を十分にクリアしている。加えて、

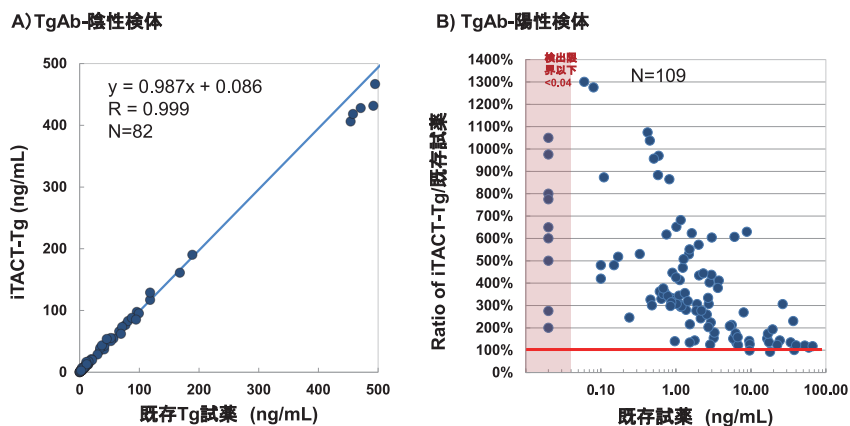


Fig. 3 iTACT-Tg測定法と既存測定法との相関性。A) TgAb陰性検体を用いた既存Tg試薬との相関性 B) TgAb陽性検体を用いた既存Tg試薬との相関性

高価で煩雑なプロセスを有するLC-MS/MSの必要性がなく、短時間、安価で、診断や術後の経過観察、再発や転移の診断を含め、甲状腺の様々な疾患において、正確な診断・モニタリングに大きく貢献できると期待している。

2. iTACTを用いた新規高感度HBsAg免疫測定法

1) HBV感染とHBsAg既存測定法の課題

HBVはヘパドナウイルスに属しており、約3,200塩基対の二本鎖環状DNAが、正二十面体のウイルスコアに含まれ、さらにエンベロープ膜に包まれたDane粒子となる。HBsAgは、分子量約20 kDaのタンパク質であり、血中においてはDane粒子、HBV-DNAを含まない中空粒子、小球形粒子、桿状粒子といった各HBV粒子膜に貫通した形で存在している⁹⁾。Dane粒子に対して、HBV-DNAを含まない粒子が大過剰量(10,000～1,000,000倍)分泌されているため、一般的にHBsAg検査によって陽性であれば、HBV感染と診断される。現在のHBsAg検査は、輸血用血液スクリーニング、健康診断、入院時・輸血前検査、免疫抑制・化学療法時検査、急性肝炎・慢性肝炎の型別診断、B型急性肝炎の治療判定などに用いられている。加えて、国内のB型慢性肝炎患者の治療の短期目標は、HBcAgおよびHBV-DNAの陰性化、長期的目標として、HBsAgの陰性化とされており、核酸アナログ薬およびインターフェロンの治療効果判定・予後予測にも使用されている。

しかしながら、既存のHBsAg検査法では、感染継続の過程で宿主からHBsAbが生産されると、HBsAg粒子とHBsAbとの複合体が形成され、血中に存在するHBsAg量を正確に検出・測定できないという問題がある。加えて、従来法では、粒子膜外側に露出しているエピトープ(抗原決定基a)に対する抗体のみを用いているが、この外側エピトープは血中のHBsAbの選択圧を受けることで、Escape Mutantを生じることが知られ^{9)~11)}、HBsAg検査における「見逃しリスクが高い」という大きな課題がある。

