

●全自動サイログロブリン測定試薬の開発

バイオサイエンス事業部 開発部 試薬開発 G

三澤 孝一
遠田 容子
新谷 晃司

1. はじめに

サイログロブリン (Tg) は、2つのサブユニットからなる甲状腺に特異的な分子量約66万の糖蛋白で、甲状腺濾胞細胞内に貯えられているコロイドの主成分であり、甲状腺組織内では甲状腺ホルモンの合成、貯蔵および分泌に重要な役割をはたしている¹⁾。

血中の Tg 濃度が高値を示す疾患には、甲状腺腫、バセドウ病、亜急性甲状腺炎、橋本病および甲状腺癌などがある^{2), 3)}。甲状腺乳頭癌など甲状腺分化癌の場合、甲状腺組織摘出後に血中 Tg 濃度は低値となる一方、再発、転移が認められる場合には血中 Tg 濃度は上昇を示す傾向にあり、術後の経過観察、術後の再発や転移の診断に有用とされている⁴⁾⁻¹⁰⁾。

血中 Tg の測定においては、甲状腺自己抗体である抗 Tg 抗体 (TgAb) の影響により正確な測定結果が得られないという問題点もあり^{11), 12)}、TgAb の影響を低減した測定試薬が望まれている。従来、自己抗体の影響を受け難いキットとして報告のある A 社 IRMA (immunoradiometric assay) 法¹³⁾⁻¹⁵⁾ が主として使用されてきたが、測定時間の短縮や全自動測定による検査効率の向上も望まれている。

今回、我々は血中 TgAb 存在の有無にかかわらず精度よく測定できるよう、抗 Tg モノクローナル抗体を組合せ、Tg 測定試薬の AIA 試薬化を進め、全自動酵素免疫アッセイ装置 AIA シリーズを用いた短時間、高感度な測定試薬の開発を行ったので報告する。

2. 測定原理と材料

開発した Tg 測定試薬 (E テスト「TOSOH」II (サイログロブリン)) は抗原抗体反応を利用し、その反応に参与する物質が凍結乾燥体として試薬カップに封入されている。

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 (FEIA) 法であり、試薬カップに含まれるモノクローナル抗体は各々 Tg 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 (Tg)-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、凍結乾燥体は溶解され抗原抗体反応が開始する。37°C、10分間の反応後、未反応の抗原および酵素標識抗体を 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 Tg 抗原量に比例する。したがって、あらかじめ既知濃度の Tg を含む標準品を用い、その蛍光強度と Tg 濃度による標準曲線を作成し、Tg 濃度未知の患者検体の蛍光強度に相当する Tg 濃度を標準曲線より算出することにより Tg 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酵素免疫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、

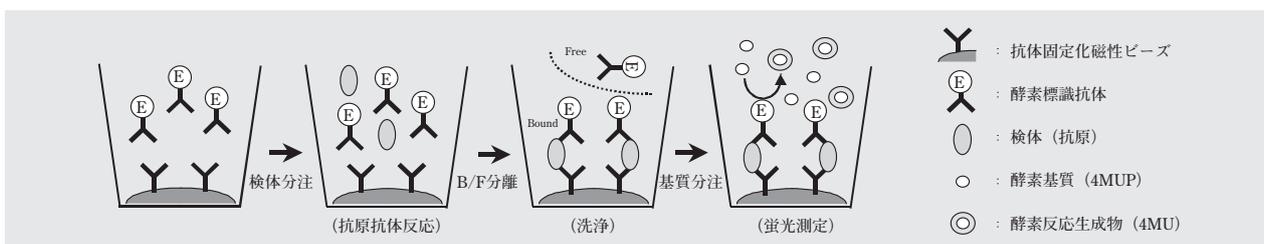


図1 Tg測定の免疫複合体模式図

全自動エンザイム免疫アッセイ装置 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. AIA 試薬の開発

Tg の測定試薬として TgAb の影響を受け難く、かつ短時間、高感度な測定試薬の開発をするために Tg への親和性の高いマウスモノクローナル抗体を組み合わせることとした。固定化抗体について固定化量等の条件を最適化し、酵素標識抗体については酵素を結合させる架橋試薬の使用量等を最適化し十分な感度を得られるようにした。

