

●全自動甲状腺レセプター自己抗体測定試薬の開発

バイオサイエンス事業部 開発部 試薬開発G

河合 信之
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

甲状腺疾患は、内分泌疾患の中では最も頻度が高く、日常診療の機会も多い疾患であり、大きく分けて甲状腺機能亢進症（甲状腺ホルモン過剰）と甲状腺機能低下症（甲状腺ホルモン不足）の二つがある。甲状腺疾患が疑われたら、まず行う検査は甲状腺ホルモン（遊離型サイロキシン：FT4）と甲状腺刺激ホルモン（TSH）の測定である。この結果によって、甲状腺機能亢進、低下、正常の三つに区分される。甲状腺機能亢進症の場合には、その原因がバセドウ病かそれ以外（無痛性甲状腺炎、亜急性甲状腺炎）かの鑑別診断を行う。バセドウ病は、甲状腺の細胞の表面にあるTSHのレセプターに対する自己抗体（抗TSHレセプター抗体：TRAb）による甲状腺の刺激活性化に起因している。

TSHレセプターは分子量約100kDaの糖蛋白質で甲状腺細胞膜上に存在し、これにTSHが結合すると細胞内のcAMPが増加し、甲状腺ホルモンの合成を促進する。このレセプターに対する自己抗体が抗TSHレセプター抗体（TRAb）である。TRAbはTSHと同様に甲状腺ホルモンの合成を促進するものがあるが、ネガティ

ブフィードバックによるコントロールを受けないため、バセドウ病のような甲状腺機能亢進状態をもたらす。このことからTRAbの測定は、甲状腺疾患の鑑別に有用であり、特にバセドウ病と無痛性甲状腺炎及び亜急性甲状腺炎の鑑別診断、バセドウ病の治療経過観察に利用される⁽¹⁻⁶⁾。

TRAbの測定には図1に示すようなラジオ・レセプター・アッセイ法（RRA法）が主に用いられてきたが、最近では非放射線系（non-RIA）の試薬（エンザイムイムノアッセイ：ELISA法、化学発光酵素イムノアッセイ：CLEIA法）に変わりつつあり、さらにはTSHの代わりにスミスらによって開発されたヒト由来の抗TSHレセプターモノクローナル抗体（M22）⁽⁷⁻¹⁰⁾を用いた高感度且つ迅速測定可能な試薬も販売されている。

今回、我々は全自動免疫測定装置（AIA-2000、AIA-1800、AIA-900及びAIA-600 II）を用いて簡便かつ迅速にTRAbを測定可能な試薬の開発を行ったので報告する。