2) iTACT-HBsAg測定法

HBsAb陽性検体においても正確なHBsAg量を測定できること、及び、変異体に対する反応性向上を含めより高感度にHBsAgを測定すること

を目的とした、iTACTを用いたHBsAg測定法(iTACT-HBsAg)が報告されている⁸⁾(Fig. 2)。この開発コンセプトは、①測定対象抗原の検出用エピトープを増やす：多くの既存測定法の測定対象抗原は、Dane粒子を含むHBV関連粒子表面のHBsAgであり、粒子膜外側の抗原決定基a領域(外側エピトープ)を認識する抗体のみが使用されている。iTACT-HBsAg測定法においては、これらの粒子を前処理法で破壊しHBsAg分子を遊離させ、外側エピトープだけでなく、粒子膜内側に隠れていたエピトープも検出用に活用し、より変異体の反応性向上を含めた高感度化、正確な定量性の向上を実現する。②HBsAb陽性検体中のHBsAgの検出：前処理法により血中HBsAbは不活性化され、同時に粒子上のHBsAg-HBsAb複合体からHBsAgが遊離され検出が可能となる。

以上の開発コンセプトにより開発されたiTACT-HBsAg法は、ルミパルスシステムを用いて、検体前処理プロセス(37℃、6.5分)を含め全自動で測定結果が得られる。検体前処理によるHBV関連粒子を含む検体中の変化の概要をFig. 2に示した。検体中のHBV関連粒子は破壊され、粒子表面のHBsAgは一部変性し遊離される。同時に、HBsAbも不活性化され、HBsAg-HBsAb複合体からもHBsAgは遊離される。本前処理によるHBsAgの免疫活性を、ゲル濾過法を用いて解析を行った(Fig. 4)。最初に、未処理のままnative HBsAg試料(分子量2,000 kDa以上)、およびHBsAbを添加した同試料をゲル濾過で分離し、その後各分画はiTACT-HBsAg法で測定された。HBsAbの添加により、さらに巨大な分子量にシフトしており、HBsAg-HBsAb複合体が形成されたことが推測された(Fig. 4-A)。これら2種の同試料を、前処理を行った後にゲル濾過で分離し、その各分画はFig. 4-Aと同様に、iTACT-HBsAg法で測定された(Fig. 4-B)。HBsAb添加、未添加試料共、前処理プロセスによりHBsAg免疫活性は粒子や複合体から遊離され、ほぼ同じ低分子領域にシフトされたことが確認された。

このiTACT-HBsAg法による臨床的有用性の例を示す(Fig. 5)。25例のHBVキャリアを長期間フォローアップ中のHBsAg検出能について、iTACT-HBsAg、既存法A(HISCL HBsAg：シス

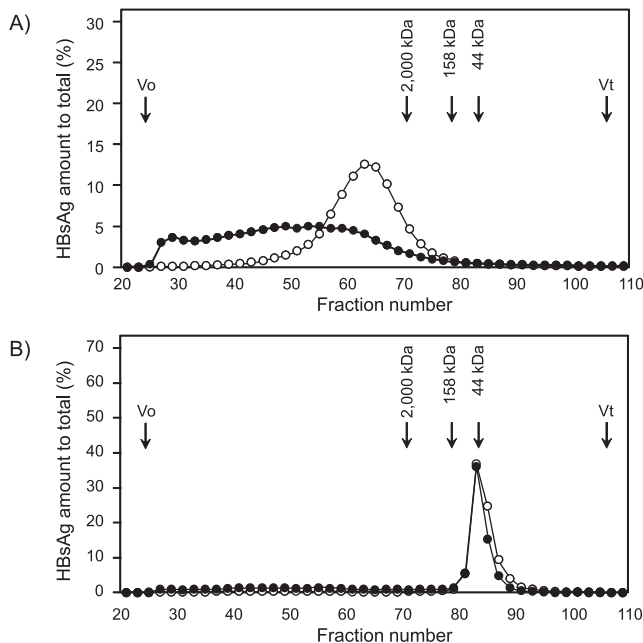


Fig. 4 iTACTによるHBsAg免疫活性のゲル濾過法による解析 (文献8より引用). ○: HBsAb未添加のHBsAg試料 ●: HBsAb添加しHBsAg-HBsAb複合体を含む試料。ゲル濾過 (HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR) 後の各分画は、iTACT-HBsAg測定法でHBsAg免疫活性を測定した。A) 未処理条件での検体中HBsAg免疫活性のゲル濾過解析、B) 前処理後の検体中HBsAg免疫活性のゲル濾過解析。

分子量マーカー; 2,000 kDa: blue dextran, 158 kDa: gamma globulin, 44 kDa: ovalbumin, Vo: void volume, Vt: total column volume.