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) 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を最適化した。その結果、TgAb 陰性・陽性例にかかわらず再現性お

よび希釈直線性は同等であり、TgAb の影響を受け難いキットとして報告のある A 社 IRMA 法、および全自動測定キットである B 社 ECLIA (電気化学発光免疫測定) 法と良好な相関性を有し、かつ短時間・高感度な測定試薬を開発することができた。

なお、標準品の Tg 濃度は、IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) CRM457 を基準として決定した。

4. 基本性能評価¹⁶⁾

(1) 感度試験

自社 TgAb 測定試薬 (E テスト「TOSOH」II (TgAb)) にて 13.6 IU/mL を基準値として、TgAb が陰性であった 15 例の低 Tg 濃度試料を 5 日間に渡り 1 日 2 回各 1 重測定することで、各試料 10 個の測定値を得た。なお、使用した試料は 1 回の測定分を小分け分注し使用まで -80°C にて凍結保存した。結果、変動係数 (coefficient of variation : CV) が 20% の理論値を実効感度として算出したときの濃度は 0.08 ng/mL を示した (図 3)。

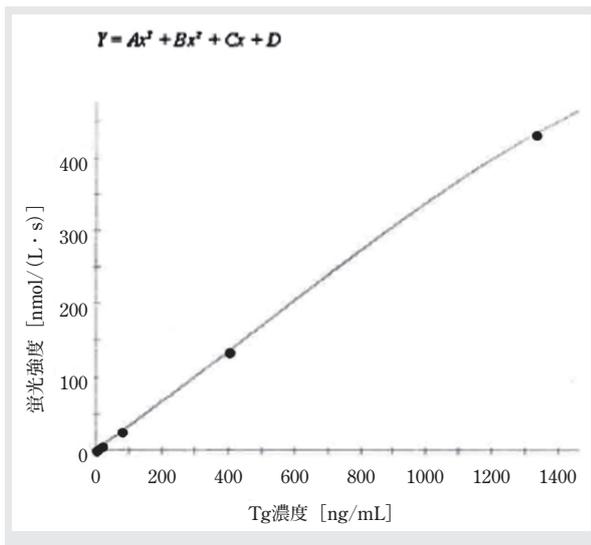


図 2 Tg測定試薬の検量線例

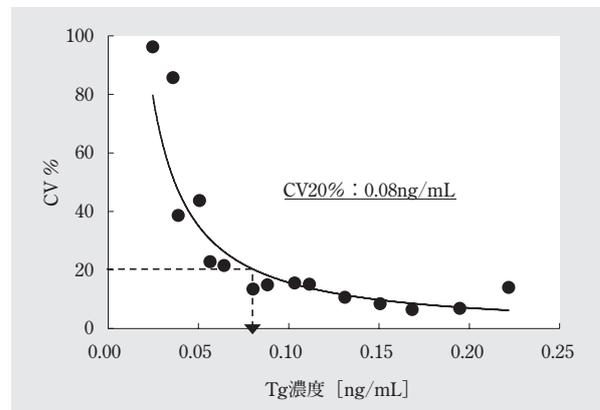


図 3 実効感度

表 1 Tg 測定試薬の主な仕様

| | |
|-----------|--|
| 測定項目 | 血中サイログロブリン |
| 測定原理 | 1ステップサンドイッチ蛍光酵素免疫測定法 (抗サイログロブリンマウスモノクローナル抗体) |
| 測定装置 | 全自動エンザイム免疫アッセイ装置 (AIA-2000, AIA-1800, AIA-21, AIA-900, AIA-600 II, AIA-360) |
| 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 | 血清または血漿 (ヘパリン血漿) |
| 測定範囲 | 0.1~1,000ng/mL |
| 検体量/分注水量 | 30 μL / 100 μL |
| 標準品形状 | 凍結乾燥品 (6 濃度) |
| 濃度単位 | ng/mL |