2. 測定原理と材料

ブタTSHレセプター（リコンビナント）とヒト由来

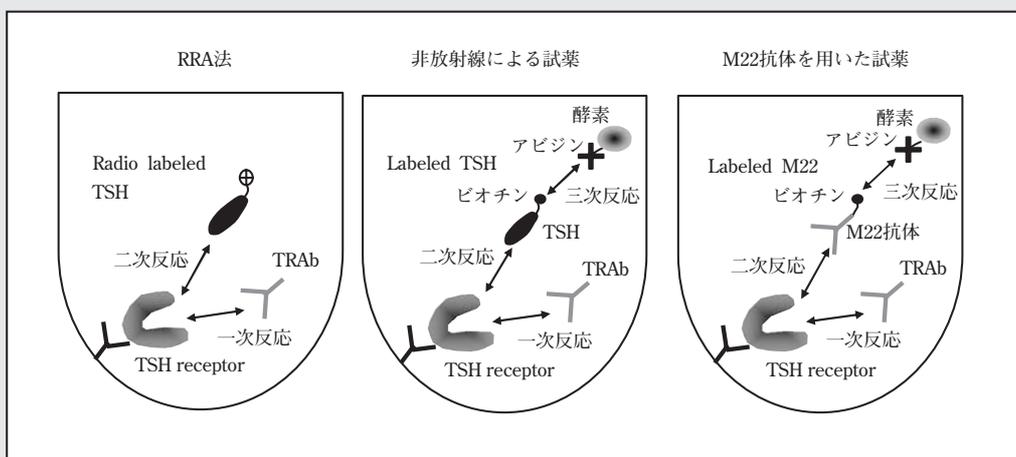


図1 市販されているTRAb測定試薬の測定原理

の抗TSHレセプターモノクローナル抗体（M22）を用いた競合EIA法である。磁性ビーズに固定化したブタTSHレセプターが安定性を高めるため凍結乾燥体として試薬カップに封入されている。この試薬カップに検体（血清）と分注水を注入すると、凍結乾燥試薬が溶解し第一免疫反応が開始する。37℃、10分間の反応後、未反応の検体成分をB/F分離により洗浄除去する。B/F分離後、アルカリ性ホスファターゼ標識されたM22抗体を加えることにより第二免疫反応が開始される。37℃、10分間の反応後、未反応の酵素標識抗体を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（図2）。基質の蛍光強度は固定化された酵素量に依存するため、予め既知濃度のTRAbを含む標準品を用いてその蛍光強度とTRAb濃度による標準曲線を作成し、TRAb濃度未知の患者検体の蛍光強度に相当するTRAb濃度を標準曲線より算出することによりTRAbの定量が可能となる。測定の際、検体のカップへの分注、一定時間下での反応、B/F分離、基質分注、蛍光強度の測定は東ソー株式会社製の全自動免疫測定装置（AIA-2000、AIA-1800、AIA-900及びAIA-600Ⅱ）により自動で行われ、測定開始から約35分後に結果が得られる。

3. AIA試薬の開発の経緯

本試薬の開発においてTSHレセプターの安定性を保ちながら臨床的に十分耐えうる性能を出すことを目標

として以下のようなTRAb全自動測定試薬の開発を試みた。

製品化されるまでにTSHレセプターの保存条件の最適化には時間を要した。本試薬の測定原理は、先に述べたようにブタTSHレセプターとヒト由来の抗TSHレセプターモノクローナル抗体（M22）を用いた競合EIA法である。磁性ビーズに固定化したブタTSHレセプターは安定性を保つために凍結乾燥体として試薬カップに封入されている。その磁性ビーズへのTSHレセプターの固定化は、抗体を固定化するときのような緩衝液のみを用いる条件ではTSHレセプターが急速に失活し十分な反応性が得られないため、緩衝液に安定化剤を添加させ、温度、時間を最適化することでTSHレセプターの失活を防ぐ固定化条件を確立した。またTSHレセプターを固定化した磁性ビーズも従来の保存液では製造中に反応性の低下が認められたため、保存液についても最適化を実施した。

臨床的に十分耐えうる性能を出すためには、本項目特有の試薬仕様を選定した。特に第一反応液は、TRAb陰性検体の測定値を収束させるための複数の添加剤を組み合わせるとともに、TRAb陽性検体の反応性を増大させるための増感剤も加えた。さらに酵素標識M22抗体の調製には新規の架橋試薬を採用することでTSHレセプターとの反応性を高め、酵素標識M22抗体希釈液を最適化することにより溶液での安定性も確保した。

