

〈新技術特集〉

進化する標識体 アクリジニウムエステルについて

荻原 貴裕

Acridinium Ester

Takahiro Ogiwara

Summary The continuous evolution of acridinium ester (AE) chemiluminescence technology and its applications in immunoassay testing, is a success story. The story bears comparison to the evolution of the microprocessor, whose development over the years has increased the power and utility of desktop and laptop computers. Likewise, advances in AE technology have resulted in significant improvements in the performance and reliability of commonly used clinical assays.

Chemiluminescence has been a leading technology of choice for multiple diagnostics vendors and is likely to remain so as new immunoassay systems emerge. Siemens Atellica Solution IM Systems utilize AE chemiluminescence technology because of its flexibility and ability for optimization. In this paper, we review clinical and other benefits delivered by some of the latest AE-dependent assays from Siemens. The history of acridinium ester molecule evolution, reviewing specific details of AE properties, ongoing research findings, and modifications to the AE molecule that continue to drive critical advances in assay performance and diagnostic testing are also detailed.

Key words: Acridinium ester, Chemiluminescent, Immunoassay, ADVIA Centaur[®], Atellica Solution[®]

I. はじめに

現在の免疫測定法の基本形は、1956年から1960年にかけてSolomon Aaron BersonとRosaly Sussman Yalowによって発表された、放射性ヨウ素で標識した抗原と抗体との抗原抗体反応を利用したインスリンの超微量定量法であるラジ

オイムノアッセイ (radioimmunoassay : RIA)¹⁾⁻²⁾であり、Yalowは「ラジオイムノアッセイ法の開発」により1977年、ノーベル生理学・医学賞を受賞した。以降免疫測定法は今日に至るまで半世紀に渡り、様々な発展を続けている。

このRIA法は免疫検査における測定感度を一気にng/mL、pg/mLの濃度域まで高感度化して

シーメンスヘルスケアダイアグノスティクス株式会社
〒141-8673 東京都品川区大崎1-11-1
ゲートシティ大崎ウエストタワー
Tel: 03-3493-7670
Fax: 03-3493-7302
E-mail: takahiro.ogiwara@siemens-healthineers.com

Siemens Healthcare Diagnostics K.K.
Gate City Osaki West Tower 1-11-1 Osaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-8673 Japan
Tel: +81-3-3493-7670
Fax: +81-3-3493-7302

微量物質の定量測定を可能にしたが、標識体に放射性物質を用いる点で、取り扱い等に課題があった。その課題を1970~1980年代、標識体に非放射性物質を用いた測定法が開発され、汎用性・簡便性の向上とともに測定感度を高感度化した測定法が開発された。その代表例の一つがEIA (Enzyme immunoassay : EIA) 法である。EIA法の代表的な標識体はアルカリホスファターゼであり、この非放射性物質を用いた免疫測定法の出現で、免疫検査が放射性物質の取り扱い資格等の制限なく、広く多くの検査室で実施されるようになった。特に免疫検査において自動分析測定法の導入を可能にしたのはこの非放射性標識体の出現によるところが大きい。この後更なる高感度化を目指してCLIA (Chemiluminescent immunoassay) 法やECLIA (Electro chemiluminescent immunoassay) 法等が開発され自動分析測定法として日常的に実用化されているのは周知の通りである。現在、微量分析に広く用いられている化学発光物質の中にアクリジニウムエステルという物質があるが、この物質の特徴の一つとして化学構造を変化させることにより標識体そのものの特性を進化させることができるといった性質がある。我々、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社 (以下シーメンス) では、このアクリジニウムエステルの特性を生かして40種類以上の新たなアクリジニウムエステルを開発し、分析性能の向上を目指しており、その取り組みについて紹介する。

