



●葉酸測定試薬及びビタミン B12 測定試薬の開発

バイオサイエンス事業部 第一開発部 試薬グループ 三谷 俊介
田中 千代
北岡 憲二
東ソー・エイアイエイ株式会社 製造グループ 堀田 秀樹

1. 序論

赤血球細胞の形成や核酸合成に関与する酵素の補酵素として働く水溶性ビタミンとして葉酸及びビタミン B12 が知られている。これら二つのビタミンは体内では合成されず、食事やサプリメントなど体外から摂取する必要がある。臨床的には貧血マーカーとして主に欠乏症の診断に用いられている。

葉酸欠乏の主な疾患として、DNA 合成が阻害されることで正常に赤血球が造られなくなる巨赤芽球性貧血がある¹⁾。さらに葉酸は胎児の神経系発達にも重要であり、葉酸のサプリメント摂取で神経管閉鎖障害のリスクが低減するため、妊娠計画初期からの摂取が厚生労働省から推奨されている²⁾。また、米国食品医薬品局 (U.S. Food and Drug Administration : FDA) は製造業者に対し、穀物製品について葉酸添加を要請するなど、葉酸欠乏回避のための施策が執られている³⁾。

ビタミン B12 欠乏の主な疾患は葉酸同様に巨赤芽球性貧血であり、疲労感や便秘、食欲不振、体重減少が症状として現れる。さらに別の欠乏症状としてうつ、認知症、記憶力の低下などが報告されている⁴⁾。こうした中でビタミン B12 摂取推奨量が厚生労働省より定められているが、近年ではその推奨量では栄養状態保持には少ない可能性があるとの見解を示す論文も出てきており⁵⁾、葉酸同様に適正な摂取が望まれている。

以上のように、葉酸及びビタミン B12 は健康維持の指標および臨床上の有用性が今後さらに高まる可能性がある物質である。

今回、我々は全自動化学発光酵素免疫測定装置 (AIA[®]-CL2400 又はそれと同等の性能を有する専用機器) を用いて、簡便かつ迅速に葉酸及びビタミン B12 を測定できる試薬の開発を行ったので、その基本性能について報告する。なお、本技術は適切な診断及び治療を提供する一助として医療に貢献することを目指したものである。

2. 測定原理と材料

葉酸は血中で葉酸結合蛋白質と結合しているため、前処理によって検体中の葉酸を遊離させ、測定に用いる。ビタミン B12 も同様に前処理によって結合蛋白質から遊離させるが、さらにシアン化カリウムを添加し、検出可能な CN 型ビタミン B12 (シアノコバラミン) に変換させ、測定に用いる。以上の理由から葉酸及びビタミン B12 は検体前処理が必要となる。

今回開発した葉酸測定試薬及びビタミン B12 測定試薬は血清中の葉酸またはビタミン B12 濃度を測定する試薬であり、前処理工程を葉酸及びビタミン B12 の各々の専用前処理カップ (表 1 参照) 中で、反応工程を各々の反応試薬カップ中で実施する。反応に必要な物質は凍結乾燥し、試薬カップ内に密封されている (ビタミン B12 前処理試薬-2 については液状品での供給となり、専用バイアルへ分注、装置へ架設して使用する)。

反応試薬の試薬カップには 2 つのセル (セル (1)、セル (2)) がある。セル (1) には磁性微粒子に固定化された葉酸結合蛋白質またはビタミン B12 結合能を有する内因子を含む凍結乾燥体が、セル (2) にはアルカリ性ホスファターゼ標識葉酸誘導体またはビタミン B12 誘導体を含む凍結乾燥体が封入されている。この試薬カップのセル (1) に分注水と前処理された検体を、セル (2) には分注水を加え、それぞれ凍結乾燥試薬を溶解する。前処理された検体が注入されたセル (1) においては凍結乾燥試薬が溶解すると同時に第一反応が開始する。一定時間、一定温度でインキュベートした後、セル (2) の内容物を一定量、セル (1) に移すことにより第二反応が開始される。一定時間、一定温度でインキュベートした後、洗浄水で洗浄することにより、未反応の各種酵素標識誘導体と検体成分を除去する (B/F 分離)。B/F 分離後、磁性微粒子に結合した酵素活性を測定するために化学発光基質として 3-(5-tert-ブチル-4,4-ジメチル-2,6,7-トリオキ

