

●全自動副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）測定試薬 の開発

バイオサイエンス事業部 開発部 試薬開発G

鎌田 陽子
新谷 晃司
永田 喜彦
井上 益男

バイオサイエンス事業部 企画開発室

1. はじめに

副腎皮質刺激ホルモン（ACTH、Adrenocorticotropic Hormone、コルチコトロピン）は39個のアミノ酸からなるペプチドホルモンであり、主に副腎皮質ホルモン（コルチゾール等）の産生・分泌を促進する役割を持っている。

ACTHは視床下部から分泌されるコルチコトロピン放出ホルモン（CRH）の刺激により、下垂体前葉で α -MSH、 β -リポトロピン、 β -エンドルフィンなどと共通の前駆体であるプロオピオメラノコルチン（POMC）から作られ分泌される。^{1) - 3)} 分泌されたACTHは副腎皮質のACTH受容体に結合し、ステロイド合成酵素を活性化させ副腎からのステロイド分泌を促進する。また、コルチゾールなどの副腎性ステロイドホルモンは、視床下部や下垂体に作用してCRHやACTH分泌を抑制する（ネガティブフィードバック）。そのため、ACTHは視床下部・下垂体・副腎機能の異常部位の診断に有用とされている。^{4) - 5)}

また、CRHは食事やストレスなどの刺激、又は日内変動によって視床下部から分泌されるため、血漿ACTH濃度のみで鑑別するのではなく、他項目の検査（コルチゾール、DHEA-S等）や各種負荷試験を行い鑑別することも重要とされている。^{6) - 9)}

今回、新規にACTH測定試薬の開発を進め、全自動

短時間、高感度な測定試薬を構築したので報告する。

2. 測定原理と材料

開発したACTH測定試薬（Eテスト「TOSOH」II（ACTH））は抗原抗体反応を利用し、EDTA血漿中のACTHを測定する試薬であり、反応に必要な物質は凍結乾燥し、試薬カップ内に密封されている。

本試薬の測定原理は1ステップサンドイッチ蛍光酵素免疫測定法（FEIA法）であり、試薬カップに含まれるポリクローナル抗体は各々ACTH上の異なる部位（エピトープ）を特異的に認識し結合することにより免疫複合体（磁性担体結合抗体-抗原（ACTH）-酵素標識抗体）を形成する（図1）。測定は、試薬カップに抗原を含む検体を分注することにより、凍結乾燥体が溶解し抗原抗体反応が開始する。37°C、10分間の反応後、未反応の成分をB/F分離により洗浄除去し、酵素基質である4-メチルウンベリフェリルりん酸（4MUP）を分注後、経時的に蛍光強度を測定し単位時間あたりの4-メチルウンベリフェロン（4MU）の生成量を測定する。基質の蛍光強度は固定化された酵素量に依存し、さらにACTH抗原量に比例する。したがって、あらかじめ既知濃度のACTHを含む標準品を用いその蛍光強度とACTH濃度による標準曲線を作成し、ACTH濃度未知の患者検体の蛍光強度に相当するACTH濃度を標準曲線より算出することによりACTH

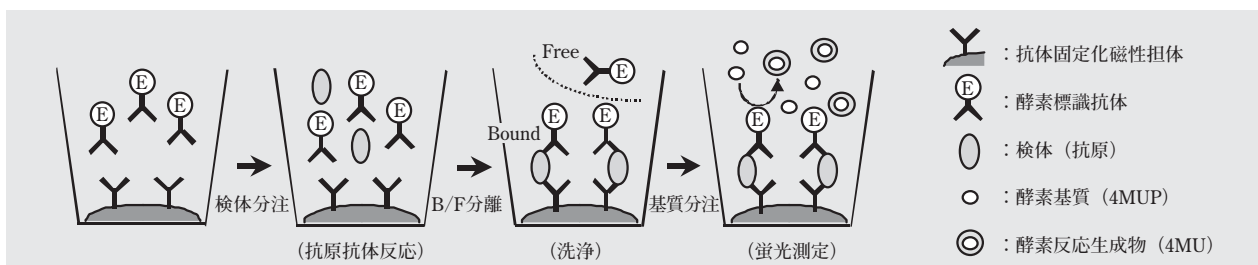


図1 ACTH測定の免疫複合体模式図

の定量が可能である。

測定の際、検体のカップへの分注、一定時間下での抗原抗体反応、B/F分離、基質分注、蛍光強度の測定は全自動エンザイムイムノアッセイ装置により自動で行われ、各試薬ともに測定開始から約18分後に結果が得られる。(試薬の主な仕様を表1に、全自動エンザイムイムノアッセイ装置AIA-2000を使用したときに得られる検量線の例を図2に示す。)