II. アクリジニウムエステルの特徴

1. 化学構造

アクリジニウムエステル (AE) とは、アクリジニウム環とエステル基のことを指す。Fig. 1にシーメンスにおける基本的なAEであるジメチルアクリジニウムエステル (Dimethyl acridinium ester: DMAE) を示す。このAEは加水分解安定性が高く、化学発光試薬の製品化に適するという特徴を持つ。構造的な特徴としては9位の炭素とエステルで、過酸化物の反応を起こさせるが、この反応を発生させるために窒素原子のアルキル基を配置している。フェノールにある2つのメチル基は化学発光安定性を向上させ、このエステル結合は安定性の向上とAE標識の強い発光量を得るために、重要な部分である。カルボン酸基は抗体や抗原などに結合する。

2. 発光メカニズム

AEは化学発光化合物であり化学反応による光の放出をする。シーメンスのAE技術では、AE分子が酸化剤と酸化補助剤に反応して発光を生じさせる。酸化剤の主成分は過酸化水素で、酸化補助剤の主成分は0.25 mol/L水酸化ナトリウムである。Fig. 2に、AEによる化学発光のメカニズムを示す。酸化剤に含まれる過酸化水素は、まず酸化補助剤の水酸化ナトリウムと反応し、ヒドロペルオキシドイオンを形成する。この反応種が、アクリジニウム環の9位に付加し、フェノール性のエステル結合に開裂を生じさせ

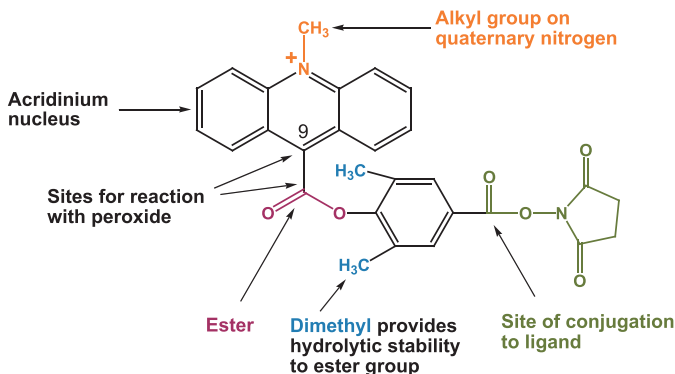


Fig. 1 Dimethyl acridinium ester: DMAE

The first generation DMAE with significantly improved hydrolytic stability suitable for commercialization of chemiluminescent reagents

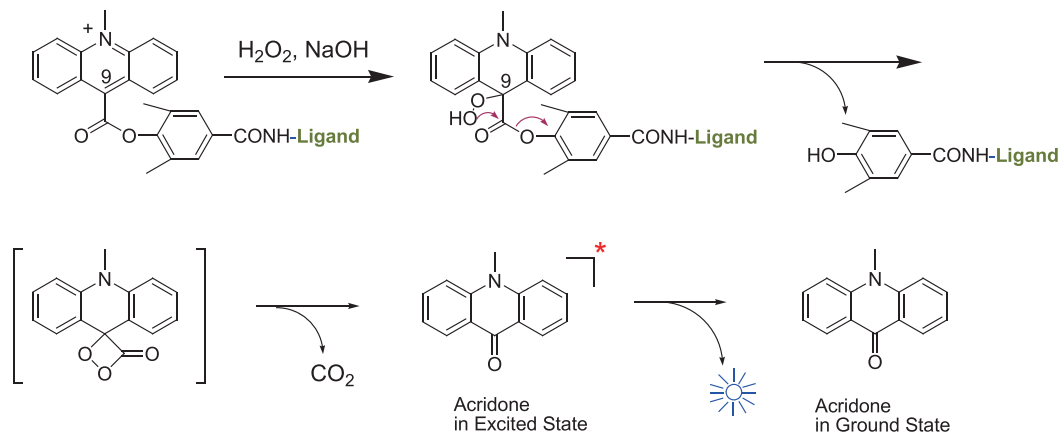


Fig. 2 Chemiluminescence mechanism

Light emitting acridone moiety separates from the phenolic group linked to the ligand. Consequently there is no quenching of the released light.