なお、標準品のTRAb濃度は、国際標準品（NIBSC Code：90/672）を基準として決定した。

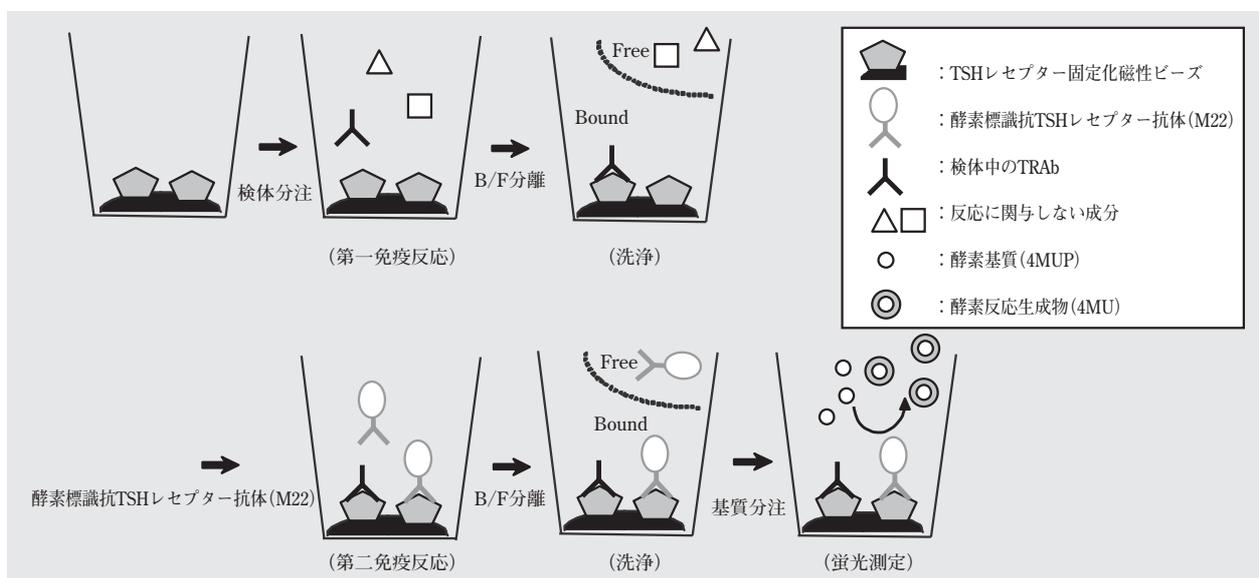


図2 TRAb測定原理図

表1 測定内および測定間再現性試験

	測定内再現性試験 (n=10)			測定間再現性試験 (n=20, 94日間)		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High
Mean [IU/L]	8.9	16.0	23.3	9.1	16.3	23.4
SD	0.4	0.5	0.6	0.5	0.7	0.9
CV[%]	4.6	3.1	2.4	5.0	4.0	3.8

4. 基本性能評価

(1) 感度

8種の低濃度TRAb陽性血清を10重測定し、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1.8 IU/L、2SD法による最小検出限界は0.5 IU/Lであった(図3)。

(2) 再現性試験

測定内再現性、測定間再現性試験を濃度の異なる3種の血清検体を用いて行った。使用した3検体(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。10重同時測定による測定内再現性試験の結果、各検体の測定値の変動係数(coefficient of variation; CV)は、2.4~4.6%の範囲内であった。90日間の測定を各2重測定にて行った測定間再現性試験の結果、各検体の測定値のCVは、3.8~5.0%の範囲内であった(表1)。

(3) 希釈直線性試験

TRAb濃度の異なる4種の血清検体を用い3重測定にて行った。各々の検体を専用の検体希釈液で5倍、10

倍希釈し測定した結果、概ね良好な希釈直線性を示した(図4)。

(4) 共存物質の影響試験

検体中に含まれる可能性のある各物質を高濃度で血清検体へ添加し、測定値への影響を確認した。共存物質としてヘモグロビン、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、アスコルビン酸を各々表2に記載の濃度まで添加し、測定した結果、未添加に対して測定値はいずれも±10%以内の変動であり、これら物質による影響は認められないと判断した。

更に溶血の影響を確認するために、偽似溶血検体を調製して評価を行った。ヘパリン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

