

●全自動デヒドロエピアンドロステロン-サルフェイト測定試薬の開発

バイオサイエンス事業部 開発部 試薬開発G

堀田 秀樹
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

デヒドロエピアンドロステロン-サルフェイト (DHEA-S, Dehydroepiandrosterone sulfate) は主に副腎皮質から分泌される副腎アンドロゲンである。

DHEA-Sはすべての年齢層において、男性が女性より高値を示す。男女ともに20歳代で最も高く、その後、加齢とともに減少していく。^{1)~3)}

DHEA-Sは各種副腎皮質疾患の診断、特にクッシング症候群の副腎病変の鑑別診断及び先天性副腎過形成における酵素障害部位の鑑別診断上有用とされている。また女性の多嚢胞性卵巣症候群や多毛症の疾患の場合に高くなることが報告されている。^{4)~8)}

現在、国内において販売されている全自動のDHEA-S測定用試薬は2キットだけで、測定結果が出るまでの時間はそれぞれ29分と35分程度である。今回、我々はDHEA-S測定試薬の開発を進め、全自動エンザイム免疫アッセイ装置AIAシリーズを用いた短時間(18分)、高感度かつ特異性の高い測定試薬を構築したので報告する。

2. 測定原理と材料

本試薬の測定原理は1ステップ競合蛍光酵素免疫測定法であり、磁性ビーズに固定化されたウサギポリクローナル抗体と、アルカリ性ホスファターゼ標識

DHEA-S誘導体とが、凍結乾燥体として試薬カップに封入されている。試薬カップに含まれるウサギポリクローナル抗体はDHEA-Sを特異的に認識し、検体中のDHEA-Sもしくはアルカリ性ホスファターゼ標識DHEA-S誘導体と結合する(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DHEA-S抗原量に反比例する。したがって、あらかじめ既知濃度のDHEA-Sを含む標準品を用いその蛍光強度とDHEA-S濃度による標準曲線を作成し、DHEA-S濃度未知の患者検体の蛍光強度に相当するDHEA-S濃度を標準曲線より算出することによりDHEA-S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、全自動エンザイム免疫アッセイ装置AIA-1800を使用したときに得られる検量線の例を図2に示す。)

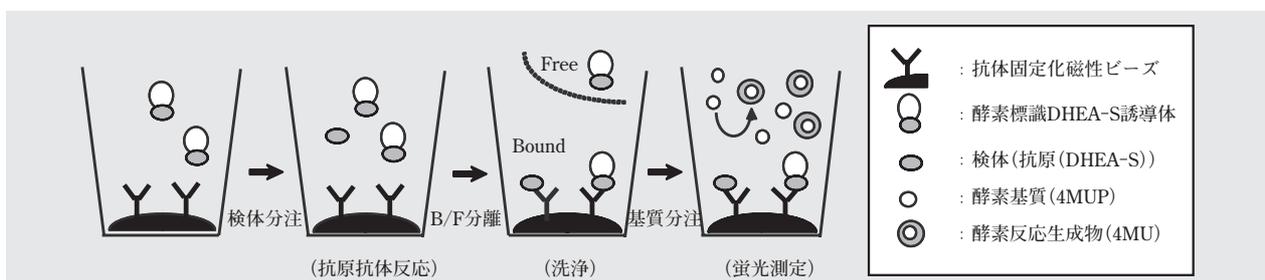


図1 DHEA-S測定の免疫複合体模式図

表1 DHEA-S測定試薬の主な仕様

測定項目	血中デヒドロエピアンドロステロン-サルフェイト
測定原理	1ステップ競合蛍光酵素免疫測定法
反応関与成分	抗DHEA-Sウサギポリクローナル抗体 アルカリ性ホスファターゼ標識DHEA-S誘導体
測定装置	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℃・10分
酵素反応温度・時間	37℃・5分
測定対象検体	血清または血漿 (ヘパリン・EDTA)
測定範囲	2.0~1,000 $\mu\text{g/dL}$
検体量/分注水量	10 μL /140 μL
標準品形状	液状品
標準品濃度	0、5、12、60、300、1200 $\mu\text{g/dL}$ (6点)
濃度単位	$\mu\text{g/dL}$