る。次に高エネルギージオキサノンが分解を促進し、N-メチルアクリドンの励起状態が形成される。励起状態のN-メチルアクリドンが基底状態に戻るときに、エネルギーが光体に置換し放出することにより発光する³⁾。

3. 波長

この発光プロセスにおける発光体はN-メチルアクリドンであり、これは発光時には結合物質（抗原や抗体）と分離するため、結合物質による光の減少が生じず、より効率的な発光を可能にしている⁴⁾。DMAEの最大発光波長は約430 nm、他のAEの最大発光長も400～500 nmであり、光電子増倍管の検出効果が高く、ノイズも低めに検出できる波長に設定されている。

4. 動態

またシーメンスのAEの発光スピードは非常に速く、通常発光は1～5秒間で終息する。この早い発光動態により、短いサイクルで光測定を行うことが可能となり、より短時間で効率的な検査処理を可能としている。

5. 分子量

シーメンスのAE標識体の分子量は非常に小さくDMAEの分子量は481、体積は約1nmであり、これは免疫グロブリンG抗体の体積の約1/300に相当する (Fig. 3) (免疫グロブリンG抗

体の分子量は約15万で、直径は7 nm)。EIA法で主に用いられている標識体のアルカリホスファターゼの分子量は約10万であり、これらに比較しても体積が非常に小さいためAEは分子を単独で標識化するだけでなく、抗体や抗原に複数個標識化すること等、様々な標識形態を取ることができる。さらにAE標識は分子量が小さいため、抗原抗体反応に対する阻害を抑えることが可能である。これらのことから、AEによる標識やコンジュゲートは小さな磁性微粒子の使用と共に効率の良い迅速な反応に貢献し、反応時間の短縮を可能にする。免疫生化学統合自動分析装置Atellica Solution[®]や免疫自動分析装置ADVIA Centaur[®]における最短のインキュベーションの時間は、約7.5分である。

6. 化学発光安定性

AEは化学発光安定性にも優れており、AE抗体コンジュゲートのpH7.7、4℃における化学発光の安定性試験において320日後でも、発光量は初日の90%を維持する（シーメンス社内データ）。標識の安定性が良好であるため試薬の長期保存が可能となり、試薬の機器装填後の高い安定性を得ることができる⁵⁾。

シーメンスではこれらのAEの特徴を生かして、高感度イムノアッセイに必要なとされる以下の4つのポイントを重点に新たなAEを開発してきた。

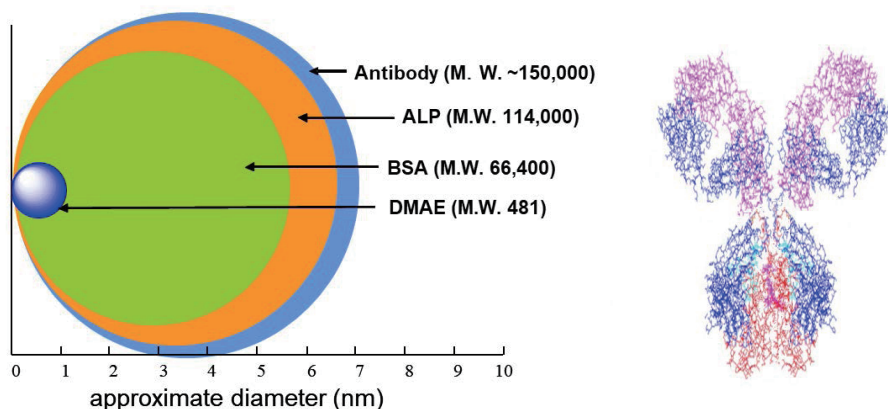


Fig. 3 Label size

AE (M.W. 481 / 1 nm)、BSA (M.W. 66,400 / 5nm)、ALP (M.W. 114,000 / 6nm)、Antibody (M.W. ~150,000 / 7 nm)