3. Eテスト「TOSOH」II (ACTH) の開発

ACTH測定はクッシング病やアジソン病のように異常高値のみられる疾患だけではなく、副腎性クッシング症候群やACTH分泌低下症のように異常低値のみられる疾患の鑑別にも重要とされている。そのため、ACTH測定試薬には健常者より低濃度の検体を再現性よく測定できる性能が求められる。開発を進めるにあたり、本試薬の目標感度を2 pg/mL以下に設定し、これを満たすよう試薬設計を行った。

表1 ACTH測定試薬の主な仕様

測定項目	副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)
測定原理	1ステップサンドイッチ蛍光酵素免疫測定法 (抗ACTHヤギポリクローナル抗体)
測定装置	全自動エンザイムイムノアッセイ装置 (AIA-1200シリーズおよびAIA-600は除く)
免疫反応温度・時間	37°C・10分
酵素反応温度・時間	37°C・5分
測定対象検体	EDTA血漿
サンプル量/分注水量	50 μL/50 μL
濃度単位	pg/mL
測定範囲	2.0-2000 pg/mL

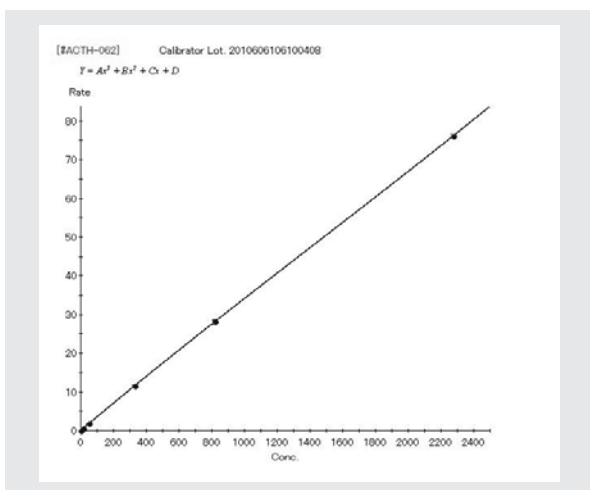


図2 ACTH測定試薬の検量線例

ACTHの測定試薬として短時間、高感度な測定試薬の開発をするためにACTHへの親和性の高いヤギポリクローナル抗体を選定した。十分な感度が得られるように酵素標識抗体作製方法の最適化と磁性担体への抗体固定化方法の最適化を検討し、目標仕様を満たす試薬にすることができた。さらに、免疫反応液組成について、検体中に含まれる可能性のある異好性抗体 (Heterophilic Antibodies、Human Anti-Goat Antibodies 等) との非特異的反応を抑えるためにブロッキング剤を添加し、また、安定性を向上すべく各種蛋白質・糖質濃度の最適化を行った。

標準品について、ACTHはガラス製の容器等に吸着しやすい性質を持ち合わせているが、各種蛋白質濃度を最適化することで容器への吸着を回避することができた。

これらの検討を行った結果、他社キットと同様の再現性を確保し、短時間・高感度な測定試薬を開発することができたので、評価結果を以下に報告する。

4. 基本性能評価

[1] 感度

15種の低ACTH濃度サンプルを5日間に渡り1日2回各1重測定することで10個の測定値を得た。変動係数 (CV) が10%の理論値を実効感度として算出したときの濃度は1.6 pg/mLとなり、良好な結果が得られた (図3)。