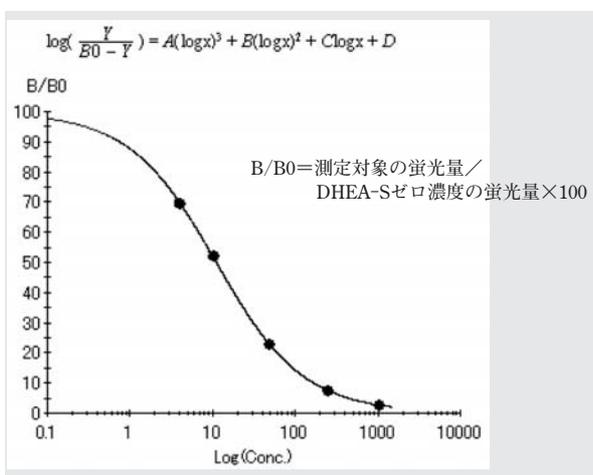


図2 DHEA-S測定試薬の検量線例

3. AIA試薬の開発

DHEA-Sの測定試薬として、固定化用抗体に関しては、DHEA-Sに対して特異性の高いウサギポリクローナル抗体を選定した。

酵素標識抗原に関しては、DHEA-Sの誘導体から有機合成的手法により、酵素（アルカリ性ホスファターゼ）に結合させた。

この固定化用抗体と酵素標識抗原を使用して、抗体固定化量と酵素標識抗原のDHEA-S誘導体量の使用量等を最適化し、短時間で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、検体中のアルブミンなどの結合蛋白質の影響を緩和するため、結合阻害剤の濃度を最適化した。

標準品はベースとして、ヒト血清を使用することで、DHEA-Sの3位にあるスルホン酸エステルの加水分解が液状状態でも起こらないようにした。

その結果、他社キットと同様の基本性能を確保し、短時間、高感度かつ特異性の高い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

DHEA-S濃度0濃度の標準品を5重（連続）測定し、得られた蛍光量より最小検出限界を求めた結果、0濃度試料の平均値-2倍標準偏差（SD）を最小検出限界値としたときの濃度は0.135 $\mu\text{g/dL}$ であった。DHEA-S濃度0濃度の標準品および低濃度血清検体をDHEA-S濃度0濃度の標準品を用い14段階に希釈した試料を5日間2重測定し、得られた変動係数（coefficient of variation：CV）が10または20%以内の理論値を実効感度として算出したときの濃度はそれぞれ2.37 $\mu\text{g/dL}$ と0.90 $\mu\text{g/dL}$ となり、良好な結果が得られた（図3）。

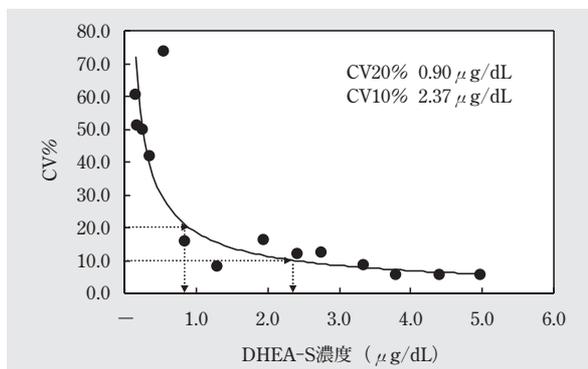


図3 実効感度

(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種のプール血清およびプール血漿（ヘパリン）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CVは0.6~3.9%であった。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測定間再現性試験の結果（検量線作成後99日間）、各試料の測定値のCVは1.8~2.9%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種の血清検体およびヘパリン血漿検体を用い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、血清検体、ヘパリン血漿検体ともに原点に収束する良好な希釈直線性性能を有していることが認められた（図5）。