- 1) 発光効率が良く高い発光量が得られること。
- 2) 標識試薬や固相試薬の非特異性結合能が低いこと。測定感度は、往々にして、シグナルよりもバックグラウンドの影響を受ける傾向がある。つまり、優れた標識体は、非特異性結合能が低く、バックグラウンドを抑えられることが重要。
- 3) 抗体の親和性と特異性を維持できること。
- 4) ターゲットやシグナルの増幅が可能。

これらのことをベースに、シーメンスのAE研究における代表的な成果について紹介する。

Ⅲ. これまでに開発された主な AE

1. ジメチルアクリジニウムエステル(Dimethyl acridinium ester: DMAE) – 1988年 (Fig. 1)

先に例に挙げた、シーメンスの基本のAEである安定性を向上させたDMAE。これは2つのメチル基により加水分解安定性が増し、試薬としての化学発光の長期安定性が強化され、機器装填後の高い安定性を実現した。このDMAEを用いてシーメンスは、全自動イムノアッセイシステムにおける多種多様な測定項目の開発と製品化を可能にしてきた。

2. N-スルホプロピルジメチルアクリジニウムエステル (N-Sulfopropyl dimethyl acridinium ester: NSP-DMAE) – 1997年 (Fig. 4-a)

NSP-DMAEは親水性を高めるため、アクリ

ジニウム環にN-スルホプロピル基を含むのが特徴であり、従来のDMAEと比べ安定性が向上するだけでなく、発光量も1.5倍に増強している。さらにより優れた親水性と電気的中性により、非特異結合を抑えてバックグラウンドの低下に成功した⁶⁾。このAEは数々の感染症および各種ホルモン系の測定を実現するのに貢献した。

3. ヘキサエチレングリコール (Hydrophilic hexa (ethyleneglycol) acridinium ester: HEGAE) – 2003年 (Fig. 4-b)

このHEGAEは、フェノール基の非イオン親水性ポリエチレングリコール (PEG) 修飾により水溶性と発光効率をさらに向上させた。この標識体は水溶性に優れているため、洗浄効率が向上し非特異的結合能が抑えられバックグラウンドの更なる低下を実現した⁷⁾。

その結果、測定感度を高めた試薬の開発が可能になった。この原理は「ケミルミ BNP」試薬や「ケミルミ TSH3Ultra」試薬 (TSH3Ultra) 等に応用されている。

4. 高量子収率アクリジニウムエステル (High quantum yield acridinium ester : HQYAE) – 2007年 (Fig. 4-c)

