

●全自動高感度エストラジオール（hsE2）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	小崎	慎矢
			木村	淑子
	開発部	技術開発G	新谷	晃司
		開発部	松葉	隆雄
			永田	喜彦

1. はじめに

エストラジオールは、主に女性の卵巣から産生・分泌されるステロイドホルモンであり、妊娠時には胎盤で大量に産生され、副腎皮質や男性の精巣からも微量に産生される^{1,2)}。エストラジオールの産生・分泌は卵巣機能を反映するため、卵巣機能低下症やエストロゲン産生腫瘍の診断に重要な役割を果たし、また、不妊症治療における卵胞成熟や排卵誘発のモニタリングの一手段として有用とされている²⁻⁴⁾。さらに、エストラジオールは下垂体性の卵胞刺激ホルモン（FSH）や黄体形成ホルモン（LH）の分泌刺激やフィードバック機構を介してFSH、LH分泌機構に関与するため、LHやFSHと同時に測定することにより、下垂体-卵巣系の機能を評価することが可能となる^{5,6)}。

一方、更年期においては、卵巣機能の低下もしくは消失により著しいエストラジオールの低下が生じる。エストラジオールの低下は筋骨格系⁷⁾や心血管系⁸⁾などの老化を促し、生活習慣病や骨粗しょう症の発症につながる⁹⁾とされている。また、小児期から成長期においては、女性の性腺機能のみならず、男性の性腺機能や骨の成熟、骨量の維持に関しても、大切な役割を果たしていることが確認されている^{2,9)}。エストラジオールの高感度測定は、エストラジオールが微量であるこれらの時期の、性腺機能の把握やホルモン補充療法などの治療及び予防の観点から有用であるといえる¹⁰⁾。

高感度・高精度のエストラジオール測定法はガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーが知られているが、必要な検体量が多く、抽出操作など前処理工程が煩雑である。また、免疫反応を利用した高感度測定法であるRIA法やELISA法では、反応時間が長い¹¹⁾ため、多くの検体を処理できないデメリットがある。

今回、独自に高い親和性と特異性を有するウサギモノクローナル抗体¹¹⁾を作製し、本抗体を用いてAIA試

薬化を進め、全自動エンザイムイムノアッセイ装置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

本試薬の測定原理は、ディレイ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抗エストラジオールウサギモノクローナル抗体が、凍結乾燥体として試薬カップに封入されている。この試薬カップに分注水と検体を注入すると、凍結乾燥試薬が溶解し第一免疫反応が開始する。37℃、14分間の反応後、反応混合物にアルカリ性ホスファターゼ標識エストラジオール誘導体を加えることにより第二免疫反応が開始される。再び37℃、10分間反応させた後、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（図1）。基質の蛍光強度は固定化された酵素量に依存し、さらにエストラジオール抗原量に反比例する。

したがって、あらかじめ既知濃度のエストラジオールを含む標準品を用いその蛍光強度とエストラジオール濃度による標準曲線を作成し、エストラジオール濃度未知の患者検体の蛍光強度に相当するエストラジオール濃度を標準曲線より算出することによりエストラジオール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（AIA-2000、AIA-1800、AIA-900及びAIA-600 II）により自動で行われ、測定開始から約32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。）