(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プール血清およびプール血漿（ヘパリン）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、アスコルビン酸を、抗凝固剤としてはクエン酸、ヘパリン、EDTAを各々表3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) 交叉反応性試験

血中に存在する種々のステロイドとの交叉反応性を評価するために、血清検体に各ステロイドを表4に示す濃度となるように添加して測定した。評価したすべてのステロイドで交叉率が1%以下を示したことから、DHEA-Sに対して高い特異性を有していると判断できた。

表2 測定内および測定間再現性

	DHEA-S濃度 [$\mu\text{g/dL}$]					
	Pooled serum			Pooled heparinized plasma		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High
測定内再現性 (n=5)						
mean	51.7	309.4	517.0	104.9	252.0	489.2
SD	1.0	4.9	19.9	0.6	3.9	12.7
CV [%]	2.0	1.6	3.9	0.6	1.6	2.6
測定間再現性 (n=20)						
mean	53.6	298.7	531.6	103.3	244.8	484.2
SD	1.0	6.5	14.5	3.0	5.1	14.2
CV [%]	1.8	2.2	2.7	2.9	2.1	2.9

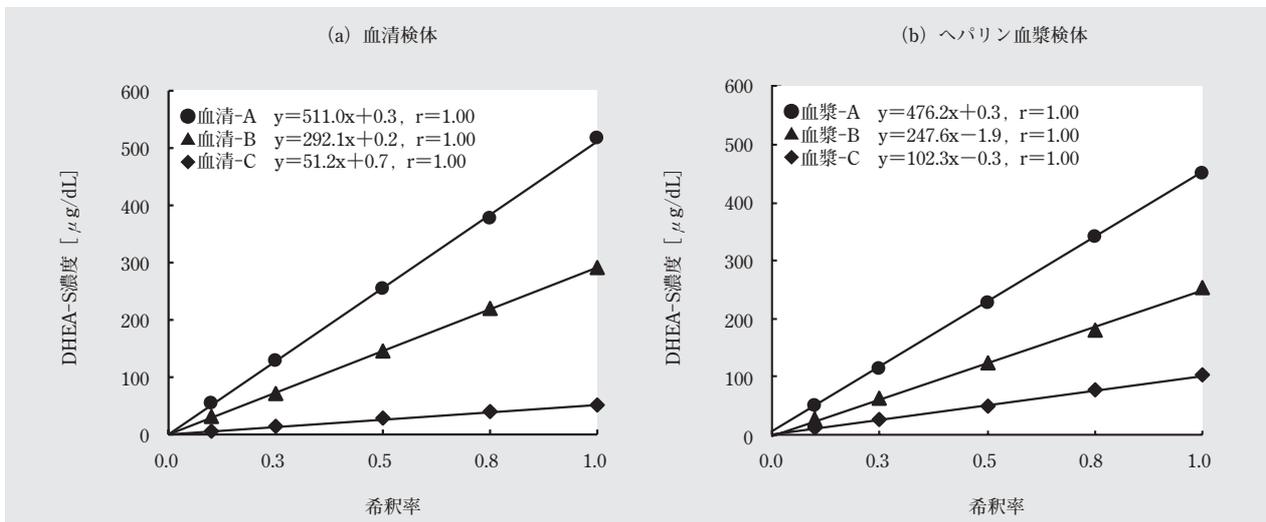


図4 希釈直線性：(a) 血清検体、(b) ヘパリン血漿検体

表3 共存物質および抗凝固剤影響

		ブール血清	ブール血漿
ヘモグロビン	[mg/dL]	440	440
遊離型ビリルビン	[mg/dL]	17	17
抱合型ビリルビン	[mg/dL]	19	19
脂質	[mg/dL]	1,600	1,600
ヒト血清アルブミン	[g/dL]	2	2
アスコルビン酸	[mg/dL]	20	20
クエン酸	[mg/dL]	20	20
ヘパリン	[U/mL]	100	100
EDTA	[mg/mL]	10	10