メックス)、および既存法B (Lumipulse HBsAg-HQ: 富士レリオ) の3試薬を用いて比較した。フォローアップ中にHISCL HBsAg が陰性化した時点を0ポイントと設定し、最大11年間フォローアップされた。各HBsAg測定法の結果から、25症例は大きく3グループに分類され、3測定法共同ポイントで陰性化したグループA (2例: 8%)、HISCL HBsAgが先に陰性判定となり、次に同時にLumipulse HBsAg-HQ とiTACT-HBsAgが陽性であった症例群をグループB (7例: 28%)、グループC (16例: 64%) は、HISCL HBsAgとLumipulse HBsAg-HQが先に陰性判定となり、iTACT-HBsAgのみが陽性であった症例群である。結果として、

① 2種の既存試薬がiTACT-HBsAg測定法より長期間検出できた症例はなかった。

② iTACT-HBsAg測定法のみで陽性を示したケースが16症例存在し、そのうち14症例がHBsAb陽性症例であり、血中HBsAbの有無に関わらずHBsAgが肝臓内で産生されていることを示している。

以上の結果から、iTACT-HBsAg測定法は、HBV感染肝臓内でのHBsAgを産生するactivityを表す指標と言える。

3) iTACT-HBsAg測定法の期待される今後の活用

iTACT-HBsAg測定法は、一般診断やスクリーニング検査としては、HBV感染者の拾い落としや二次感染リスクの低減に極めて効果的と期待される。また、HBV感染者の自然経過や抗ウイルス療法中の経時的モニタリングにおいては、DNAやHBeAg陰性化後、次に血中HBsAg

