-技術資料-

●全自動心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) 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

佐藤 弘樹 新谷 晃司 林 俊典

1. はじめに

心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)は、28個のアミノ酸から構成されるホルモンであり、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)とともにナトリウム利尿ペプチドファミリーとして知られている。これらは分子内に特徴的な環状構造を有し、生体内においてナトリウム利尿作用や血管拡張作用などさまざまな生理作用を果たしている¹⁾。

ANP は主に心房で合成され、心臓に対する負荷に応じて血中に放出されることが報告されているため、心不全、心肥大、腎不全といった心臓に負荷がかかるような疾患の重症度及び治療効果の判定指標として測定が行われている²⁾⁻⁷⁾。また、透析患者の水分管理時の目安となる体重、いわゆるドライウエイトの指標としても広く使用されている^{8),9)}。

ANPの測定は、外注され検査センターで主に行われているのが現状である。その一方で臨床現場では報告時間の短縮や診療前検査などの診療支援の要望が強くなってきており、院内測定のニーズが高まっている。

我々は全自動エンザイムイムノアッセイシステムとして施設セグメント別に大型、中型、小型の装置をラインアップし、検査センター、大学病院、クリニックなどの幅広いユーザーに50項目以上の診断薬を販売している実績から、本ニーズに応えるためにANP測定試薬の開発を進めた。

今回、我々は ANP を迅速に精度よく測定できるよ

う ANP 測定試薬の 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 ANP 測定試薬 (E テスト「TOSOH」 II (ANP)) は抗原抗体反応に関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2種類のモノクローナル抗体は各々ANP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(ANP)-酵 素標識抗体)を形成する(図1)。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℃、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)を分注して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。基質の蛍光強度は酵素 量に依存することから、酵素とともに免疫複合体を形 成する ANP 抗原の量にも比例することとなる。した がって、あらかじめ既知濃度の ANP を含む標準品を 用い、その蛍光強度と ANP 濃度による標準曲線を作 成し、ANP濃度未知の患者検体の蛍光強度に相当す る ANP 濃度を標準曲線より算出することにより ANP

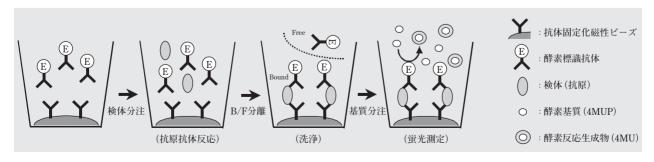


図1 ANP測定の免疫複合体模式図

測定項目	EDTA 血漿中 ANP
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 ANP マウスモノクローナル抗体)
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℃ · 10 分
酵素反応温度・時間	37℃・5分
測定対象検体	EDTA 血漿
測定範囲	5.0~2,000pg/mL
検体量/分注水量	50 μ L / 100 μ L
標準品形状	凍結乾燥品(6 濃度)
濃度単位	pg/mL

表 1 ANP 測定試薬の主な仕様

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. AIA 試薬の開発

ANPの測定試薬として短時間かつ精度の高い測定試薬の開発をするために塩野義製薬株式会社よりANPへの親和性の高い2種類のマウスモノクローナル抗体を導入した。この2種類の抗体はANPの生理活性発現に重要とされるC末端部位及び環状構造を認識する抗体であるっ。固定化抗体について固定化量及び固定化の条件を最適化し、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使用濃度を決定した。

免疫反応液組成について、再現性、安定性を向上す

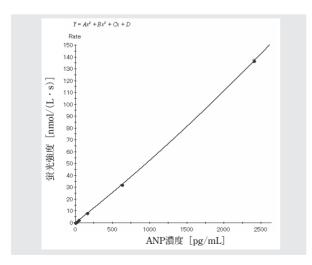


図2 ANP測定試薬の検量線例

べく添加する各種蛋白質、各種糖類の組成及び分量を 最適化した。また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 を抑えるために複数の蛋白質をブロッキング剤として 添加した。