(2) 再現性試験

同時再現性および日差再現性について、自社 TgAb 測定試薬にて TgAb が陰性であった Tg 濃度の異なる 3 種の血清および血漿（ヘパリン血漿）と、TgAb が陽性であった Tg 濃度の異なる 3 種の血清を用いて行った。使用した試料は 1 回の測定分を小分け分注し使用まで -80℃にて凍結保存した。5 重同時測定による再現性試験の結果、TgAb 陰性試料を測定したときの CV は 2.3 ~ 3.4%、TgAb 陽性試料を測定したときの CV は 2.2 ~ 3.6%であった（表 2）。1 日 2 回各 2 重測定し、試薬、装置を変えずに 20 回繰り返して行った日差再現性試験の結果（検量線作成後 95 日間）、TgAb 陰性試料を測定したときの CV は 3.3 ~ 3.7%、TgAb 陽性試料を測定したときの CV は 3.3 ~ 3.9%であった（表 3）。

表 2 同時再現性

| TgAb 陰性試料 (13.6 IU/mL 以下) | | | | |
|---------------------------|--------------|----------------|------------|--------|
| 血清 | TgAb [IU/mL] | Tg 平均値 [ng/mL] | SD [ng/mL] | CV [%] |
| A | 5.3 | 20.6 | 0.7 | 3.3 |
| B | 6.4 | 220.5 | 5.9 | 2.7 |
| C | 12.7 | 767.7 | 21.2 | 2.8 |
| 血漿 | TgAb [IU/mL] | Tg 平均値 [ng/mL] | SD [ng/mL] | CV [%] |
| A | 1.3 | 21.9 | 0.7 | 3.4 |
| B | 3.5 | 212.7 | 4.9 | 2.3 |
| C | 1.4 | 781.3 | 18.3 | 2.3 |
| TgAb 陽性試料 | | | | |
| 血清 | TgAb [IU/mL] | Tg 平均値 [ng/mL] | SD [ng/mL] | CV [%] |
| D | 579.4 | 11.9 | 0.4 | 3.6 |
| E | 230.7 | 51.3 | 1.1 | 2.2 |
| F | 121.9 | 229.5 | 5.2 | 2.3 |

表 3 日差再現性

| TgAb 陰性試料 (13.6 IU/mL 以下) | | | | |
|---------------------------|--------------|----------------|------------|--------|
| 血清 | TgAb [IU/mL] | Tg 平均値 [ng/mL] | SD [ng/mL] | CV [%] |
| A | 5.3 | 21.2 | 0.8 | 3.6 |
| B | 6.4 | 215.5 | 7.9 | 3.7 |
| C | 12.7 | 737.8 | 25.3 | 3.4 |
| 血漿 | TgAb [IU/mL] | Tg 平均値 [ng/mL] | SD [ng/mL] | CV [%] |
| A | 1.3 | 22.6 | 0.8 | 3.3 |
| B | 3.5 | 210.9 | 7.3 | 3.4 |
| C | 1.4 | 765.2 | 26.2 | 3.4 |
| TgAb 陽性試料 | | | | |
| 血清 | TgAb [IU/mL] | Tg 平均値 [ng/mL] | SD [ng/mL] | CV [%] |
| D | 579.4 | 11.7 | 0.5 | 3.9 |
| E | 230.7 | 51.6 | 1.7 | 3.3 |
| F | 121.9 | 220.2 | 7.6 | 3.5 |