[2] 再現性

測定内再現性、測定間再現性試験を濃度の異なる3種のプール血漿 (EDTA) を用いて行った。使用した3種 (Low、Middle、High) は1回の測定分を小分け分注し使用まで凍結保存した。5重同時測定による測定内再現性試験の結果、各試料の測定値の変動係数

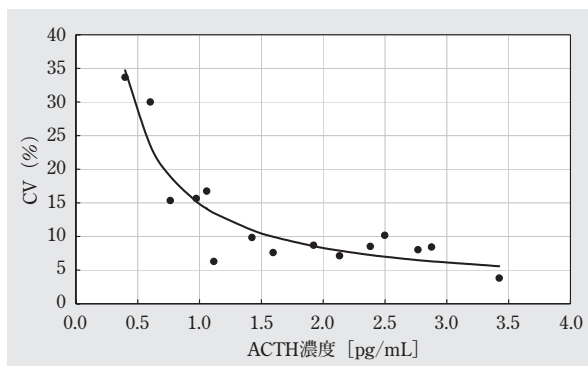


図3 感度：実効感度

(coefficient of variation ; CV) は1.5~2.7%であった。各試料を1日1回測定し、試薬、装置を変えずに20回繰り返し行って行った測定間再現性試験の結果 (検量線作成後95日間に渡って20回測定)、各試料の測定値のCVは2.1~3.6%であった (表2)。

[3] 希釈直線性

希釈直線性試験を濃度の異なる3種のEDTA血漿検体を用い4重測定にて行った。各々の検体を専用希釈液で5段階の希釈系列を作製し測定した結果、良好な希釈直線性を有していることが認められた (図4)。

[4] 共存物質および抗凝固剤の影響

検体中に含まれる可能性のある各物質をプール血漿 (EDTA) へ添加し、測定値への影響を確認した。共存物質としてはヘモグロビン、遊離型ビリルビン、抱合型ビリルビン、脂質、ヒト血清アルブミン、アスコ

表3 共存物質および抗凝固剤の影響

ヘモグロビン	[mg/dL]	440
遊離型ビリルビン	[mg/dL]	17
抱合型ビリルビン	[mg/dL]	19
脂質	[mg/dL]	1,600
ヒト血清アルブミン	[g/dL]	5
アスコルビン酸	[mg/dL]	20
EDTA	[mg/mL]	7
リウマチ因子	[IU/mL]	500

ルビン酸を、抗凝固剤としてはEDTAを各々表3に記載の濃度まで添加し測定した。その結果、未添加に対して測定値はいずれも±10%以内であったため、これら物質は表3に記載の濃度まで添加しても影響しないと判断した。

[5] ACTH断片及び関連ペプチドの影響

ACTH濃度0濃度の標準品に対してACTH断片 (1-10、1-17、1-24、11-24、18-39、22-39) 及び関連ペプチド (α -MSH、 β -MSH、 β -Endorphin) をそれぞれ100,000 pg/mL添加し測定したところ、何れも検出感度以下であった。

次に、これらのペプチドをEDTA血漿に添加したときの測定値への影響について検証した。EDTA血漿 (ACTH濃度：54.3 pg/mL) にそれぞれACTHの10倍量 (500 pg/mL) となるようにACTH断片及び関連ペプチドを添加し測定した。表4には測定値、添加前の測定値に対する測定値変化、及び交叉率 (%) を示した。測定値変化は±10%以内であり、交叉率は-0.6~0.0%であった。これらのペプチドが血中でACTHの10倍程度存在したとしても影響は少ないことが確認された (表4)。

表2 測定内および測定間再現性

	ACTH [pg/mL]		
	Pooled EDTA Plasma		
	Low	Middle	High
測定内再現性 (n=5)			
Mean	37.2	223.2	689.1
SD	1.0	3.8	10.6
CV [%]	2.7	1.7	1.5
測定間再現性 (20回)			
Mean	36.1	213.8	655.2
SD	1.3	4.4	13.6
CV [%]	3.6	2.1	2.1