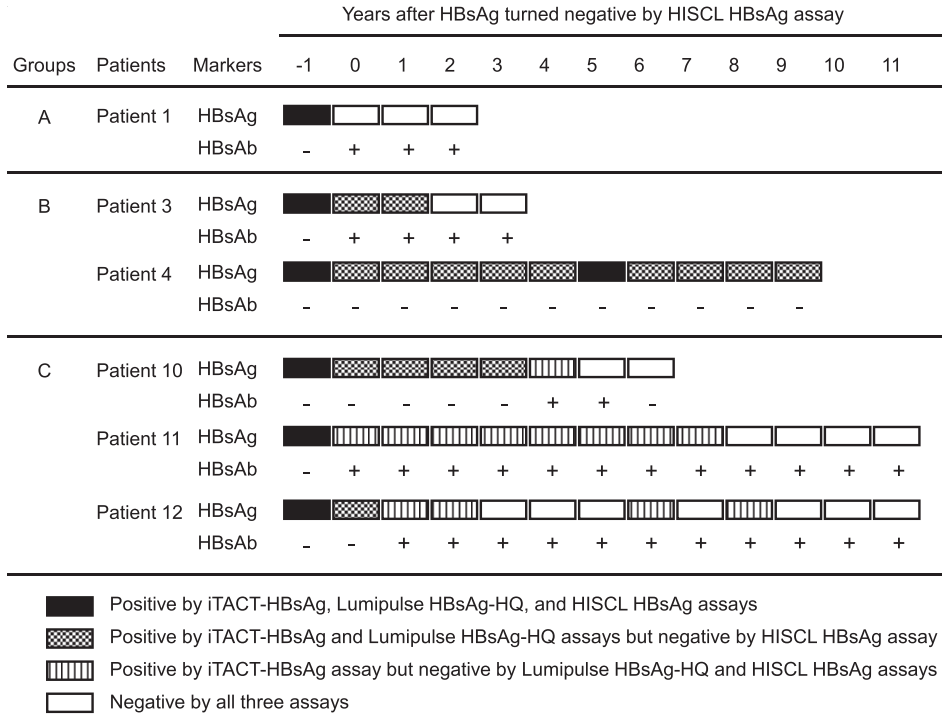


Fig. 5 3種のHBsAg測定法を用いた長期フォローアップ症例の代表的な臨床経過。
 HISCL HBsAgで陰性化した時点をも0ポイントとして設定され、最大11年間フォローアップされた。3種のHBsAg測定法（HISCL HBsAg、Lumipulse HBsAg-HQ、iTACT-HBsAg）による判定結果により分類した。（文献8より引用）
 Group A: 3測定法共同ポイントで陰性化した症例群、Group B: HISCL HBsAgが先に陰性判定となり、次に同時にLumipulse HBsAg-HQとiTACT-HBsAgが陽性であった症例群、Group C: HISCL HBsAgとLumipulse HBsAg-HQが陰性判定となり、iTACT-HBsAgのみが陽性であった症例群

陰性化をめざした場合、従来法HBsAg陰性化という現象は実質の陰性化に至らず不十分であり、本法による陰性化をめざすモニタリングが非常に効果的と考えられる。加えて、HBV既往例含めHBsAg陰性化と判断された後、悪性リンパ腫などの癌、関節リウマチや炎症性腸疾患、および臓器移植、骨髄移植・造血幹細胞移植などに対する免疫抑制剤・化学療法を行った場合に、HBVの再活性化が生じ、重症化しやすいことが報告されている^{12)~14)}。このようなHBV再活性化のリスク低減にも、iTACT-HBsAg検査は大きな貢献が可能と考えられる。

3. iTACTを用いたC型肝炎ウイルスコア抗原測定法

1) HCV感染とHCV検査

C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) は、全長約9,500塩基の一本鎖RNA (+) をもつフラビウイルスであり、主に血液感染後、急性肝炎症状を呈した後、高率に慢性化し、肝硬変、肝癌へと移行するため、HCV感染の早期診断を行い、HCV排除の治療が重要となる。近年のHCV治療薬の開発は目覚ましく、ほとんどのHCV感染者において、HCV排除が可能となってきており、HCV感染の拾い上げやこのような治療薬の効果モニタリングが必要となる。

HCV感染検査としては、主にHCVAb検査やHCV-RNA検査、およびHCVAg検査が用いられています。感染後、その感染状態を診断できな

い期間をウインドウピリオド (window period) と呼ばれるが、HCVAb検査であれば約70～80日間存在するのに対して、HCV-RNAやHCVAg検査では、20～30日と大きく短縮することが可能である^{15),16)}。

HCVAb検査は、簡便でコストも安いHCV感染者と既往例の判別や、HCV感染者の病態把握、および治療モニタリングへの応用は原理的に困難である。一方、HCV-RNA検査は高感度で、感染者の病態把握、治療モニタリングに効果的であるが、コストが高く、測定時間が長いなどの欠点もある。また、ヘパリンの影響を受けやすい、検体保存安定性が低く、検体ハンドリングや保管には十分に注意が必要である。HCVAg検査は、HCVのコア抗原 (HCVcAg) を測定するもので、簡便でコストも安く、検体保存安定性も高く¹⁸⁾、感染者の病態把握、治療モニタリングにも効果的である。さらなるHCV-RNAレベルの高感度化が今後期待される。

2) iTACT-HCVcAg測定法の開発

HCVcAgを測定するためには、効果的な前処理法の開発が大きな技術的ブレークスルーとなる。HCV粒子は、その中心にゲノムであるRNAをHCVcAgがとりまき、RNAと共にヌクレオキャプシドを形成し、エンベロップ抗原がそのまわりの外皮を形成している (Fig. 6)。血中でのHCVは、very low density lipoprotein (VLDL) などのリポタンパク質や、感染初期のwindow period以降は各HCVAbが産生され、抗エンベロ

ープ抗体等と会合していると考えられている。血中には、他のHCVAbとして抗コア抗体や非構造タンパク質に対する抗体が存在している。つまり、HCVcAgを検出・測定するためには、下記の要件を解決する必要がある。

- ① VLDLやHCV粒子を効率的に破壊すること
- ② 同時にヌクレオキャプシドの破壊とRNAとの相互作用を外し、HCVcAgを遊離させること
- ③ 同時に血中に存在する抗コア抗体を不活性化すること。