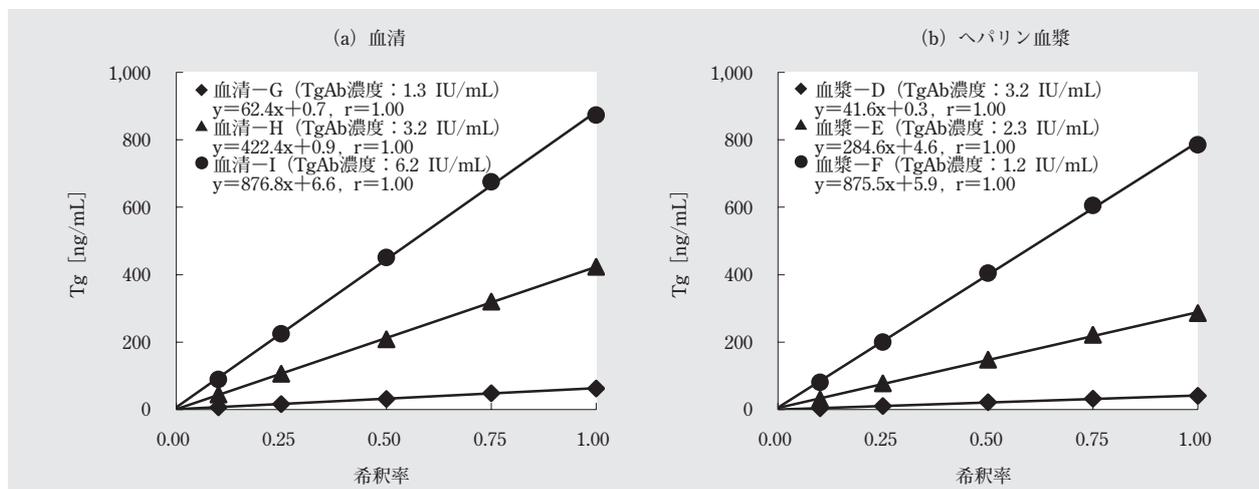


図 4 希釈直線性 (TgAb陰性) : (a) 血清、(b) ヘパリン血漿

(3) 希釈直線性試験

自社 TgAb 測定試薬にて TgAb が陰性であった Tg 濃度の異なる 3 種の血清および血漿（ヘパリン血漿）と、TgAb が陽性であった Tg 濃度の異なる 3 種の血清を用いて行った。各々の試料を専用希釈液で 5 段階の希釈系列を作製し測定した結果、TgAb 陰性試料（図 4）、TgAb 陽性試料（図 5）ともに原点に収束する良好な希釈直線性能を有していることが認められた。

(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高濃度で、自社 TgAb 測定試薬にて TgAb が陰性であるプール血清およびプール血漿（ヘパリン血漿）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

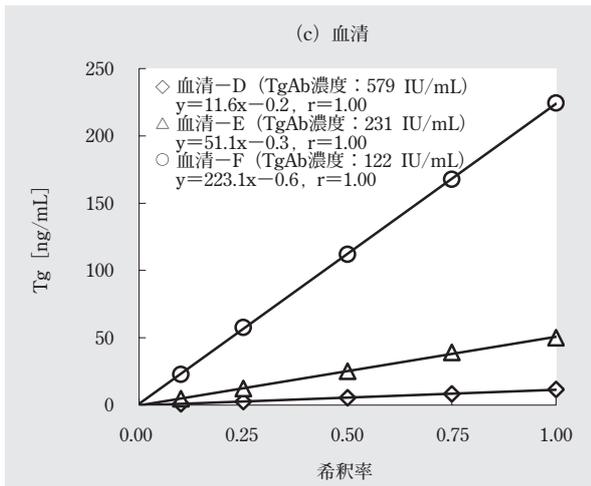


図5 希釈直線性 (TgAb陽性) : (c) 血清

ト血清アルブミン、アスコルビン酸を、抗凝固剤としてはヘパリンを各々表4に記載の濃度範囲で添加し測定した結果、未添加に対する測定値はいずれも100±10%以内であり、これら物質による影響は添加量上限まで認められないと判断した。

(5) 健常者の濃度分布

健常者142例について、血清中のTg濃度を測定した結果のヒストグラムを図6に示す。ノンパラメトリック法による95%基準範囲を求めた結果、2.68～33.2 ng/mLであった。

(6) 他社キットとの相関性

77例の血清検体を使用し、TgAbの影響を受け難いと報告のあるA社IRMA法(x)と本試薬(y)との相関性をDeming法による回帰分析で確認した結果、自社TgAb測定試薬にて13.6 IU/mLを基準値として分類したTgAb陰性45例(TgAb; 0.7～12.8 IU/mL)では相関係数(r) 0.999、回帰係数0.917、y切片0.847、TgAb陽性32例(TgAb; 14.5～2,960 IU/mL)では相関係数(r) 0.996、回帰係数0.924、y切