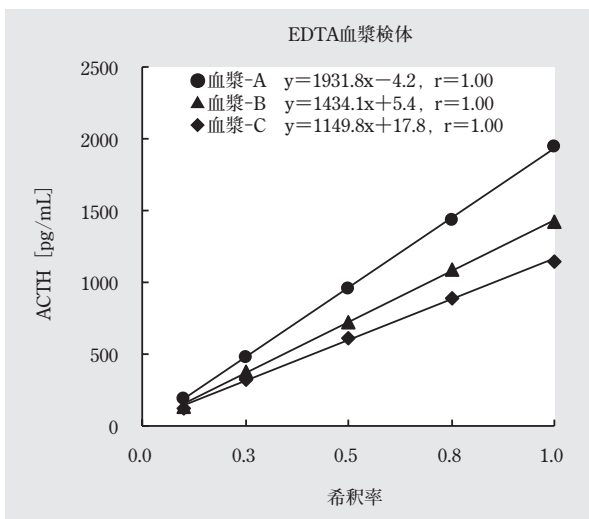


図4 希釈直線性：EDTA血漿検体

表4 ACTH断片及び関連ペプチドの影響

交叉反応物質	添加濃度 [pg/mL]	ACTH測定値 [pg/mL]	測定値変化 [pg/mL]	交叉率 [%]
添加なし	—	54.3	—	—
ACTH 1-10	500	54.3	0.0	0.0
ACTH 1-17	500	50.2	-4.1	-0.4
ACTH 1-24	500	49.3	-5.0	-0.6
ACTH 11-24	500	53.4	-0.9	-0.1
ACTH 18-39	500	53.4	-0.9	-0.1
ACTH 22-39	500	52.8	-1.5	-0.1
α -MSH	500	50.2	-4.1	-0.3
β -MSH	500	53.8	-0.5	-0.1
β -Endorphin	500	53.0	-1.2	-0.2

5. 検体の安定性評価

[1] 温度の影響

ACTHは血中の蛋白質分解酵素（プロテアーゼ）により分解が促進されるため、検体中のACTHは室温安定性が低いことが知られている。^{10, 11)} そこで健常者検体20例（11.3～50.5 pg/mL）について25℃と5℃の温度条件でそれぞれ保存して測定することで検体中のACTHの安定性を検証した。図5では0時間目に測定した濃度値を100%として回収率を算出し、20例の平均値をプロットした（y軸誤差範囲は±2倍標準偏差（SD））。

結果、25℃では回収率の平均値は2時間で95%、10時間で87%に減少したが、5℃では25時間経過しても回収率の平均値は92%までの減少に留まった。ACTHを測定するには検体を劣化させないために室温に長時間置かないことが重要である。また、高濃度実検体を含む5例を用いた別の評価では、-20℃で2ヶ月間保存した場合、凍結保存前に測定した濃度値に対する回収率が99～103%であった。検体を冷蔵（5℃）保存しても少しずつ劣化は進むため、すぐに測定できないと判断した場合は速やかに-20℃以下で凍結保存することが推奨される。

[2] 溶血の影響

EDTA血漿中のACTHを測定する場合、溶血によって暴露した赤血球由来のプロテアーゼがACTHの分解を促進するため、溶血の認められる検体は使用を避けることが推奨される。そこで赤血球溶血物をEDTA血