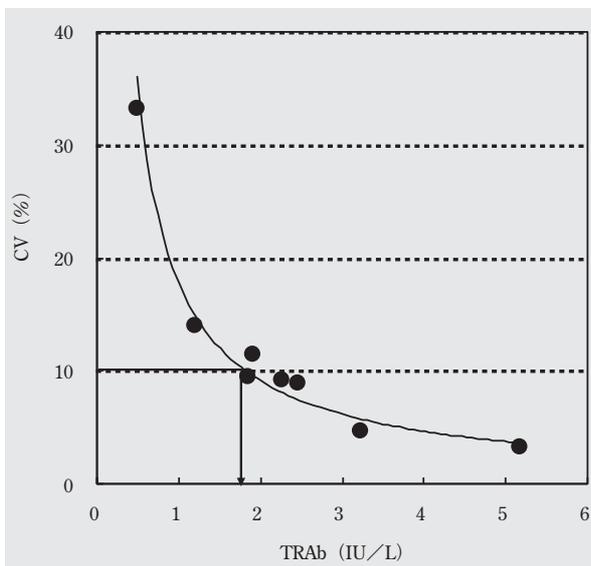


図3 感度

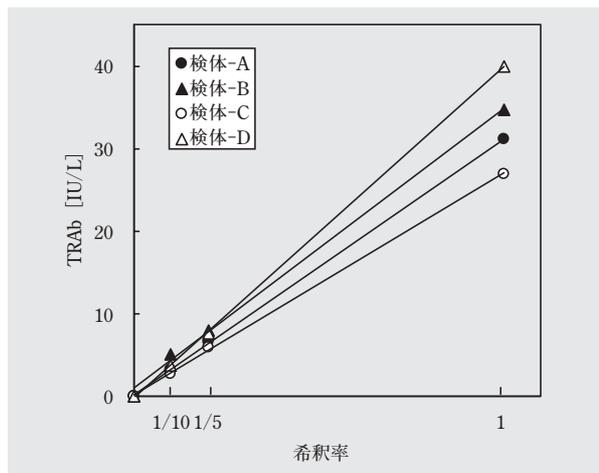


図4 希釈直線性試験

表2 共存物質の影響試験

ヘモグロビン	[mg/dL]	440
遊離型ビリルビン	[mg/dL]	19
抱合型ビリルビン	[mg/dL]	18
脂質	[mg/dL]	1600
ヒト血清アルブミン	[mg/mL]	50
アスコルビン酸	[mg/dL]	20

加えて溶血させ、遠心分離して得られた上清を用いて溶血検体とした。評価の結果、ヘモグロビン濃度500 mg/dLまで影響は認められなかった。

(5) 他社キットとの相関性試験

血清検体を用いてA社RRA法およびB社RRA法と測定値の比較を行った結果、AIA試薬による測定値（ y ）は、A社RRA法と回帰式 $y=0.993x+0.0345$ 、相関係数 $r=0.959$ （ $n=92$ ）、B社RRA法と回帰式 $y=1.009x-0.150$ 、相関係数 $r=0.975$ （ $n=118$ ）と良好な相関性が認められた（図5、図6）。