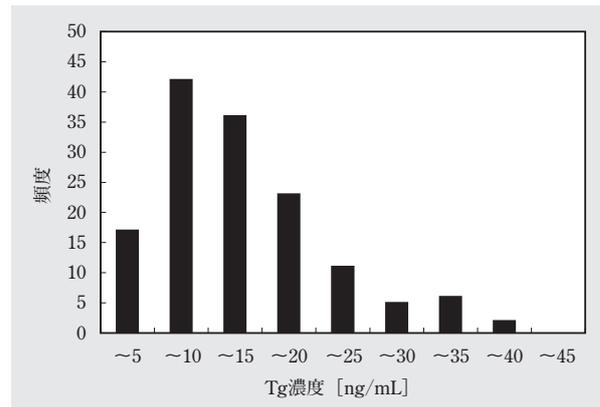


図6 健常者の濃度分布

片-3.117であり、TgAb陰性・陽性例にかかわらず、A社IRMA法と良好な相関性が認められた(図7)。

185例の血清検体を使用し、全自動測定キットのB社ECLIA法(x)と本試薬(y)との相関性をDeming法による回帰分析で確認した結果、自社TgAb測定試薬にて13.6 IU/mLを基準値として分類したTgAb陰性128例(TgAb; 0.2～11.8 IU/mL)では相関係数(r) 0.999、回帰係数1.050、y切片2.818、TgAb陽性57例(TgAb; 13.6～25,300 IU/mL)では相関係数(r) 0.999、回帰係数1.014、y切片-0.552であり、TgAb陰性・陽性例にかかわらずB社ECLIA法と良好な相関性が認められた(図8)。

(7) 血清検体と血漿検体の相関性

血漿は血液凝固を伴わないため、サンプル調製に要する時間の短縮、被検体回収量などの点から血清より優れている。そのため、本試薬が血漿(ヘパリン血漿)を検体とすることができるか検討した。同時に同一人物から採取した血清とヘパリン処理採血から得られた血漿との相関性をDeming法による回帰分析で確認した結果(血清(x)、ヘパリン血漿(y))、127例での相関係数(r) 0.999、回帰係数1.018、y切片-0.655と良好な相関性が認められた(図9)。したがって、本

表4 共存物質および抗凝固剤の影響

| | 添加量 | プール血清 回収率 [%] | プール血漿 回収率 [%] |
|-----------|------------------|------------------|------------------|
| ヘモグロビン | 22～450 [mg/dL] | 97.5～101.7 | 99.2～104.5 |
| 遊離型ビリルビン | 0.9～17.0 [mg/dL] | 97.1～104.7 | 97.3～103.1 |
| 抱合型ビリルビン | 0.9～17.9 [mg/dL] | 98.0～105.0 | 96.4～102.2 |
| 脂質 | 83～1,660 [mg/dL] | 96.4～103.1 | 96.3～103.5 |
| ヒト血清アルブミン | 0.3～5.0 [g/dL] | 94.1～103.2 | 93.5～100.4 |
| アスコルビン酸 | 1.0～20.0 [mg/dL] | 100.2～104.6 | 98.3～104.7 |
| ヘパリン | 5.0～30.0 [U/mL] | 91.5～101.6 | 90.9～105.5 |