また、標準品にはヒト血清が用いられることが多いが、血清成分中に含まれるプロテアーゼによる ANP 分解が懸念されるため、ヒト血清ベースではなく蛋白質と緩衝液を使用する組成にすることで安定性を確保した。またそれに伴い、ANP の容器へ吸着を防止するため、各種蛋白質濃度も最適化した。

その結果、他社キットと同等の基本性能を有し、短時間で精度の高い測定試薬を開発することができた。

4. 基本性能評価

(1) 感度試験

ANP ゼロ濃度の標準品を 10 重同時測定し、得られたレート値の平均値+ 2SD の濃度換算値より最小検出限界を求めたところ 0.27 pg/mL であった。また、0.62 pg/mL から 15.6 pg/mL の範囲で 10 種の低 ANP 濃度サンプルを作製し、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 2.13 pg/mL となり、良好な結果が得られた(図 3)。

(2) 再現性試験

同時再現性および日差再現性について、ANP 濃度の異なる3種のEDTA 血漿を用いて行った。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、CV は1.3 ~ 2.2%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

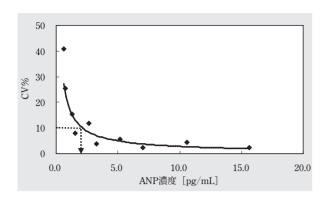


図3 実効感度

行った日差再現性試験の結果(検量線作成後92日間)、 CV は1.7~3.8%であった(表3)。

表 2 同時再現性

血漿	ANP 平均値	SD	CV
	[pg/mL]	[pg/mL]	[%]
A	54.2	1.2	2.2
В	266.0	4.4	1.6
C	987.8	12.6	1.3

表 3 日差再現性

 血漿	ANP 平均值	SD	CV
	[pg/mL]	[pg/mL]	[%]
A	53.6	2.0	3.8
В	266.9	4.4	1.6
С	980.4	16.3	1.7

(3) 希釈直線性試験

希釈直線性試験をANP濃度の異なる3種のEDTA血漿を用いて行った。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、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、プール血漿(EDTA 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 EDTA 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。

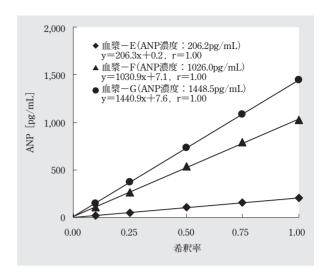


図4 希釈直線性

表 4 共存物質および抗凝固剤の影響

	添加量	プール血漿
		回収率 [%]
遊離型ビリルビン	0.8~16.8 [mg/dL]	98.7~99.5
抱合型ビリルビン	$0.8 \sim 18.4 \text{ [mg/dL]}$	96.5~98.5
脂質	83~1,660 [mg/dL]	100.0~100.4
ヒト血清アルブミン	$0.3 \sim 5.0 [g/dL]$	95.1~100.1
アスコルビン酸	$1.0 \sim 20.0 \text{ [mg/dL]}$	97.4~100.2
EDTA	$0.5\sim 10.0 \text{ [mg/mL]}$	100.1~100.2

(5) 健常者の濃度分布

健常者 155 例について、血漿中の ANP 濃度を測定 した結果のヒストグラムを**図 5** 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、7.3 ~ 42.9 pg/mL であった。

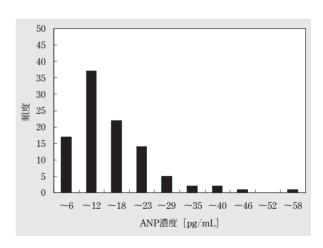


図5 健常者の濃度分布

(6) 他社キットとの相関性

254 例の EDTA 血漿検体を使用し、多くの検査センターで使用されている全自動化測定キットの A 社

CLEIA 法 (x) と本試薬 (y) との相関性を確認した結果、A 社 CLEIA 法と良好な相関性が認められた(図 6)。

171 例の EDTA 血漿検体を使用し、全自動測定キットの B 社 CLEIA 法(x)と本試薬(y)との相関性を確認した結果、B 社 CLEIA 法と良好な相関性が認められた(図7)。

5. 検体の安定性評価

温度の影響

ANP 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 ANP は不安定 性であることが知られている 8 。そこで健常者検体 5 例を室温(23 C)と 4 Cの温度条件下でそれぞれ保存 した時の検体中の ANP の安定性を検証した(図 8)。