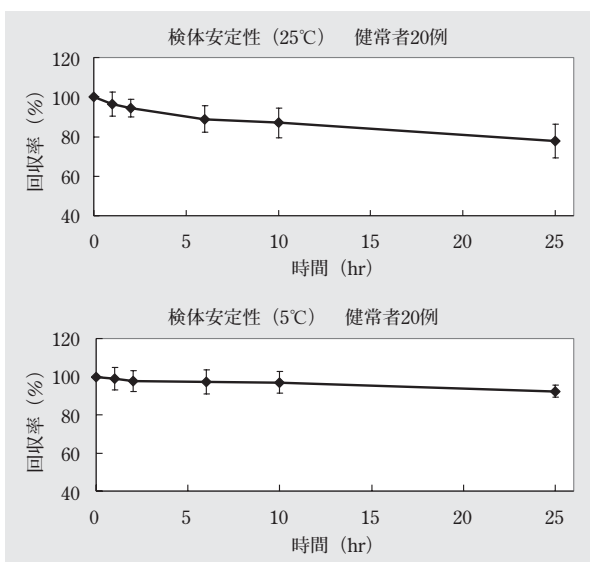


図5 検体の安定性：温度の影響

漿検体に添加した場合のACTHの安定性について検証した。

溶血検体中のACTHの安定性を評価するため、以下の方法で偽似溶血検体を調製した。EDTA入り採血管にて採血し遠心分離して得た赤血球画分を生理食塩水にて3回洗浄した後、純水を赤血球画分に対して1：1の割合で加えて溶血させ、遠心分離して得られた上清を溶血サンプルとして用意し、ヘモグロビン濃度を測定した。EDTA血漿検体6種類（ACTH濃度 18.5～1143 pg/mL）に対してそれぞれ10：1の割合で上述の溶血サンプルを添加し、ヘモグロビン濃度が0 mg/dL、38.1 mg/dL、190.3 mg/dLの偽似溶血検体を調製した。これを用いて室温（23℃）におけるACTHの安定性を評価した。

ヘモグロビン濃度0 mg/dLの各検体を0時間目に測定した時の濃度値を100%として濃度回収率を算出しプロットした（図6）。ACTHの安定性は検体によって若干拳動が異なるが、何れの検体も溶血サンプルを添加することで安定性が低下した。ヘモグロビン濃度190.3 mg/dLの検体では室温2時間経過後に測定値が39～73%まで低下した。これらの結果から、正確な測定値を得るためには溶血の認められる検体は使用を避ける必要があると考える。溶血サンプルを加えてへ

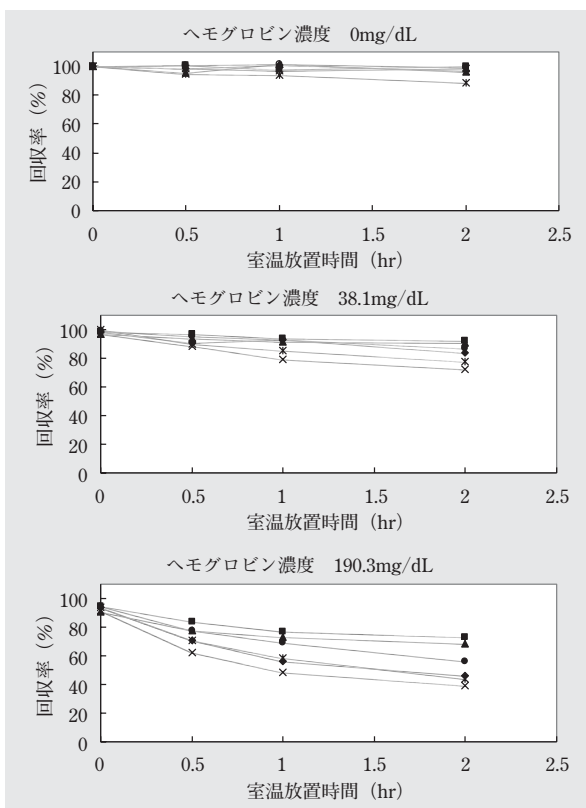


図6 検体の安定性：溶血の影響

モグロビン濃度が38.1 mg/dLとなると、検体は赤みを帯びた状態となったため、外観によって溶血の有無をある程度判断できると思われた。

6. 臨床上的の有用性確認

[1] 健常者の濃度分布

健常者215例について、午前8時～12時に採血したEDTA血漿中のACTH濃度を測定した結果のヒストグラムを図7に示す。ノンパラメトリック法により95%基準範囲を求めた結果、7.7～63.1 pg/mLであった。

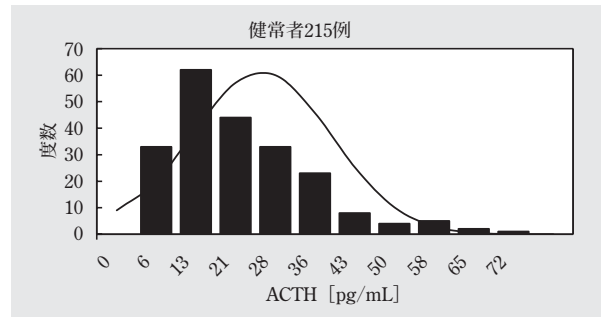


図7 健常者の濃度分布

[2] 他社キットとの相関性

EDTA血漿検体を使用しEテスト「TOSOH」II (ACTH) [y] とA社IRMA法 [x]、B社IRMA法 [x] およびC社ECLIA法 [x] で測定し、測定値の比較を行った結果 (図8)、A社IRMA法に対して相関係数