サビシクロ [3.2.0] ヘプト-1-イル) フェニルリン酸エステル ジナトリウム塩 (DIFURAT[®]) を添加し、酵素による分解で得られる発光強度を測定することにより、検体中の葉酸またはビタミン B12 濃度を測定する。

測定の際、検体のカップへの分注、検体の前処理、一定時間下での測定対象物と結合蛋白質との反応、B/F 分離、基質分注、発光強度の測定は全自動化学発光酵素免疫測定装置により自動で行われ、各試薬ともに測定開始から約 25 分後に結果が得られる (試薬の主な仕様を表 1、測定原理図を図 1 に示す)。

3. 前処理試薬の開発

検体前処理は結合蛋白質から葉酸またはビタミン B12 を遊離させる変性工程、そして検出環境を整える中和工程の 2 段階構成となっている [図 2]。変性工程

では、水酸化ナトリウムで各種結合蛋白質を変性させ、検出対象である葉酸またはビタミン B12 を遊離させる。また、変性剤である水酸化ナトリウムと同時に還元剤を加え、悪性貧血患者が保持する非特異抗体 (夾雑物) を不活化する必要がある。なお、ビタミン B12 においてはさらにシアン化カリウムを添加し、血中のビタミン B12 類似体を検出可能なシアノコバラミンに変換する。中和工程では水酸化ナトリウムによりアルカリ性になった検出環境を中性付近に戻す目的で緩衝剤を添加し、前処理工程が完了する。

AIA-CL システムでは共通試薬を除き、試薬は凍結乾燥形態をとっている [図 3]。例として反応試薬を挙げると、固相試薬と標識試薬が二穴の試薬カップに凍結乾燥状態で封入されており、オールインワンカップ方式を採用している。較正試薬や検体希釈試薬も同様の試薬形態のため、いずれの試薬もトレイごと装置

表 1 試薬仕様

| 試薬名称 | AIA-パック CL 葉酸 | AIA-パック CL ビタミン B12 |
|---------|------------------|----------------------------------|
| 検出対象 | 葉酸 | ビタミン B12 |
| 前処理試薬形態 | 前処理試薬カップ (凍結乾燥品) | 前処理試薬-1 (凍結乾燥品) 前処理試薬-2 (液状品) |
| 対象検体種 | 血清 | 血清 |
| 検体量 | 40[μ L] | 50[μ L] |
| 検量域 | 1.0-20[ng/mL] | 90-2,000[pg/mL] |
| 測定時間 | 25[min] | 25[min] |