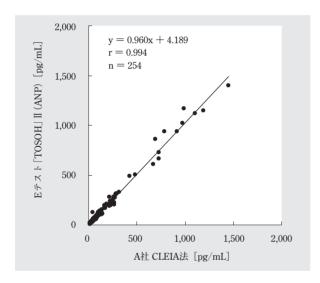


図6 A社 CLEIA法との相関性

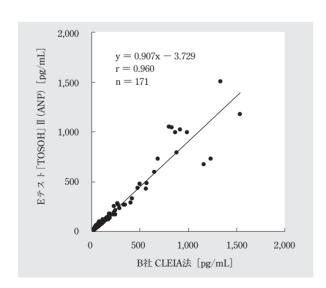


図7 B社 CLEIA法との相関性

図8では0時間目に測定した濃度値を100%として各時点における回収率を算出し、5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、5時間後の回収率の平均値は室温(23℃)条件で87%、4℃、5時間の条件で91%とどちらの条件も時間の経過に伴い、測定値の低下傾向が認められた。特に室温(23℃)では短時間での測定値の低下がみられたため、採血から測定までの検体の取り扱いには注意が必要であると考えられた。また、健常者検体5例を用いた別の評価では、-20℃で1 τ 月間保存した場合、凍結保存前の測定値に対する回収率は95~97%であった。検体を冷蔵保存しても測定値の低下は免れないため、すぐに測定できない場合には、速やかに-20℃以下で凍結保存することが推奨される。

また、-80℃に凍結保存した健常者検体5例を用いて 凍結融解を繰り返したときの影響を検証した(図9)。

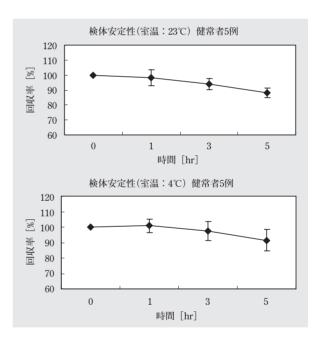


図8 検体の安定性:温度の影響

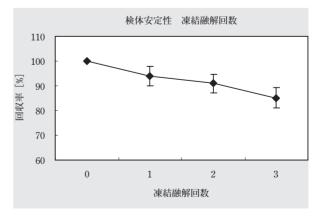


図9 検体の安定性:凍結融解の影響

図9では凍結保存前に測定した濃度値を100%として各凍結融解数における回収率を算出し、5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、凍結融解を3回繰り返した検体の回収率は89%と凍結前の測定値と比べ10%低下していた。この結果から、可能な限り凍結融解を繰り返さないことが推奨され、正確な測定値を得るには凍結融解の繰り返しは2回までが限度と考えられる。

溶血の影響

EDTA 血漿中の ANP を測定する場合、溶血によって放出された赤血球由来のプロテアーゼが ANP の分解を促進することが知られている ¹⁰⁾、そこで赤血球溶血物を EDTA 血漿検体に添加し、ANP の安定性検証した。

アプロチニン含有 EDTA 採血管を用いて採血した 検体より自家製溶血ヘモグロビンを作製した。EDTA -アプロチニン血漿検体 2 種類(ANP 濃度 44.7、892 pg/mL)に対して自家製溶血ヘモグロビンを添加す ることで、ヘモグロビン濃度が 0 mg/dL、50 mg/ dL、100 mg/dL、250 mg/dL の偽似溶血検体を調製 した。これを用いて室温(23°C)における ANP の安 定性を評価した。

ヘモグロビン濃度が0mg/dLの各検体を0時間目

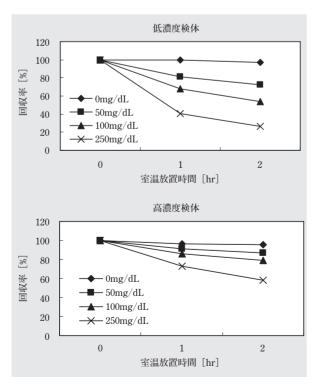


図10 検体の安定性:溶血の影響

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 10)。どちらの検体においても自家製溶血へモグロビンを添加することで安定性が低下したが、特に、ANP低濃度の検体への影響が大きかった。ヘモグロビン濃度 250 mg/dLの検体では室温 2 時間経過後に測定値が 26.7%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性があると考える。