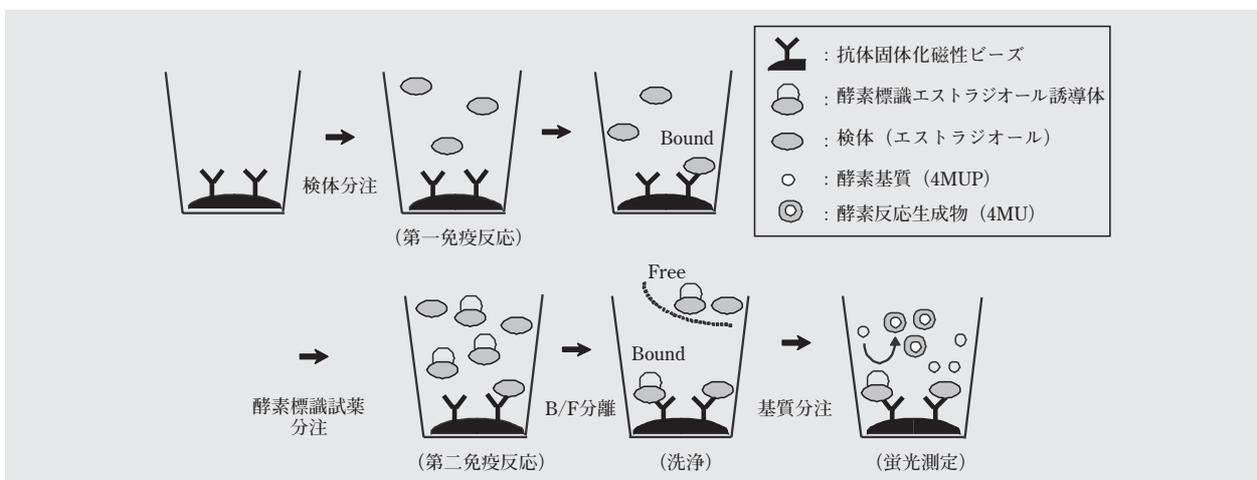


図1 高感度エストラジオール測定原理

表1 高感度エストラジオール測定試薬の主な仕様

測定項目	血中エストラジオール
測定原理	ディレイ1ステップ競合蛍光酵素免疫測定法
反応関与成分	抗エストラジオールウサギモノクローナル抗体 アルカリ性ホスファターゼ標識エストラジオール誘導体
測定装置	全自動エンザイムイムノアッセイ装置 (AIA-2000、AIA-1800、AIA-900及びAIA-600 II)
第一免疫反応温度・時間	37°C・14分
第二免疫反応温度・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)
測定範囲	7~1,000 pg/mL
検体量/分注水量	75 μL/25 μL
酵素標識試薬量	50 μL
標準品形状	液状品
標準品濃度	0、25、50、100、500、1,100 pg/mL (6点)
濃度単位	pg/mL

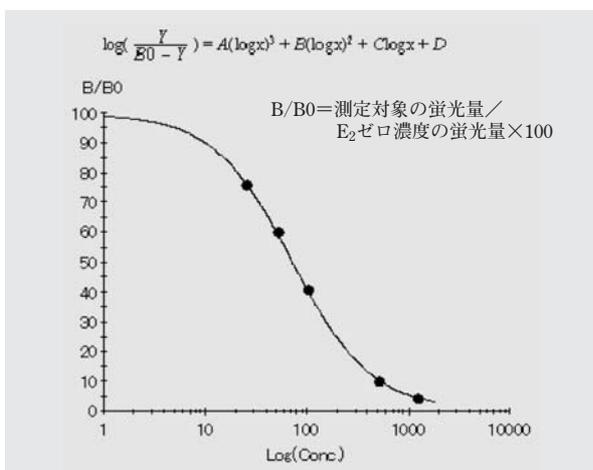


図2 高感度エストラジオール測定試薬の検量線例

3. AIA試薬の開発

短時間反応で高い感度を有するエストラジオール測

定試薬の開発をするために、測定原理の最適化と一次抗体である抗エストラジオール抗体の作製及び選定を行った。

まず、測定原理の最適化に関しては、既存の自社エストラジオール測定試薬であるEテスト「TOSOH」II (E2) で採用している1ステップ競合法から、ディレイ1ステップ競合法への切替えを行った。1ステップ競合法では、検体を試薬に分注した際に検体中のエストラジオールと試薬中の酵素標識されたエストラジオールが一斉に競合反応を起こす。一方、ディレイ法では一次抗体のみが封入された試薬と検体を一定時間反応させた後に、酵素標識されたエストラジオールを追加してさらに反応させる。この手法により、検体と一次抗体の反応時間が最適化され、高感度化に多大な効果をもたらした。

また、一次抗体に関しては、エストラジオールに対して高い親和性と特異性を有するウサギモノクローナ

ル抗体を技術開発Gで作製及び選定した。酵素標識抗原に関しては、エストラジオール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。さらに、固定化抗体と酵素標識抗原の使用量を最適化することで、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、アルブミンなどの結合蛋白質の影響による反応阻害を緩和するために遊離剤の濃度を最適化した。

標準品はそのベースとして、脱エストラジオール処理したヒト血清を使用することで、高精度・高感度測定法である同位体希釈ガスクロマトグラフ/質量分析法（ID-GC/MS法）と同等の検体測定値を得られるようにした。

その結果、Eテスト「TOSOH」II（E2）と比較して約4倍、他社エストラジオール測定試薬と同等以上の実効検出感度を有したエストラジオール測定試薬として、Eテスト「TOSOH」II（hsE2）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