0.989、回帰係数0.970、B社IRMA法に対して相関係数0.962、回帰係数1.034と良好な相関性が認められた。C社ECLIA法に対しては高濃度域において本試薬の方が高値に測定される検体が数例みられたため、全濃度域では相関係数0.970、回帰係数1.25、2.0-250 pg/mL範囲では相関係数0.988、回帰係数1.02となった。

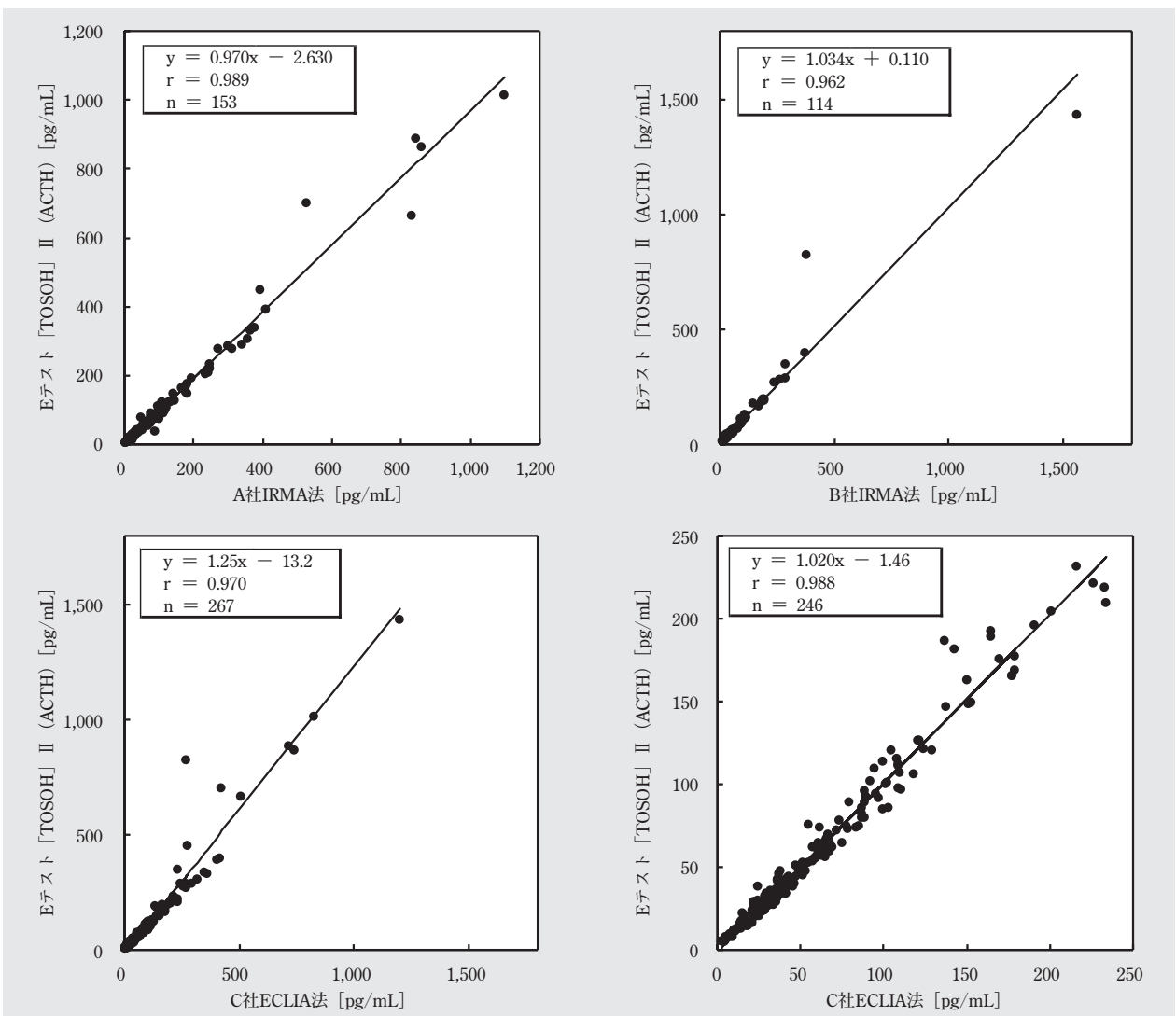


図8 Eテスト「TOSOH」II (ACTH) と他社キットとの相関性

[3] HPLC法による検体の分画および大分子型ACTHとの交叉性の検証

ACTHは、脳下垂体においてプロオピオメラノコルチン (POMC) から酵素 (PC1/PC3) により切断されることで産生され、分泌される。一方、下垂体腺腫の一部や異所性ACTH産生腫瘍においては、プロセシングの中間体にあたる大分子型ACTH (または中間型ACTH) の血中濃度が上昇する例が報告されている。¹²⁾ 大分子型ACTHとはACTHのアミノ酸配列を含む分子でACTHより分子量の大きいものの総称であるが、ACTH測定キットにおいてはこれらの分子を測定することにより測定値が高値に報告される可能性がある。認識部位の違いにより測定される程度は測定キットによって差が認められるが、今のところACTHだけを測定するキットは市販されていない。

大分子型ACTHとの交叉性を検証するため、大分子型ACTHを産生する肺小細胞癌細胞 (DMS79) の培養上清とACTH1-39 (合成物) を健常者血漿に添加することで、大分子型ACTHを含む擬似的な検体を作製し、これをサイズ排除カラム (東ソー製HPLCカラム) により分画した。各画分を今回開発したACTH測定試薬およびC社ACTH測定試薬により測定することで測定される分子群を比較した。