HQYAEはアクリジニウム環にダイレクトに存在する2組のメトキシヘキサエチレングリコールエーテルを持ち、NSP-DMAEと比べ約3倍

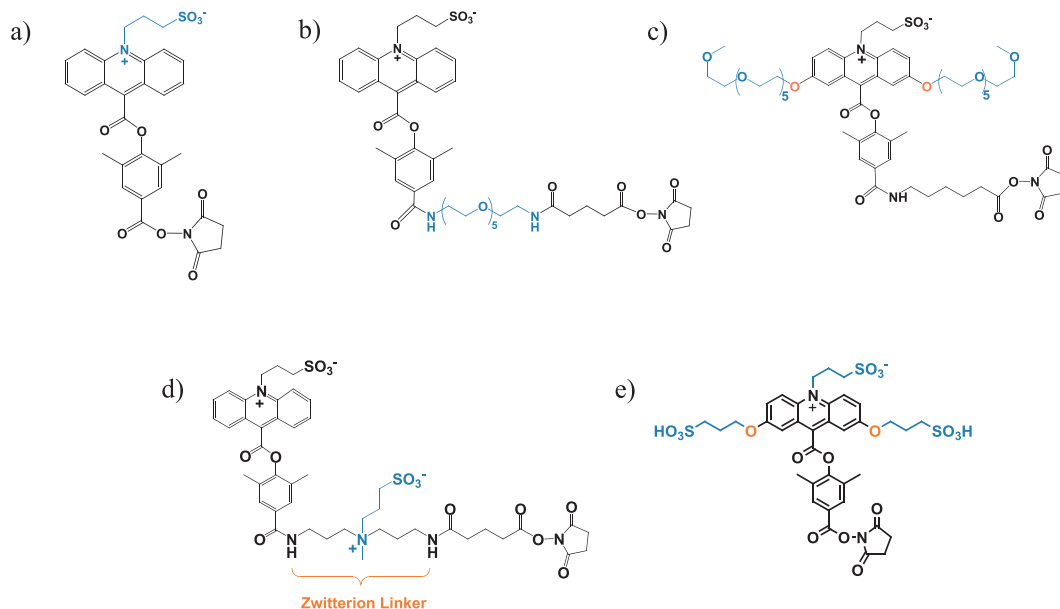


Fig. 4 Acridinium ester innovations at Siemens

- a) N-Sulfopropyl dimethyl acridinium ester: NSP-DMAE -1997
- b) Hydrophilic Hexa(ethyleneglycol) Acridinium Ester: HEGAE -2003
- c) High Quantum Yield Acridinium Ester : HQYAE -2007
- d) Zwitterion Acridinium Ester: ZAE -2011
- e) Trisulfopropyl Acridinium Ester: TSPAЕ -2015

の発光量を有する。またポリエチレングリコール基により非特異結合を回避し、高い親水性も併せ持つことができ高感度アッセイにおいて最も望まれる高い量子収率と低い非特異的結合能の2つの要素を両立させた典型的なAEである⁸⁾。このAEは「ケミルミ トロポニンIウルトラ」試薬 (TnI-UL) に採用されている。

5. 両イオン性アクリジニウムエステル (Zwitterion acridinium ester: ZAE) – 2011年 (Fig. 4-d)

ZAEは両性イオン・スルホベタイン・リンカーというつなぎ役の様な化合物を含有しているのが特徴である。両性イオンは同じ分子内の異なる場所に陽性と陰性の電荷を有する中性分子で、この架橋化合物は非イオン性だが極性と安定性に優れているため、親水性がさらに増し非特異的な結合を低く抑え測定感度を高める新しい効果的なAEである⁹⁾。ZAEは「ケミルミ HBsAgII」試薬、および「ケミルミ ビタミン 25(OH)D」試薬等で採用されている。

6. トリスルホプロピルアクリジニウムエステル (Trisulfopropyl acridinium ester : TSPAЕ) -2015年 (Fig. 4-e)

TSPAЕは3つのスルホ基をアクリドンに結合させ、強力なアニオン性と高い親水性を持ち、非特異結合を抑え従来の3倍の発光量を持ち、高いSignal/Noise比を実現した高感度化に適したAEで、「ケミルミ高感度hs-TnI」試薬 (hs-TnI) 等で採用されている。

この様にAEベースの化学発光技術における進歩は、量子収率、親水性、加水分解安定性、放出動態や柔軟性の向上をもたらし、アッセイに対してより良い感度、低濃度域精度、処理能力の向上、検体量の低減、装填後試薬安定性向上や有効期限の延長等々、様々なアッセイの基本性能の向上に貢献する。

シーメンスではこれらの新たなAEの開発において40件以上の米国特許をもち、それらの詳細は多数の論文審査のある専門誌記事内で報告されている⁹⁾⁻¹²⁾。

Ⅳ. 新しいアクリジニウムエステルの応用例

これまでに紹介したAEを用いた実際の測定法の開発応用例を紹介する。

1.「ケミルミ TSH3Ultra」(HEGAE)

TSH3Ultraは標識にHEGAEを用いTSH抗体のFabフラグメントのみ(linked to BSA carrier labeled with multiple HEGAE)を利用している(Fig. 5)。この標識には2つの特徴があり、1つ目は、Fabフラグメントのみの利用により測定に影響する干渉作用を除去または最小限にしている。これは干渉作用が主に抗体のFc領域で好発するためである。2つ目は、BSAを媒介として用いることによりAE標識の結合数を増加でき、発光量を増加している点である。これらを可能にする標識体が水溶性HEGAEである。