エストラジオール濃度0濃度の標準品を5重測定し、得られた蛍光量より最小検出感度を算出した結果、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1.9 pg/mLであった。また、エストラジオール低濃度血清検体をデキストラン・チャコール処理して調製したエストラジオール濃度0濃度の血清を用いて、15段階に希釈した試料を5日間2重測定した。得られた変動係数（coefficient of variation：CV）が10%または20%の理論値を実効検出感度として算出したときの濃度は、それぞれ9.1 pg/mL（CV=10%）と4.2 pg/mL（CV=20%）となり（図3）、自社既存EIA法であるEテスト「TOSOH」II（E2）と比較して約4倍の実効検出感度を有していることが確認された。また、他社エストラジオール測定試薬と比較しても2倍以上の良好な感度を有していることが確認された（表2）。

(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

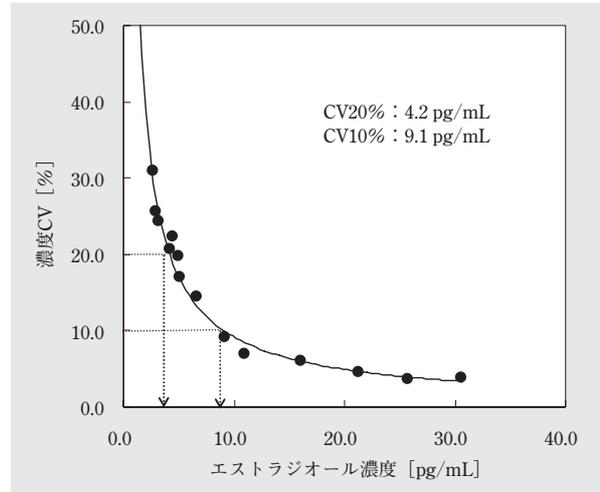


図3 感度：実効検出感度

表2 実効検出感度比較

	実効検出感度 [pg/mL]	
	CV10%	CV20%
本法	9.1	4.2
自社既存EIA法	36.0	17.3
他社CLIA法	26.5	12.7
他社CLEIA法-1	111.1	39.1
他社CLEIA法-2	137.1	30.5

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（coefficient of variation；CV）は0.4～1.5%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95日間）、各試料の測定値のCVは3.2～4.5%であった（表3）。

(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4に記載

表3 測定内および測定間再現性

	エストラジオール [pg/mL]					
	Pooled serum			Pooled heparinized plasma		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High
測定内再現性 (n=5)						
mean	68.2	246.5	795.4	68.6	238.1	763.0
SD	1.0	2.5	3.5	0.7	3.5	11.6
CV [%]	1.4	1.0	0.4	1.0	1.5	1.5
測定間再現性 (n=5)						
mean	66.5	247.8	795.9	66.7	24.21	764.0
SD	2.9	8.7	27.1	33.0	7.8	25.7
CV [%]	4.3	3.5	3.4	4.5	3.2	3.4