6. まとめ

今回開発した ANP 測定試薬について基本性能を確認した。

同時再現性、日差再現性は CV3.8%以内と良好であり、検体の希釈直線性も良好であった。また、最小検出感度が 0.27 pg/mL、実効感度として CV が 10%の理論値を算出したときの濃度は 2.13 pg/mLとなり、既存の方法と比較して良好な結果が得られた。

ANPのアプロチニン含有検体中での安定性について温度と溶血の与える影響について評価した。ANPはプロテアーゼがより活性化される室温条件での測定値の低下が大きかった。また、プロテアーゼが暴露する溶血によっても測定値の低下は促進された。ANPの測定で用いられている採血管にはEDTA以外にもプロテアーゼインヒビターとしてアプロチニンが含まれているが、これらの阻害能力ではプロテアーゼによるANPの分解を完全には抑制できなかった結果、測定値の低下がみられたと考えられる。正確な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。その他の検体中の共存物質や抗凝固剤は測定系に影響を及ぼさないことを確認した。他社キットとの相関性試験においても良好な相関性を示した。

近年、我が国の透析患者数は増加の一途を辿っており、病状のコントロールは重要な課題である。導入部にも述べたが、ANPは透析患者のドライウエイトの指標として広く使用されており、ドライウエイトを正確に管理するために本試薬による迅速測定が貢献できると考えられる。

また、ANPはBNPほどではないが、心疾患イベントの鑑別やモニタリングの指標として測定が行われている。特に、僧房弁狭窄症のように主として心房のみに負荷がかかるような症例ではBNPの値は上昇せずANPの値のみが上昇するため、心疾患の診断を行う上では重要な役割を果たすと考えられる。

さらに近年、腎疾患患者は心疾患を発生するリスク

が高いことが明らかとなってきている¹²⁾。特に透析患者の心疾患合併症は予後不良となるため、病状のコントロールが重要であり、臨床現場では、カルシウム代謝状態を把握するだけでなく心臓の状況も把握することが必要となっている。

我々は、AIA 試薬の心疾患マーカーとして既に BNP 測定試薬、cTnI 測定試薬、CKMB 測定試薬、ミ オグロビン測定試薬を、透析/腎疾患マーカーとして Intact PTH 測定試薬、CysC 測定試薬、BMG 測定試 薬を販売しており、複数の項目を同時に測定すること が可能である。今回、本試薬を開発したことで透析患 者をはじめとする腎疾患患者の心疾患発生リスクの予 防、病状のコントロールに貢献できるものと考える。

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。

医療法人鉄蕉会 亀田総合病院 臨床検査部

: 大塚 喜人 部長: 吉川 康弘 先生: 積田 智佳 先生

文 献

- 1) Kangawa, K, et al, Biochem.Biophys.Res.Commun, 118, 131-139 (1984)
- 2) Sugawara, A, et al, Biochem.Biophys.Res.Commun, 129, 439-446 (1985)
- 3) 泰江弘文、他、最新医学、46、1、16-20 (1991)
- 4) 平田恭信、最新医学、46、1、21-30 (1991)
- 5) 笹貫宏、他、最新医学、46、1、31-38 (1991)
- 6) 小川佳宏、他、ホルモンと臨床、39、8、823-830 (1991)
- 7) 浜典男、他、基礎と臨床、25、13、4205-4212 (1991)
- 8) 西川光重、他、基礎と臨床、26、8、3685-3692 (1992)
- 9) 成瀬光栄、他、基礎と臨床、26、6、2581-2588 (1992)
- 10) 片山信子、他、基礎と臨床、27、3、1145-1151 (1993)
- 11) 鈴木洋行、他、Mebio、26、1、20-28 (2009)
- 12) 甲斐久史、他、J Jpn Coll Angiol、50、6、659-664 (2010)