前述したTgの場合は、存在する抗体を不活性化することが重要であり、HBsAgの場合は、粒子膜の破壊と血中抗体を不活性化することがキーポイントである。効率的なHCVcAgの抽出法の開発には、それらに加え、ヌクレオキャプシドの破壊や塩基性の核タンパク質の抽出技術を要する。

この前処理法のひとつとして、1999年に筆者らは陰イオン性界面活性剤のひとつであるSodium dodecyl sulfate (SDS) と熱負荷の組み合わせによる簡易な前処理プロセス (検体に前処理液を添加混合し、56℃で30分のインキュベーション) を開発し、HCVcAgの高感度CLEIAを開発した^{15),17)}。

この前処理法では、SDS+熱負荷により検体中のHCV粒子や抗コア抗体を含むほとんどのタンパク質がSDSと結合することにより、タンパク質の立体構造を変性させるため、各種抗体

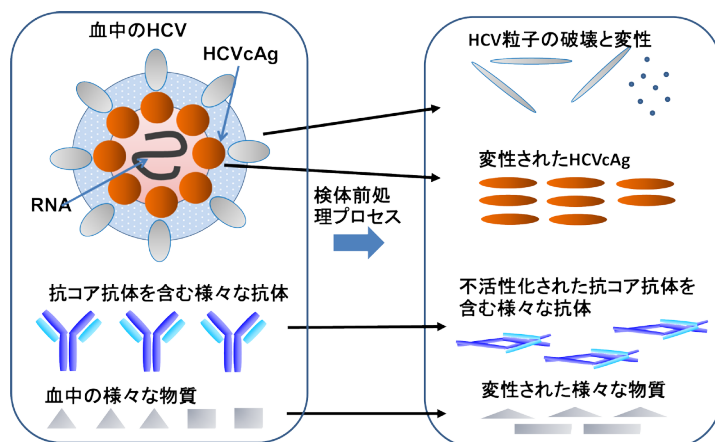


Fig. 6 HCVコア抗原測定法における前処理法による検体の変化

の抗原への結合性は消失する。Fig. 7にSDSを用いた前処理法の温度の影響を示した。Fig. 7-Aでは、5例のHCVAb陽性検体中のHCVcAg免疫反応性が、未処理条件と比較して、処理温度上昇に伴い高値を示していくことが示されている。同時に、検体中の抗コア抗体の力価は低下していき、56℃の条件ではカットオフ値未満まで低減した (Fig. 7-B)。つまり、本前処理法によって、HCV粒子の破壊、RNAとの相互作用消失、同時に測定阻害となる血中抗コア抗体が不活性化され、高感度でHCVcAgの測定 {分析感度:3 fmol/L (0.2 mU/mL)} が可能となった。当時のPCR試薬と同等な陽性率と高い相関性 ($R=0.846$) を示し、加えて大きなgenotype間差も認められなかった。

同様なSDS+熱負荷を用いた前処理法は、HBコア関連抗原 (HBcAg) 測定法にも応用されており、Dane粒子を含むHBV関連粒子を破壊し、HBV-DNAとヌクレオキャプシドを構成しているHBcAgを遊離化し、同時に血中のHBeAb, HBcAbといった抗体を不活性化することにより、HBV由来のHBeAg, p22cr, HBcAgを同時に測定しうるものである^{19), 20)}。

3) iTACT-HCVcAg測定法の活用

SDS+熱負荷を用いた前処理法は高温システムが必要であるため、全自動化対応を進めるためにより低温である37℃で10分以内の前処理

プロセスが開発され、全自動HCVcAg免疫測定試薬の開発^{21), 22)} や、前述したTgやHBsAgなどにも応用されている。

前述したように、画期的なHCV治療薬の登場により、HCV感染者の治療効果モニタリングが必要となるが、HCVcAg検査は、精度高く治療モニタリングが可能で、かつ簡便、コスト安、検体保存安定性も高いなどルーチン検査として多くの利点があり¹⁸⁾、HCV-RNAとの使い分けを含めた今後のさらなる活用が期待される。