シーメンスの従来法TSH3測定では、第3世代の感度を有してはいたが、新たなTSH3Ultraは、初期のDMAEを使用した従来品と比べ、低濃度域の精度と感度が著しく向上している。HEGAE技術を用いることによりTSH3Ultraアッ

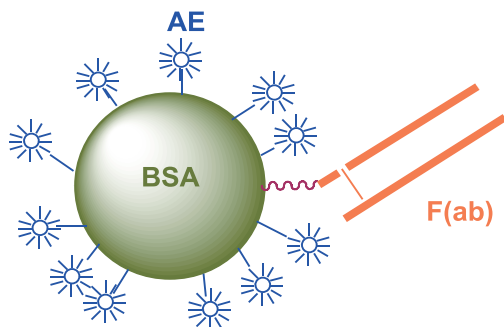


Fig. 5 Anti TSH-F(ab) : BSA:HEGAE

Table. 1 Performance comparison of TSH3 and TSH3Ultra

試薬	TSH3Ultra		
	TSH	Centaur	Atellica
測定機器	Centaur		
測定原理	1 Step サンド イッチ 法		
検体量 (μL)	200	100	75
測定時間(分)	18		14
処理能力(テスト/時間)	240		
LoB(μIU/mL)	0.01	0.001	
LoQ(μIU/mL)	0.026	0.008	0.007

セイでは検体量を従来法の200 μLから100 μLに半減させながら、Limit of Quantitaion (LoQ)は約3倍向上し、0.018 μIU/Lから0.008 μIU/Lと向上させることを実現した。(Table. 1) さらにこのTSH3Ultraは測定機器をADVIA Centaur®から最新型のAtellica Solution®に変えることにより、LoQを維持したまま検体量をさらに75 μLに削減し、測定時間を14分まで短縮させることに成功した。

2.「ケミルミ 高感度hs-TnI」(TSPAЕ)

シーメンスのトロポニンIアッセイは、一番初期のTnIアッセイから2回の大きな改良を実施した。最初の改良はTnI-ULアッセイであり、このアッセイでは量子収率の高いHQYAEを利用した。これにより従来のTnIアッセイに比べて検体量や測定時間を変えることなくLimit of Blank (LoB) を30 pg/mLから6 pg/mLに、LoQを330 pg/mLから30 pg/mLへと向上させた。

このTnI-ULを更に高感度化するために用いられたAEが、高い光収率を保ったまま、非特異的吸着を回避でき、HQYAEと同等の高い光量子収率に加えて、非特異的吸着を極限に抑えることで低いバックグラウンドを実現したTSPAЕである。このTSPAЕを用いて開発されたアッセイがhs-TnIである。このアッセイ法ではマウスモノクローナル抗体、ヒツジモノクローナル抗体、ヒトリコンビナントF(ab)抗体を用い、TSPAЕと合わせて非特異吸着の回避と高い発光量を併せ持ち高感度化を実現した。

hs-TnIのLoBとLoQはそれぞれ0.9 pg/mLと2.5 pg/mLであり、TnI-ULに比べても約10倍感度が向上している (Table. 2)。

また、このhs-TnIにおいても、測定機器を

Table. 2 Performance comparison of TnI, TnI-UL and hs-TnI

試薬	TnI		hs-TnI	
	TnI	TnI-UL	Centaur	Atellica
測定機器	Centaur		Atellica	
測定原理	1 Step サンド イッチ 法			
検体量 (μL)	100			
測定時間(分)	18		10	
処理能力(テスト/時間)	240		440	
LoB(pg/mL)	30	6	0.90	0.58
LoQ(pg/mL)	330	30	2.50	2.51
99%信頼区間(pg/mL)	40	70	47.34	45.20

ADVIA Centaur®からAtellica Solution®に変えることにより、LoQを維持したまま、測定時間を18分から10分に短縮させることに成功している。