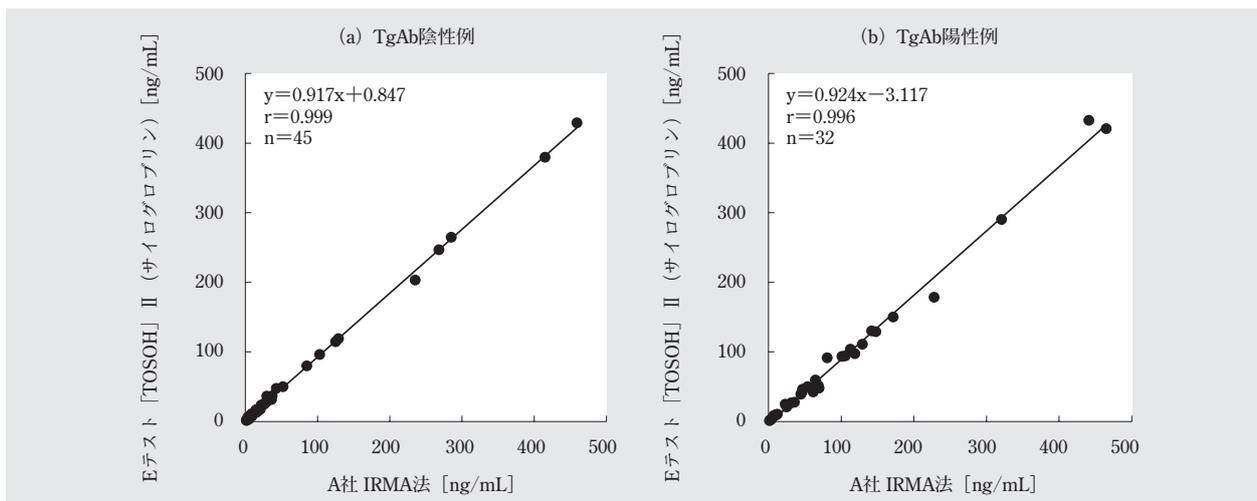


図7 A社 IRMA法との相関性：(a) TgAb陰性例、(b) TgAb陽性例

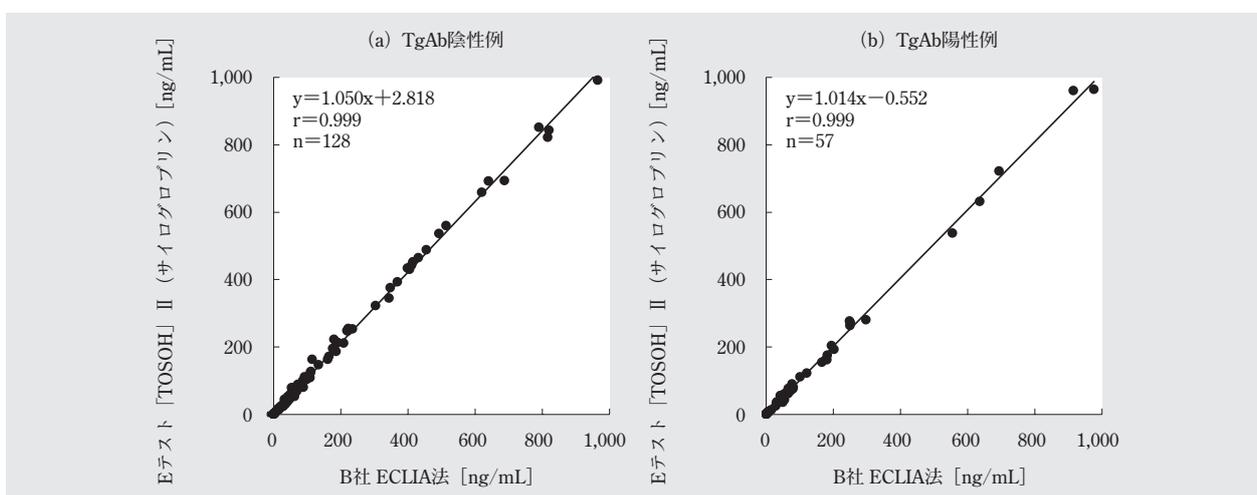


図8 B社 ECLIA法との相関性：(a) TgAb陰性例、(b) TgAb陽性例

試薬は血清、血漿のマトリックスの違いによる測定値の差は認められず、どちらの検体種にも同等な測定値を与える試薬であることが明らかとなった。

6. まとめ

今回開発した Tg 測定試薬について基本性能を確認した。

実効感度として CV が 20% の理論値を算出したときの濃度は 0.08 ng/mL であった。甲状腺癌術後の経過観察、術後の再発や転移の診断では、Tg 値 0.1 ~ 1 ng/mL を基準とするガイドラインもあるが^{7), 9)}、本試薬の感度はその基準の下限を満たす性能であり、臨床上的有用性も高いと思われる。同時再現性、日差再現性は TgAb 陰性例で CV 2.3 ~ 3.7%、陽性例で CV