V. 検体前処理法を用いた免疫測定法の今後の展開

以上のように、免疫測定法に検体前処理プロセスを組み入れたiTACTは、各測定対象抗原の多様性、および多くのピットフォールの影響を受けず、疾患によって産生されたマーカー抗原の存在、及び新規の臨床的有用性を示した。各測定対象抗原のもつ臨床的特徴を検証し、ピットフォール対応を含む臨床的有用性の最大化をねらった開発コンセプトの確立が重要である。

検体前処理法は、免疫測定法以外でも重要なツールである。核酸増幅検査は、検体試料から核酸の抽出という前処理工程が必須であり、当初有機溶媒や遠心操作などのマニュアル法の前

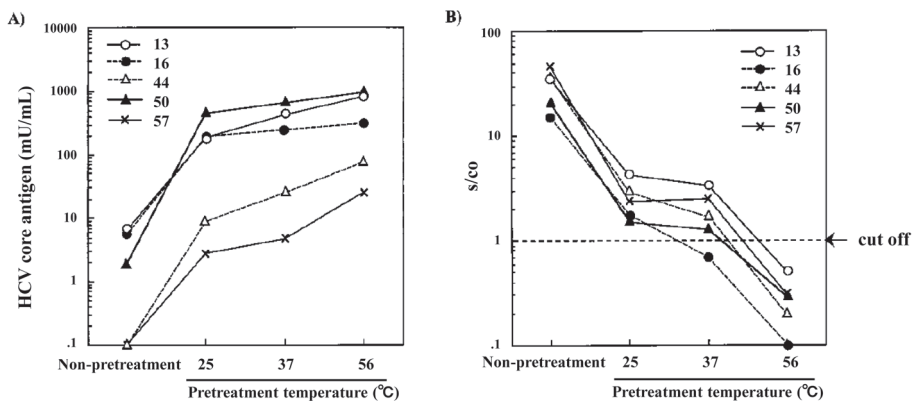


Fig. 7 HCVAb陽性検体を用いた、HCVコア抗原測定法における前処理温度の効果 (文献15より引用) .5例のHCVAb陽性検体 (検体13, 16, 44, 50, 57) を用いて検討。A) 前処理温度によるHCVコア抗原の免疫活性、B) 前処理温度によるHCVコア抗体価。s/co = 1.0をカットオフ値と設定

処理法で行われていたが、半自動化システムの開発、そして現在増幅・検出機器と一体となった全自動化システムに進んでいる。質量分析装置も、目的対象物によって様々な前処理法の構築が必要であり、ステロイドホルモンなどの非タンパク質の低分子抗原については、除タンパク工程を中心とした比較的簡単な前処理工程後、質量分析が可能となる。前述のTgなどの巨大分子の場合は、様々な糖鎖修飾などの分子多様性が存在し、プロテアーゼ処理によるタンパクの断片化や、ターゲット配列に対する抗体によるAffinity抽出過程が必要であり、その後LC-MS/MSなどの分析機器で測定可能となる。この多段階のステップの検証を十分に行う必要性があり、特に抗体によるAffinity抽出過程はまさに免疫測定法の応用である。その抗体開発や特徴の検証を含めた免疫抽出技術による前処理法は、質量分析結果の感度や正確性に大きな影響を与える。以上のように、検体前処理法は、免疫測定法も含め、様々な原理の異なる検出方法に、より適切な試料を提供するための測定対象物の調製（抽出）工程であり、各検出方法の精度を向上させる重要な技術である。

検体前処理法を用いた免疫測定法の報告は、これまでもいくつかの項目で、特異的な検体前処理工程が開発されている。例えば、葉酸測定法では、還元剤処理により葉酸結合タンパク質を変性させ、葉酸を解離させる前処理工程が必要であり²³⁾、ビタミンB12測定法においても、検体を水酸化ナトリウムと還元剤で前処理（Non-boil法）を行い、シアン化カリウム添加で担体タンパクであるトランスコバラミンやハプトコリンから放出させる前処理工程が必要とされる^{24), 25)}。これらは明確な臨床的有用性が確立され、同時に免疫測定法の大きなメリットであるコスト低減効果や簡便さによって、ルーチン検査として用いられている。これらの項目は、免疫測定法のピットフォールの中の低分子抗原に対する結合タンパク（Table 1）に分類され、阻害物質の物性が比較的明確である。