V. まとめ

シーメンスは1980年代半ばからすでに安定したAEを用いて直接標識の化学発光技術の開発と使用を行ってきたパイオニアである。

これまでに我々は、数々のAE技術の研究の継続・拡大を行ってきた。その中で、取得および出願中の米国特許は40件を超える。我々のこの技術革新は、数々の新しいAEの発見を成し遂げ、加水分解安定性の強化、優れた発光効率、水溶性の向上、発光動態の高速化を実現した。また、環境に優しい製造工程におけるAE製造およびAEの新たな応用などの革新を達成した。

新たなAEは、シーメンスのADVIA Centaur®ならびにAtellica Solution®に多大な貢献をもたらし、測定項目を拡大し、測定感度向上・広い測定レンジ・高い精度、検体の低用量化を実現し、機器装填後安定性を高め、試薬の長期保存を可能にし、検査処理能力を向上させた。これらの向上は新しいアッセイにおいてのみならず既存のアッセイにおいてもその効果を発揮する。また、AEは機器の進化にも対応し、包装容器等外部条件を合わせれば、1980年代に開発された機器で現在の最新の試薬を測定することも、その逆の1980年代に開発された試薬を現在の最新機器で測定することも可能である。つまり、同じデータを継承したまま、試薬も機器も進化してアッセイ性能を向上させることができるのである。その一例が本稿でも紹介したトロポニンアッセイである。

シーメンスは、現在も新たなAEの開発を続けており、新たなAEであるIsopropoxyl di-zwitterion acridinium ester : ISODIZAEを用いたアッセイの開発を終えようとしている。

この様にAEは様々な性能の向上を実現し、多種多様な新しい免疫測定の開発において使用できる柔軟性を持つことから、最適な化学発光免疫測定技術の一つであり続け更なる開発に向

けて大きな潜在的可能性を持つソリューションであると考えられる。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

文献

- 1) Berson S A, Yalow R S, Bauman A, Rothschild M A and Newerly K: Insulin-I131 metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J Clin Invest*, 35: 170-190, 1959.
- 2) Yalow R S and Berson S A: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest*, 39: 1157-1175, 1960.
- 3) Natrajan A, Sharpe D, Wen D: Chemiluminescence from Alkoxy-Substituted Acridinium Dimethylphenyl Ester Labels. *Org Biomol Chem*, 9: 5092-5103, 2011.
- 4) Weeks I, Beheshti I, McCapra F, et al: Acridinium ester as high-specific-activity labels in immunoassay. *Clin Chem*, 29: 1474-1479, 1983.
- 5) Law SJ, Miller T, Piran U, et al: Novel poly-substituted acridinium esters and their use in immunoassay. *J Biolumin Chemilumin*, 4: 88-98, 1989.
- 6) Law SJ, Sotiriou L C, Natrajan A, Jiang Q, et al: Functionalized hydrophilic acridinium esters. *US Patent 5656426*, 1997.
- 7) Natrajan A, Sharpe D, Jiang Q: Acridinium ester labels having hydrophilic modifiers. *US Patent 6664043*, 2003.
- 8) Natrajan A, Sharpe D, Costello J, Jiang Q: Enhanced Immunoassay Sensitivity Using Chemiluminescent Acridinium Esters with Increased Light Output. *Anal Biochem*, 406: 204-213, 2010.
- 9) Natrajan A, Sharpe D, Wen D: Effect of Surfactants on the Chemiluminescence of Acridinium Dimethylphenyl Ester Labels and their Conjugates. *Org Biomol Chem*, 9: 5092-5103, 2011.
- 10) Natrajan A, Jiang Q, Sharpe D, Costello James: High quantum yield acridinium compounds and their uses in improving assay sensitivity. *US Patent 7309615*, 2007.
- 11) Natrajan A, Sharpe D, Costello J, Jiang Q: Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output. *Anal Biochem*, 408: 360, 2011.
- 12) Natrajan A, Wen D : Facile N-alkylation of acridine esters with 1,3-propane sultone in ionic liquids. *Green Chem*, 13: 913-921, 2011.