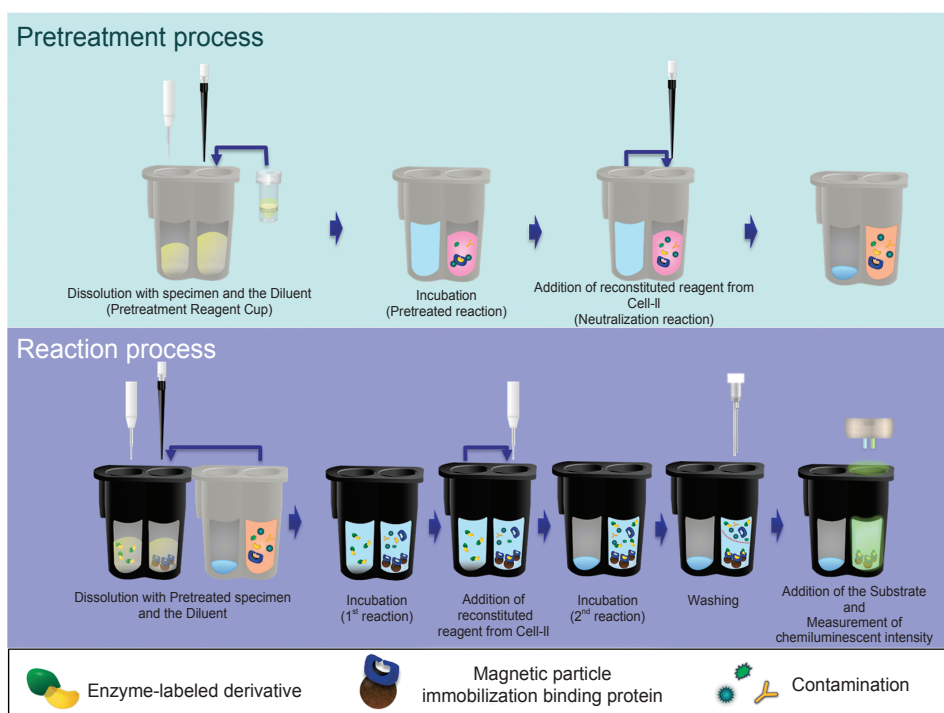


図 1 測定原理図 (葉酸測定の場合)



図2 前処理工程原理図

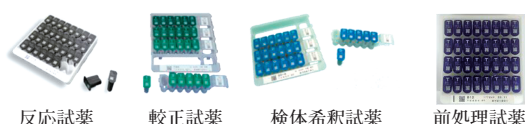


図3 各種試薬形態写真

へ架設するだけであり、ユーザビリティの高い仕様といえる。これらの試薬は凍結乾燥化しているため試薬安定性に優れ、さらにモノテスト（すべての反応工程が試薬カップ内で行われる）方式のためコンタミネーションや汚染に強く、用手の調製が不要であること、測定数の増減にフレキシブルに対応できるといった利点があり、競合他社に対する強みとなっている。そこで今回の前処理試薬についても凍結乾燥形態をとれるように開発を進めた（ビタミン B12 については前処理試薬成分にシアン化カリウムが含まれるため、一部を液状品として開発した）。以降は葉酸前処理試薬の開発工程について説明する。

二穴の試薬カップに変性剤と還元剤、そして中和剤を凍結乾燥状態で封入する必要があるため、原理上、変性剤と還元剤は共通の穴に封入する必要が生じる。しかしながら還元剤はアルカリ性条件下では活性が失われる。水酸化ナトリウムの有無による還元剤の残存

活性検証結果を示す。検証はイールマン試薬を用いて実施した [図4]。還元剤によって生成されるチオール基が、イールマン試薬中のジスルフィド結合を切断し生成する 2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸の吸光度を測定し評価した。0 日目の活性を 100% としたところ、水酸化ナトリウム共存化では 7 日後に残存活性が 27.2% まで低下した。

そこで試薬の凍結乾燥形態に着目し、変性剤と還元剤を 2 段分注することで還元剤の活性保持に成功した⁶⁾。すなわち、変性剤溶液と還元剤溶液は別個に調製し、初めに変性剤溶液を分注、凍結する。その後、還元剤溶液を分注し凍結することで還元剤の活性を保持でき、かつ 1 穴に変性剤と還元剤を共存させることができた [図5]。