分画条件および結果は表5、図9に示した。本試薬 (Eテスト「TOSOH」II (ACTH)) ではACTHのピークの他に高分子側に2つのピークが認められるのに対し、C社ACTH測定試薬では高分子側のピークは1つであった。この結果から本試薬ではC社ACTH測定試薬より大分子型ACTHを多く測定していると考えられる。特に、下垂体腺腫や異所性ACTH産生腫瘍を疑う症例の場合は、他の検査成績や臨床症状を考慮して総合的に判断することが推奨される。

表5 検体のサイズ排除分画条件

カラム	ガードカラム (TSKguardcolumn SWxl PEEK) +BioAssist G2SWxl PEEK (7.8mmID×30cm) ×2本連結 (東ソー株式会社製)
溶離液	0.05% TFA, 50 mmol/L KCl
流速	0.5 mL/min
操作	検体の酸性化 [文献13参照] (検体に1/5量の1mol/L HCl, 1.6% Glycineを添加) ↓ 0.45 μmフィルターろ過 ↓ インジェクション ↓ フラクション分取 (23分から63分を1分ごとに分取) ↓ ACTH測定試薬にて測定

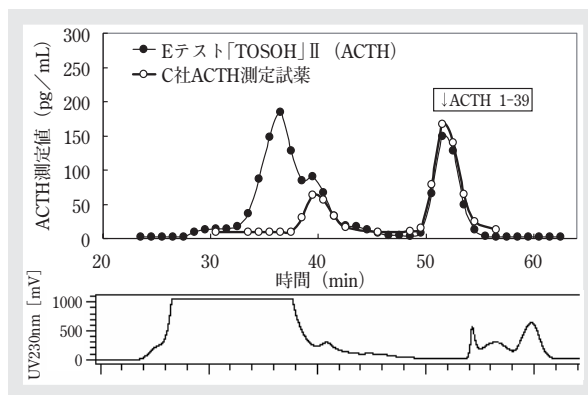


図9 サイズ排除分画の測定結果

7. まとめ

今回開発したACTH測定試薬を用いて、基本性能、検体の安定性および臨床上的有用性を確認した。

基本性能において、測定内、測定間再現性は3.6%以内と良好であり、検体の希釈直線性も良好であった。検体中の共存物質や抗凝固剤、ACTH断片及び関連ペプチドの影響は許容範囲内であることが確認された。実効感度として変動係数 (CV) が10%の理論値を算出したときの濃度は1.6 pg/mLとなり、良好な結果が得られた。