表4 種々のステロイドとの交叉反応性

添加物質 (ステロイド)	添加濃度 ($\mu\text{g/dL}$)	交叉反応性 (mol%)
DHEA	4000	N.D.
DHEA glucuronide	5000	0.09
Aldosterone	5000	0.04
Androstenedione	1000	0.17
Androsterone	2000	0.03
Androsterone glucuronide	5000	0.10
Androsterone sulfate	5000	0.30
Cortisol	10000	0.03
5 α -dihydrotestosterone	5000	0.01
Estradiol	5000	N.D.
β -estradiol-3-sulfate-17-glucuronide	5000	N.D.
Estriol	5000	0.02
Estrone	5000	N.D.
Estrone-3-sulfate	5000	0.09
19-hydroxyandrostenedione	5000	0.05
Progesterone	5000	0.05
Testosterone	2000	0.18

* N.D.: 検出不能

(6) 健常者の濃度分布

健常者275例について、血清中のDHEA-S濃度を測定した結果を表5に示す。男性が女性より高値を示し、また男女ともに20歳代で最も高く、その後、加齢とともに減少していくことが確認できた。

(7) 他社キットとの相関性

91例の血清検体を使用し本DHEA-S測定試薬(y)と他社A法(x)で測定し、測定値の比較を行った結果

表5 健常者の濃度分布

年齢	男性		女性	
	n	$\mu\text{g/dL}$	n	$\mu\text{g/dL}$
20~29	47	123~727	75	65~514
30~39	32	106~445	18	71~208
40~49	54	66~488	13	34~303
50~59	28	77~365	8	41~222

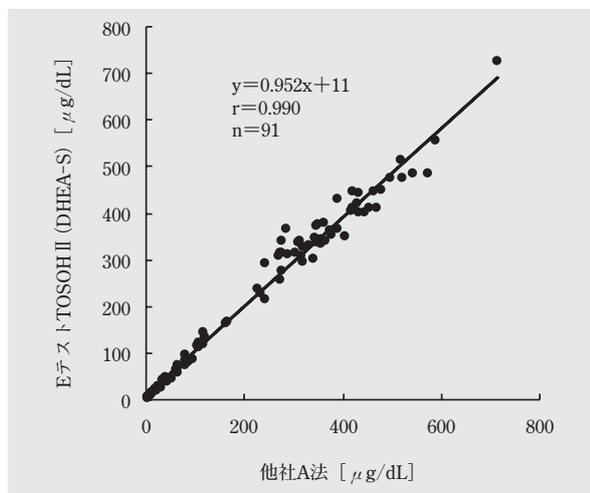


図5 DHEA-S測定試薬と他社キットとの相関性

(図5)、他社A法に対して相関係数(r) 0.990、回帰係数0.952、y切片11と良好な相関性が認められた。

(8) 血清検体と血漿検体の相関性試験

DHEA-Sの定量は他項目と組み合わせて定量することによって、下垂体-副腎皮質-性腺系などの指標として有用と考えられている。そのため血清以外にEDTA血漿、ヘパリン血漿で測定できることが要求されている。

そこで、血漿検体(ヘパリン血漿、EDTA・2Na)へ対応可能であるか検討した。同一人物から同時に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試験を行った結果(血清(x)、ヘパリン血漿(y))、49例での相関係数(r) 0.998、回帰係数0.993、y切片0.8、また、同一人物から同様に採取した血清とEDTA・2Na処理採血から得られた血漿との相関性試験を行った結果(血清(x)、EDTA・2Na血漿(y))、49例での相関係数(r) 0.999、回帰係数1.04、y切片2.1といずれの結果も良好な相関性が認められた(図6)。したがって、本DHEA-S測定試薬は血清、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、いずれ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。

5. まとめ

今回、DHEA-S測定試薬を開発し、基本性能を確認した。

感度は測定下限値2.37 $\mu\text{g/dL}$ でCV=10%であった。測定内、測定間再現性は4%以内で、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は測