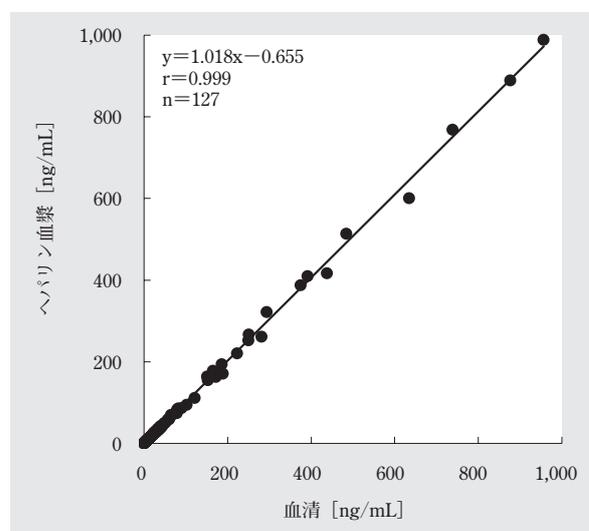


図9 血清検体と血漿検体の相関性

2.2～3.9%であり、TgAb陰性例と陽性例で有意差は認められなかった。希釈直線性についてもTgAb陰性・陽性例にかかわらず良好であった。検体中の共存物質や抗凝固剤の影響については、検討した範囲内において測定系に影響を及ぼさないことが確認できた。他社キットとの相関性試験は、TgAbの影響を受け難いとされるA社IRMA法とTgAb陰性・陽性例いずれも良好な相関性であり、また、全自動測定キットであるB社ECLIA法においても同様に良好な相関性が認められた。検体種については血清、血漿（ヘパリン血漿）の両検体で同等の測定結果を得ることができた。

今回の結果では、TgAb陽性例においてもIRMA法やECLIA法に対する相関性は良好であり、TgAbの影響の差は認められなかった。しかし、IRMA法においてTgAbの影響を受ける場合があるとの報告もあり¹⁷⁾、Tg測定値への信頼性を判断するためには、TgAbの影響も十分考慮する必要がある。今後は、TgAbの影響についてさらに検証していきたい。

既に製品化されているEテスト「TOSOH」シリーズの甲状腺関連ホルモン（TSH、T4、FT4、T3、FT3）や抗甲状腺自己抗体（TgAb、TPOAb、TRAb）との同時測定が可能なことから、日常検査に加え、診療前検査にも有用であり、甲状腺疾患の診断において今後さらに幅広い用途が期待できる。

7. 謝 辞

本試薬の開発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。

群馬大学大学院 医学系研究科 臨床検査医学

群馬大学医学部附属病院 検査部

： 村上 正己 教授

群馬大学医学部附属病院 検査部

： 森村 匡志 先生

群馬大学医学部附属病院 検査部

： 古田島 伸雄 先生

文 献

- 1) Vassart G., et al, *Mol Cell Endocrinol*, 40, 89 - 97 (1985)
- 2) 内村英正、他、核医学、20、867-874 (1983)
- 3) Torrens JL., et al, *Utility in Clinical Practice., Endocrinologist*, 6, 125-144 (1996)
- 4) Barsano CP., et al, *Arch Intern Med*, 142, 763-767 (1982)

- 5) Schlumberger M., et al, *Eur J Endocrinol*, 138, 249 - 252 (1998)
- 6) Schlumberger M., et al, *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 2487-2495 (2007)
- 7) 浜田昇、日本臨床、65、2061-2067 (2007)
- 8) 絹谷清剛、臨床核医学、41、8-11 (2008)
- 9) Zucchelli G., et al, *J Nucl Med*, 53, 482-489 (2009)
- 10) Pelttari H., et al, *Eur J Endocrinol*, 163, 757 - 763 (2010)
- 11) Spencer CA., et al, *Clin Chem*, 42, 164-173 (1996)
- 12) Spencer CA., et al, *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 5566-5575 (2005)
- 13) 池窪勝治、他、ホルモンと臨床、41、111-121 (1993)
- 14) 佐藤かづ末、他、核医学技術、13、23-28 (1993)
- 15) 中込俊雄、他、核医学技術、15、68-72 (1995)
- 16) 武市藍、他、日本臨床検査自動化学会会誌、38、109-113 (2013)
- 17) 才木康彦、他、核医学技術、15、332-334 (1995)