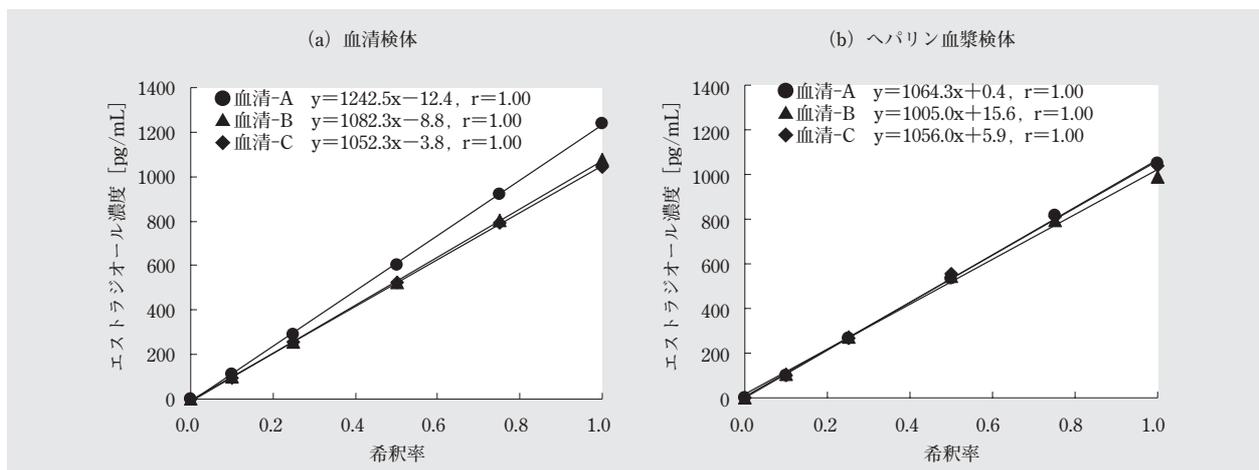


図4 希釈直線性：(a) 血清検体、(b) ヘパリン血漿検体

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、これらの物質による影響は認められないと判断した。

(5) 健常者の濃度分布

健常者373例（女性：277例，男性：96例）について、血清中のエストラジオール濃度を測定した結果を表5に示す。

(6) エストラジオール測定法との相関性

血清検体を本法であるEテスト「TOSOH」II (hsE2) (y) とEテスト「TOSOH」II (E2) (x)、他社

ECLIA法 (x)、及びID-GC/MS法 (x) でそれぞれ測定した。測定値の比較を行った結果（図5）、Eテスト「TOSOH」II (E2) に対して相関係数0.996、回帰係数1.14、y切片-38.3、他社ECLIA法に対して相関係数0.995、回帰係数0.83、y切片-3.4と良好な相関性が認められた。特に高感度・高精度のエストラジオール測定法であるID-GC/MS法に対しては相関係数0.997、回帰係数1.00、y切片-1.5、と最も良好な相関性が認められた。

表4 共存物質および抗凝固剤の影響

		プール血清	プール血漿
ヘモグロビン	[mg/dL]	450	450
遊離型ビリルビン	[mg/dL]	17	17
抱合型ビリルビン	[mg/dL]	9	9
脂質	[mg/dL]	415	415
ヒト血清アルブミン	[g/dL]	1.25	0.75
アスコルビン酸	[mg/dL]	20	20
ヘパリン	[U/mL]	100	100

表5 健常者の濃度分布

検体群	参考基準範囲 [pg/mL]
女性	
卵胞期	15.6~297.1
排卵期	45.4~528.4
黄体期	16.6~337.6
閉経後	≤40.2
妊娠前期	990~3,928
妊娠中期	7,156~16,114
妊娠後期	9,703~42,845
男性	≤42.0