ACTHの検体中での安定性は温度と溶血の影響について評価した。ACTHは検体中のプロテアーゼの影響により分解が促進されるため、室温条件の方が劣化は早かった。また、溶血物を検体に添加することで検体の劣化は早まった。正確なACTH測定値を得るためには検体を室温に長時間置かないこと、溶血の認められる検体は使用を避けることが必要である。

他社キットとの相関性試験は他社3法と良好な相関性を示した。開発したACTH測定試薬 (Eテスト「TOSOH」II (ACTH)) において他社キットより高い濃度値となる検体が数例見受けられたが、これは大分子型ACTHとの交叉性の違いによるものと推察された。そのためHPLCによる検体のサイズ排除分画方法を検討し、大分子型ACTHとACTHを短時間で分画できるようにした。この方法で、大分子型ACTHを含む擬似検体を分画し各画分を測定したところ、本試薬では高分子側に2つの分子群、C社ACTH測定試薬では高分子側に1つの分子群を測定していることが確認された。実検体においても同様の試験を行ったところ、高濃度検体でキット間の測定値間差のあるものは高分子側にピークを確認している。

健常者検体では大分子型ACTHはほとんど存在しな

いが、ストレス下にある場合やメチラボン負荷試験時には分泌される可能性があり、また、下垂体腺種の一部や異所性ACTH産生腫瘍において血中濃度が上昇するとの報告があるため、これらの場合においては本来の濃度値より高値に報告され、コルチゾール測定値と乖離する可能性が示唆される。しかし、ACTH産生下垂体腺腫でクッシング症状を伴わない場合など、ACTH濃度が正常であっても大分子型ACTHの血中濃度が上昇している症例があり、これらを見逃さないためには大分子型ACTHを測定することは重要である。^{12, 14, 15, 16} 今後は疾患別の評価などを行うことで測定の有用性を確認していくことが必要であると思われる。

8. 謝 辞

本開発において臨床的有用性の確認に対してご協力していただいた各先生方に厚く御礼申し上げます。

虎の門病院 臨床検体検査部 米山彰子先生
遠藤繁之先生
川崎理一先生
戸来孝先生

また、本文書作成におきましてご助言を頂きました先生に厚く御礼申し上げます。

帝京大学ちば総合医療センター 片上秀喜先生

- 11) 湯浅眸、他、日本臨床検査自動化学会会誌、34、1、51-55 (2009)
- 12) 小西美絵乃、他、日本内分泌学会雑誌サプリメント、85、173-176 (2009)
- 13) Ratter S.J., J.Endocr., 85, 359-369 (1980)
- 14) 片上秀喜、ACTH RELATED PEPTIDE、21、印刷中
- 15) 松野彰、他、日本内分泌学会雑誌サプリメント、80、94-96 (2004)
- 16) 片上秀喜、他、日本内分泌学会雑誌サプリメント、85、89-90 (2009)

9. 文 献

- 1) Schoneshofer M., et al. Clinical Chemistry, 27, 1875-1877 (1981)
- 2) Fenger M., et al. Biochem. J., 250, 781-788 (1988)
- 3) White A., et al. J Clin Endocrinol Metab, 85, 4771-4775 (2000)
- 4) 須田俊宏、臨床病理、47、1159-1164 (1999)
- 5) 二川原健、他、血圧、12、744-748 (2005)
- 6) Castro M., et al. J Clin Endocrinol Metab, 84, 878-882 (1999)
- 7) Suda T., et al. Endocrine Journal, 56, 469-476 (2009)
- 8) Tsagarakis S., et al. J Clin Endocrinol Metab, 87, 1646-1653 (2002)
- 9) Biller B. M., et al. J Clin Endocrinol Metab, 93, 2454-2462 (2008)
- 10) Lambert A., et al. Clinical Endocrinology, 23, 253-261 (1985)