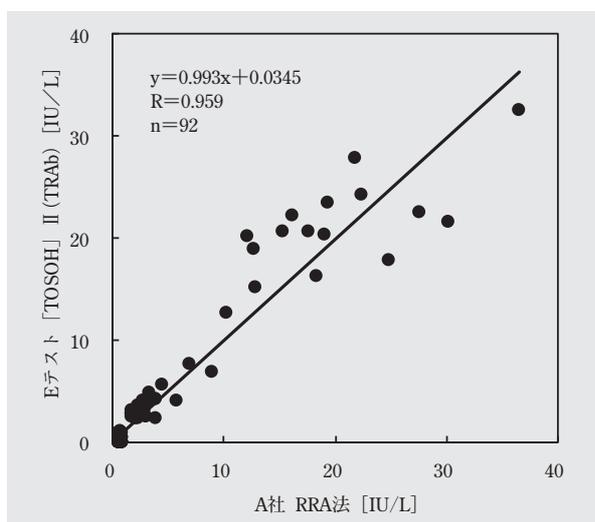


図5 AIA試薬とA社 RRA法との相関性試験

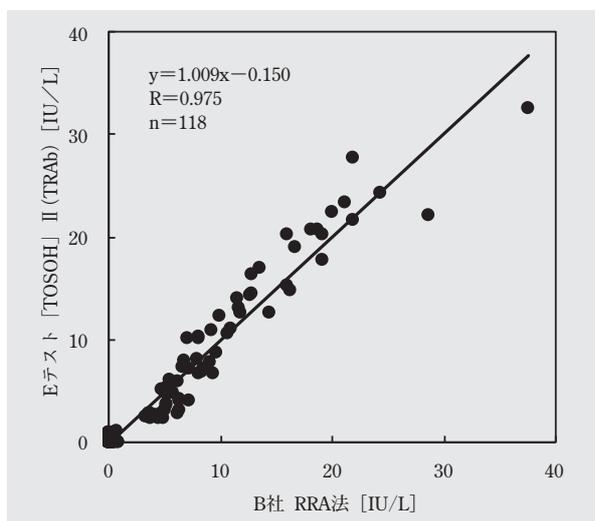


図6 AIA試薬とB社 RRA法との相関性試験

5. 臨床上的有用性確認

(1) 健常人における分布

健常人100例のTRAb濃度は1.0 IU/L未満であった（図7）。

(2) ROC分析法を用いた検証

ROC (Receiver Operating Characteristic) 分析曲線による未治療のバセドウ病患者（30例）と健常人（133例）、無痛性甲状腺炎（20例）の鑑別を行った。ROC分析の結果から、健常人を陰性群とした場合は0.9 IU/Lで最も診断効率が高く、感度、特異度は、それぞれ100%、100%であった。無痛性甲状腺炎を陰性群とした場合は2.3 IU/Lで最も診断効率が高く、感度、特異度は、それぞれ96.7%、100%となり、未治療のバセドウ病と良好な鑑別結果が得られた。

(3) 各種甲状腺疾患におけるTRAb濃度

各種甲状腺疾患（未治療のバセドウ病、橋本病、腫瘍性疾患、無痛性甲状腺炎、亜急性甲状腺炎）及び健常人のTRAb濃度の分布を比較した。未治療バセドウ病（30例）は1.2～147 IU/L、橋本病（26例）は0～1.1 IU/L、腫瘍性疾患（33例）は0～1.1 IU/L、無痛性甲状腺炎（20例）は0～2.3 IU/L、亜急性甲状腺炎（9例）は0～0.7 IU/Lの範囲に分布していた（図8）。甲状腺機能亢進症の診断において重要であるバセドウ病の鑑別（バセドウ病とそれ以外の無痛性甲状腺炎、亜急性甲状腺炎の判別）ができており、本試薬の臨床的有用性が確認された。