一方、項目によっては開発当初前処理工程が必要とされていたが、その後の検討から、免疫測定法の反応液中添加物の工夫によって前処理工程が不要となり、より簡便な検査試薬が開発されている。25-OHビタミンD測定試薬は、ビ

タミンD類が血中でビタミンD結合タンパク質と強固に結合しているため解離操作が必要とされ、初期RIA試薬では、アセトニトリル添加後遠心操作といったマニュアル法による前処理が用いられてきた。近年では遠心処理など不要な全自動前処理工程を含んだ免疫測定試薬、さらにビタミンD結合タンパク質からの解離と免疫反応を同時に行う試薬が開発され、ルーチン検査で活用されている²⁶⁾。

今回報告した各iTACTの開発は、前述の葉酸や25-OHビタミンDのような対象抗原に対する特異的結合タンパク質からの遊離とは異なる技術的ポイントがある。抗原-抗体のような強固な複合体中の結合物を不活性化すると同時に抗原を遊離させるが、その結合物は単一の特徴をもたず、個々の患者によって、また患者の状態によって多様性をもつものである。そのため、吸収剤などの添加や、単一化された化学的処理で解離させることは、原理的に困難である。加えて、このような複合体をとりまく検体のマトリックスは、高・低濃度のタンパク質、異常タンパク質、脂質、核酸、沈殿物などの多様性を持ち、前処理によりこれらマトリックスも同時に変性を受けるため、その影響を減じる対策が必要である。検体マトリックスの影響を大きく減じるための最も容易な方法は、緩衝液で検体を希釈後に、前処理を行うことであるが、感染症のような高感度化が必要な項目の場合は、希釈により感度低下が生じ大きなデメリットとなる。今回詳述した項目は、術後のがん再発や転移のモニタリング、感染症スクリーニングや治療モニタリングにおいて、より高感度化が必須となる。特に対象抗原が低濃度の場合、抗体などの影響も大きくなるため、これらの影響を排除できるiTACT技術開発が重要である。

今後のiTACTを用いた免疫測定法の活用としては、検体前処理技術や免疫測定法開発の難易度はより高くなるが、前述したように抗原存在様式に多様性があり、かつ高感度化が必要な項目での新規臨床的有用性の提供である。加えて、日常のルーチン検査で生じる免疫測定法のピットフォールによる偽陽性や偽陰性などの不正確な検査結果による混乱に対して、iTACTを用いた免疫測定法は、検体中の妨害物質を免疫測定ステップの前に不活性化するため、より正確な