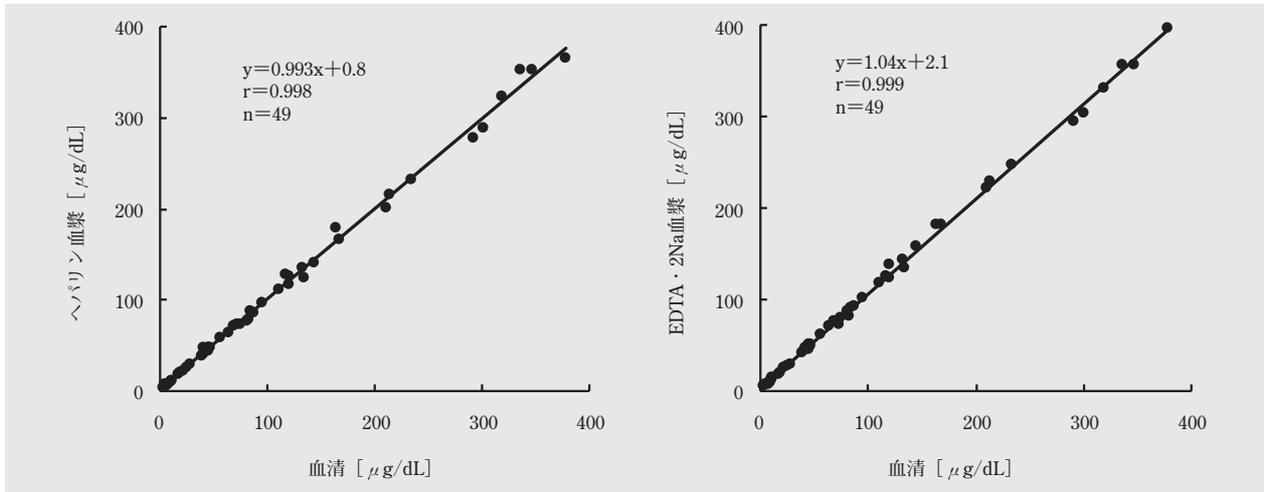


図6 血清検体と血漿検体の相関性

定系に影響を及ぼさないことが確認できた。交叉反応性試験結果から本試薬はDHEA-Sに対する特異性が非常に高く、他のステロイドに対する交叉反応をほとんど示さなかった。血清、血漿（ヘパリン、EDTA・2Na）両検体を同等に測定可能なことが確認された。他社キットとの相関性試験においても他社法と良好な相関性を示した。

以上から、本DHEA-S測定試薬は、下垂体-副腎皮質-性腺系などの疾患の鑑別診断に使用する際の試薬として有用であることが示された。また近年、DHEA-Sは年齢によって血中濃度が増減することから、アンチエイジングのマーカーとしても注目を浴びており、今後の有用性が期待される。

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していただいた各先生方に厚く御礼申し上げます。
 北海道大学病院検査・輸血部副部長：清水 力先生
 北海道大学病院検査・輸血部副技師長：渋谷 齊先生
 北海道大学病院検査・輸血部：榎 わか葉先生

文 献

- 1) 蘆田健二、他、*Modern Physician*, **27**(8)、1049-1052 (2007-8)
- 2) PD. Kroboth, et al, *Clin Pharmacol*, **39**, 327-348 (1999)
- 3) JE. Nestler, et al, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **40** (4-6), 599-605 (1991)
- 4) 橋本浩三、*治療*, **78**, 1325-1327 (1996)
- 5) 矢内原巧、*HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY*, **8**(2)、35-42 (2001)
- 6) T. Yamaji, et al, *J Clin Endocrinol Metab*, **59**(6), 1164-1168 (1984)
- 7) W. Meikle, *Endocrinol Metab Clin North Am*, **20** (2), 381-400 (1991)
- 8) R. Jeffrey Chang, *American Journal of obstetrics and Gynecology*, **191**, 713-717 (2004)