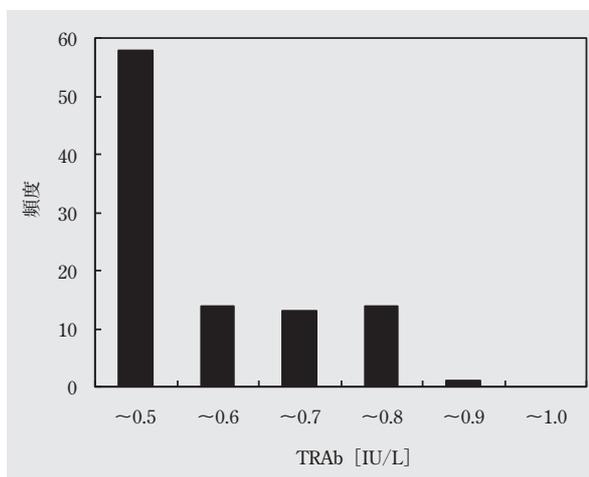


図7 健常人における分布

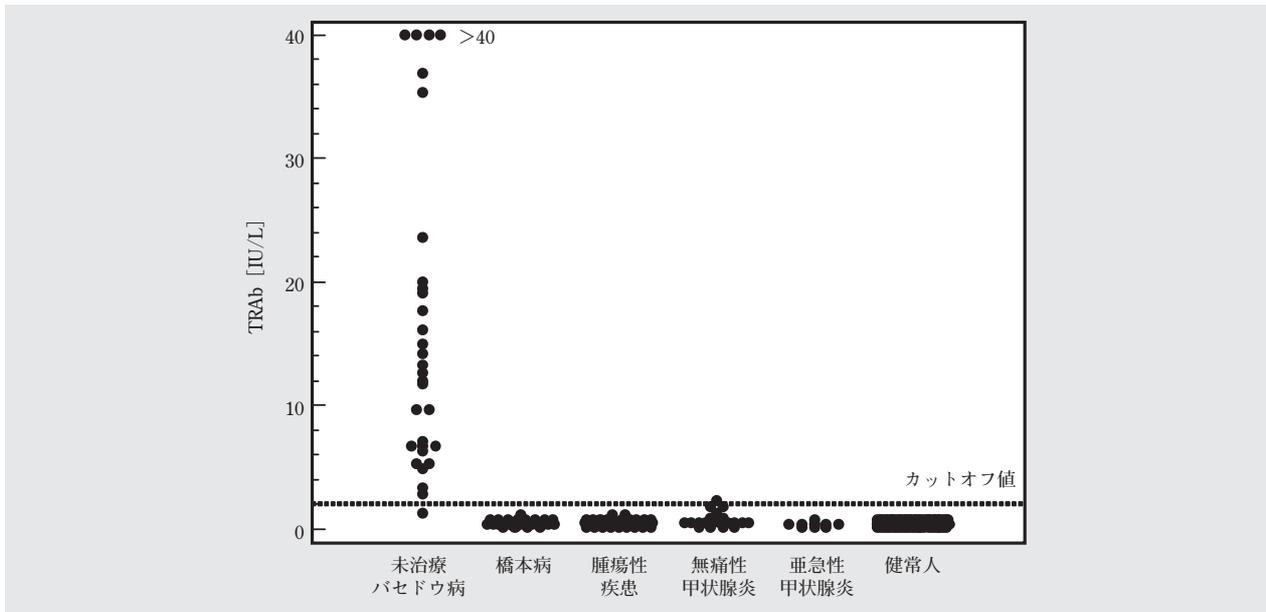


図8 甲状腺疾患と健常人の分布

6. まとめ

Eテスト「TOSOH」II (TRAb) の試薬構成及び仕様は表3の通りである。従来のTRAb測定 (RRA法) は測定時間が長く用手法で煩雑である。また測定に放射性同位元素を使用するため特別な施設が必要であり、放射性廃棄物の管理と処理に大きなコストを必要としている。しかし本法はnon-RIAで測定前に試薬調製することなくサンプルをセットして全自動で測定が可能であり、開始から約35分後に測定結果が得られる。また凍結乾燥形態を用いていることで検量線の保証期間は90日間である。従って従来法と比べ低コストで迅速な診察前検査としてTRAbの測定を行なうことができる。

本法は検体中の共存物質や溶血の影響がないことが確認された。健常人におけるTRAb濃度は1.0 IU/L未満であり、本法の実効感度を考慮し、カットオフ値を2.0 IU/Lとして未治療バセドウ病と健常人、無痛性甲状腺炎の鑑別を行った結果、健常人を陰性群とした時

の感度、特異度は、96.7%、100%、無痛性甲状腺炎を陰性群とした時の感度、特異度は、96.7%、95.0%となり、従来法と同様の性能が確認できた。更に1次反応時間を10分から20分に延長させることでカットオフ値付近の測定精密度が向上することが確認されており、バセドウ病治療における投薬中止やバセドウ病の寛解時の判断に大きく貢献できると思われ、仕様変更された試薬の開発も検討中である。

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項目 (TSH, T4, FT4, T3, FT3, TPOAb, TgAb) との同時測定が可能なることから、日常検査に加え、診察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

本開発において臨床的有用性の確認に対してご協力

表3 Eテスト「TOSOH」II (TRAb) の試薬構成及び仕様

試薬構成			検体種	検体量 [μL]	検量域上限 [IU/L]	有効期間 [月]
免疫反応試薬セット	標準品セット	検体希釈液				
免疫反応試薬 酵素標識試薬	凍結乾燥 6濃度	液状	血清	100	40	12
基質セット	分注水	洗浄水				
基質 基質溶解液	液状	液状				

していただいた、すみれ病院 院長 浜田昇 先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 日本臨床検査医学会、臨床検査のガイドライン、第2章 (2005/2006)
- 2) B. R. Smith and R. Hall, *Lancet*, **24**, 427-431 (1974)
- 3) G. Shewring and B. R. Smith, *Clinical Endocrinology*, **17**, 409-417 (1982)
- 4) B. R. Smith and R. Hall, *Endocrine Review*, **9**, 106-121 (1988)
- 5) K. Southgate et al, *Clinical Endocrinology*, **20**, 539-548 (1984)
- 6) A. Kakinuma et al, *Thyroid*, **9**, 849-855 (1999)
- 7) B. R. Smith et al, *Thyroid*, **14**, 830-835 (2004)
- 8) J. Sanders et al, *Thyroid*, **14**, 560-570 (2004)
- 9) J. Sanders et al, *Lancet*, **362**, 126-128 (2003)
- 10) K. Kamijo et al, *Endocrine Journal*, **52**, 525-529 (2005)