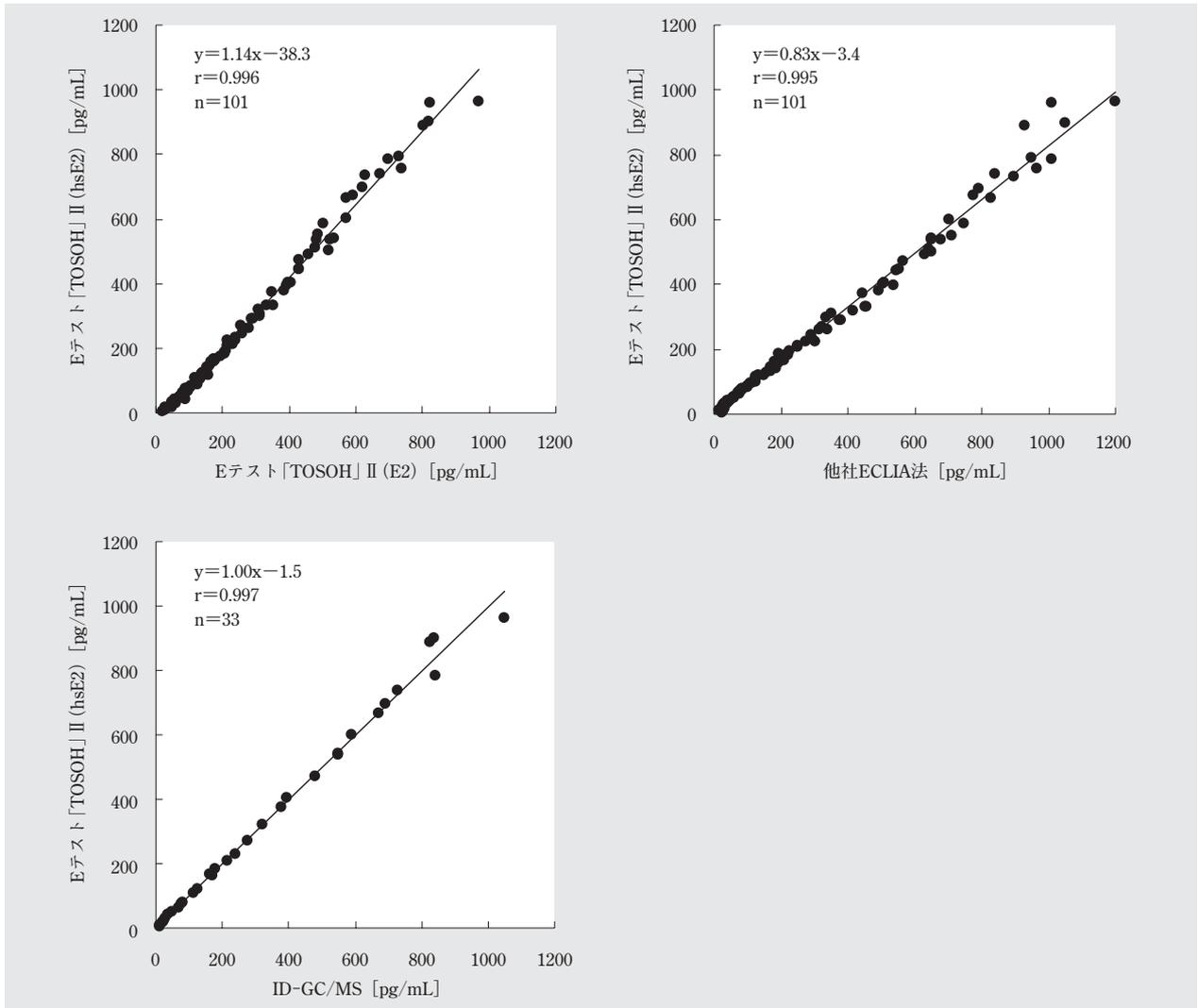


図5 エストラジオール測定法との相関性

(7) 血清検体と血漿検体の相関性試験

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。そこで、血漿検体（ヘパリン血漿）へ対応可能であるか検討した。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試験を行った結果（血清 (x)、ヘパリン血漿 (y)）、116例での相関係数1.000、回帰係数1.02、y切片0.4と良好な相関性が認められた（図6）。したがって、本高感度エストラジオール測定試薬は血清、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. 交叉反応性試験

血中に存在する種々のステロイドや不妊治療で用いられる薬剤との交叉反応性を評価するために、エスト

ラジオールを除去した検体に表7に示す化合物を添加して本高感度エストラジオール測定試薬で測定した。評価した全てのステロイド及び薬剤で交叉反応性が3%以下を示し、特にエストロンやエストリオールな