目的抗原量の提供、より正しい臨床診断に大きく貢献できることが期待される。

文献

- 1) Spencer C, LoPresti J, Fatemi S: How sensitive (second-generation) thyroglobulin measurement is changing paradigms for monitoring patients with differentiated thyroid cancer, in the absence or presence of thyroglobulin autoantibodies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21: 394-404, 2014.
- 2) Spencer C, Petrovic I, Fatemi S: Current Thyroglobulin Autoantibody (TgAb) Assays Often Fail to Detect Interfering TgAb that Can Result in the Reporting of Falsely Low/Undetectable Serum Tg IMA Values for Patients with Differentiated Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metabolism*, 96: 1283-1291, 2011.
- 3) Verburg FA, Luster M, Cupini C et al: Implications of Thyroglobulin Antibody Positivity in Patients with Differentiated Thyroid Cancer: A Clinical Position Statement. *Thyroid*, 23: 1211-1225, 2013.
- 4) 西口修平: HBs抗原の測定法と臨床的意義. *肝臓*, 55: 310-324, 2014.
- 5) Anh-Tuan N, Novak E, Hollan SR: Hepatitis B surface antigen circulating immune complexes (HBsAg-CICs) in patients with bleeding disorders. *Vox Sang*, 40: 12-16, 1981.
- 6) Sugiura K, Hasumura Y, Takeuchi J: Significance of circulating HBs antigen-antibody immune complexes in patients with HBs antigen-positive liver disease. *Gastroenterol Jpn*, 17: 241-245, 1982.
- 7) Madalinski K, Burczynska B, Heermann KH et al: Analysis of viral proteins in circulating immune complexes from chronic carriers of hepatitis B virus. *Clin Exp Immunol*, 84: 493-500, 1991.
- 8) Matsumoto A, Imaizumi M, Tanaka Y et al: Novel and highly sensitive immunoassay for total hepatitis B surface antigen, including that complexed with hepatitis B surface antibody. *J Gastroenterol*, 52: 376-384, 2017.
- 9) Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P et al: Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*, 336: 325-329, 1990.
- 10) Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F et al: Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol*, 68: 2671-2676, 1994.
- 11) Lada O, Benhamou Y, Poynard T et al: Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of "a" determinant variants. *J Virol*, 80: 2968-2975, 2006.
- 12) Jang JW, Kim YW, Lee SW et al: Reactivation of hepatitis B virus in HBsAg-negative patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 10: e0122041. doi:10.1371/journal.pone.0122041, 2015.
- 13) Kusumoto S, Tanaka Y, Suzuki R et al: Monitoring of Hepatitis B Virus (HBV) DNA and Risk of HBV Reactivation in B-Cell Lymphoma: A Prospective Observational Study. *Clin Infect Dis*, 61: 719-729, 2015.
- 14) 楠本 茂: 抗体療法後のB型肝炎ウイルス再活性化のリスクとその対策, *医学のあゆみ*, 265: 89-94, 2018.
- 15) Aoyagi K, Ohue C, Iida K et al: Development of a Simple and Highly Sensitive Enzyme Immunoassay for Hepatitis C Virus Core Antigen. *J Clin Microbiol*, 37: 1802-1808, 1999.
- 16) Aoyagi K, Iida K, Ohue C et al: Performance of a conventional enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen in the early phases of hepatitis C infection. *Clin Lab*, 47: 119-127, 2001.
- 17) Tanaka E, Ohue C, Aoyagi K et al: Evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis C virus (HCV) core antigen with clinical sensitivity approximating that of genomic amplification of HCV RNA. *Hepatology*, 32: 388-393, 2000.
- 18) Tanaka Y, Takagi K, Fujihara T et al: High stability of enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen-evaluation before and after incubation at room temperature. *Hepato Res*, 26: 261-267, 2003.
- 19) Kimura T, Rokuhara A, Sakamoto Y et al: Sensitive enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigens and their correlation to virus load. *J Clin Microbiol*, 40: 439-445, 2002.
- 20) Rokuhara A, Tanaka E, Matsumoto A et al: Clinical evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigen; a marker distinct from viral DNA for monitoring lamivudine treatment. *J Viral Hepat*, 10: 324-330, 2003.
- 21) Morota K, Fujinami R, Kinukawa H et al: A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. *J Virol Methods*, 157: 8-14, 2009.
- 22) Inoue T, Ohike T, Ohne K et al: Clinical Evaluation of a Newly Developed Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for Hepatitis C Virus Core Antigen in Japan. *Jpn J Infect Dis*, 72: 285-291, 2019.
- 23) 三浦雅一: 葉酸測定の実状と課題. *ビタミン*, 85: 127-130, 2011.

- 24) 安田和人, 石渡幸久, 池田律子: Non Boil Radio-dilution Assayによる血清ビタミンB12・葉酸同時測定法の基礎的並びに臨床的検討. ビタミン, 64: 567-577, 1990.
- 25) Wentworth S, McBride JA, Walker WH: Chemiluminescence receptor assay for measuring vitamin B12 in serum evaluated. Clin Chem, 40: 537-540, 1994.
- 26) Omi K, Ando T, Sakyu T et al: A novel noncompetitive immunoassay detection system for haptens based on anti-metatype antibodies. Clin Chem, 61: 627-635, 2015.