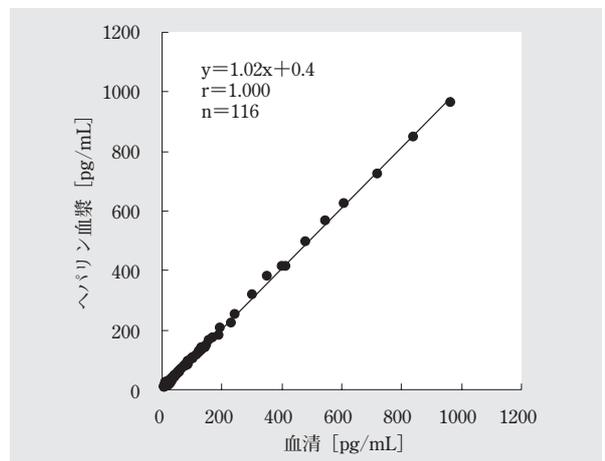


図6 血清検体と血漿検体の相関性

表6 交叉反応性

交叉反応物質	添加濃度 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	交叉反応性 [mol%]	
		Eテスト「TOSOH」II (hsE2)	Eテスト「TOSOH」II (E2)
17 α -estradiol	1	0.012	0.04
Estrone	0.1	0.3	7.2
Estriol	1	0.08	4.9
17 β -estradiol-17-glucuronide	10	0.004	0.01
17 β -estradiol-3-glucuronide -17-sulfate	10	N.D.	0.003
17 β -estradiol-3-sulfate	1	0.03	0.31
17 α -ethynylestradiol	0.01	3.6	2.3
Hydrocortisone	10	N.D.	N.D.
Progesterone	10	N.D.	N.D.
Testosterone	10	N.D.	0.001
17 β -estradiol-3-sulfate -17 β -D-glucuronide	10	N.D.	N.T.
17 β -estradiol 17-propionate	1	0.10	N.T.
17 β -estradiol 17-valerate	1	0.044	N.T.
Estriol 3-sulfate	10	N.D.	N.T.
d-Aldosterone	10	N.D.	N.T.
Androstendion	10	N.D.	N.T.
5 α -androstane-3 α , 17 β -diol	10	N.D.	N.T.
Cortisone	10	N.D.	N.T.
Danazol	10	N.D.	N.T.
DHEA	10	N.D.	N.T.
DHEA-S	10	N.D.	N.T.
Equilin	1	0.008	N.T.
Ethisterone	10	N.D.	N.T.
17 α -hydroxypregnenolone	10	N.D.	N.T.
17 α -hydroxyprogesterone	10	N.D.	N.T.
Mestranol	0.1	0.17	N.T.
Norethindrone acetate	10	N.D.	N.T.
Clomiphene citrate salt	10	N.D.	N.T.
Tamoxifen	10	N.D.	N.T.

* N.D.: 検出限界以下 (Not detectable)
* * N.T.: 未評価 (Not tested)

どのエストロゲンに対する交叉反応性がEテスト「TOSOH」II (E2)と比較して大きく改善していたことから、エストラジオールに対して高い特異性を有していると判断できた。

6. まとめ

今回開発したEテスト「TOSOH」II (hsE2)について、基本性能を確認した。

2SD法による最小検出感度は1.9 pg/mLで、実効検出感度は9.1 pg/mL (CV=10%)及び4.2 pg/mL (CV=20%)と、既存の自社エストラジオール測定試薬であるEテスト「TOSOH」II (E2)と比較して約4倍、他社エストラジオール測定試薬と比較して約2倍以上の実効検出感度を有していることが確認された。測定内、測定間再現性は5%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の影響

を受けにくいこと、血清、血漿（ヘパリン）両検体を同等に測定可能なことが確認された。交叉反応性試験結果から本試薬はエストラジオールに対する特異性が非常に高く、他のステロイドや不妊治療における薬剤に対する交叉反応をほとんど示さなかった。相関性試験において、Eテスト「TOSOH」II (E2)や他社エストラジオール測定試薬と良好な相関性を示し、特に高感度・高精度のエストラジオール測定法であるID-GC/MS法に対しては最も良好な相関性を示した。

以上のことから、本高感度エストラジオール測定試薬は、高感度且つ高精度でエストラジオールを測定可能であることが確認された。卵巣機能低下の際に実施されるホルモン充填療法においては、骨量の維持及び子宮内膜病変リスクの軽減から血中エストラジオール濃度を30~50 pg/mLにコントロールすることが望ましいとされており、高感度エストラジオール試薬の性能としてそれに応じた実効検出感度が要求される¹²⁾。

Eテスト「TOSOH」Ⅱ (hsE2) は前述の要求される感度を十分有しており、不妊治療のモニタリング等に加え、低濃度を十分な精度で評価する必要がある小児や更年期における性腺機能把握などへの応用が期待される。

7. 謝 辞

本開発において健常者の濃度分布の確認に対してご協力していただいた先生に厚く御礼申し上げます。

東京ベイレディースクリニック院長

：大塩 達弥 先生

東京ベイレディースクリニック・検査部

：松永 陽子 先生

文 献

- 1) 井上聡、他、臨床検査、52、1265-1269 (2008)
- 2) Cunningham FG., et al., *Williams Obstetrics 23rd Edition*, (2009)
- 3) Nader S., et al., *Fertil. Steril.*, 45, 75-78 (1986)
- 4) Ben-Rafael Z., et al., *Fertil. Steril.*, 45, 51-57 (1986)
- 5) Abraham GE., et al., *J. Clin. Endocrinol.*, 34, 312-318 (1972)
- 6) Goisk J., et al., *Recent Progress in Hormone Research*, 42, 297-329 (1986)
- 7) Richette P., et al., *Joint Bone Spine*, 70, 257-262 (2003)
- 8) Rossouw JE., et al., *JAMA*, 288, 321-333 (2002)
- 9) Sundeeep K., et al., *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.*, 32, 195-218 (2003)
- 10) Nichols K., et al., *Obstet. Gynaecol. Survey*, 39, 230-245 (1984)
- 11) 松葉隆雄、他、東ソー研究・技術報告、52、3-9 (2008)
- 12) 五十嵐正雄、他、産婦人科最新診断治療指針、399 (1996)