既存の体外診断用前処理試薬には測定前に用手調製が必要なものや、安定性の兼ね合いから試薬の開封後有効期間が 14 日間程度のものもある。一方で、今回

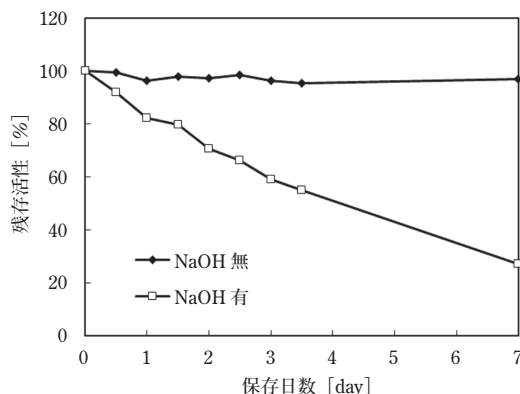


図4 水酸化ナトリウムの有無による還元剤の残存活性

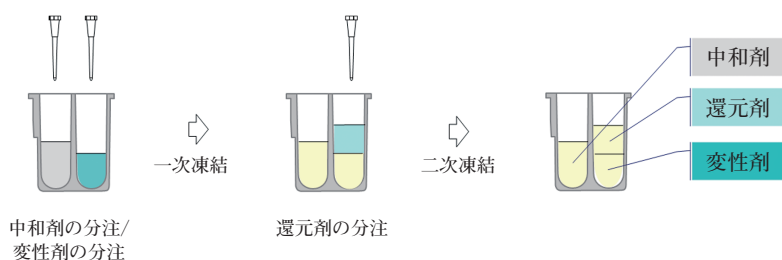


図5 変性剤及び還元剤の2段分注原理図

開発した AIA-CL 前処理試薬はモノテスト仕様であり、用手調製が不要のため調製ミスがなく、装置上ですべての前処理工程が実施される。また、凍結乾燥形態のため試薬の安定性が高く、装置にセットしてからの安定性（開封後安定性）は 180 日であり、未開封の場合の有効期間は 25 ヶ月となっており、総じてユーザビリティの高い試薬開発ができたといえる。

4. 基本性能評価

[1] 再現性

測定内再現性、測定間再現性試験を 3 種のプール血清を用いて行った。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、各試料の測定値の変動係数（coefficient of variation；

CV）は葉酸：2.6～4.0%、ビタミン B12：1.3～2.4%であった。各試料を試薬、装置を変えずに 1 日 4 回測定し、それを 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 93 日間に渡って合計 80 回測定）、各試料の測定値の CV は葉酸：2.3～4.4%、ビタミン B12：0.9～3.6%であった [表 2]。

[2] 共存物質の影響

検体中に含まれる可能性のある各物質をプール血清へ添加し、測定値への影響を確認した [表 3]。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、アスコルビン酸を各々表 3 に記載の濃度まで添加し測定した。その結果、未添加条件に対して測定値はいずれも ±10% 以内であったため、これら物質は表 3 に記載の濃度まで添加しても影響しないと判断した。

表 2 測定内および測定間再現性

| | 測定内再現性 (n=5) | | | 測定間再現性 (n=80, 93 日間) | | |
|---------------|--------------|------|-------|----------------------|------|-------|
| | Low | Mid. | High | Low | Mid. | High |
| 1) 葉酸 | | | | | | |
| Mean [ng/ mL] | 3.9 | 9.0 | 15.5 | 3.9 | 9.3 | 15.5 |
| SD | 0.1 | 0.4 | 0.4 | 0.2 | 0.3 | 0.4 |
| CV [%] | 2.7 | 4.0 | 2.6 | 4.4 | 3.0 | 2.3 |
| 2) ビタミン B12 | | | | | | |
| | 測定内再現性 (n=5) | | | 測定間再現性 (n=80, 93 日間) | | |
| | Low | Mid. | High | Low | Mid. | High |
| Mean [pg/ mL] | 356 | 700 | 1,257 | 369 | 713 | 1,278 |
| SD | 8.5 | 11.8 | 16.1 | 13.1 | 10.5 | 11.0 |
| CV [%] | 2.4 | 1.7 | 1.3 | 3.6 | 1.5 | 0.9 |

表 3 共存物質の影響

| | 葉酸 | ビタミン B12 |
|-------------------|-----|----------|
| ヘモグロビン [mg/ dL] | 44 | 440 |
| 遊離型ビリルビン [mg/ dL] | 17 | 17 |
| 抱合型ビリルビン [mg/ dL] | 17 | 19 |
| 脂質 [mg/ dL] | 830 | 1600 |
| ヒト血清アルブミン [g/ dL] | 2.5 | 2.5 |
| アスコルビン酸 [mg/ dL] | 20 | 20 |

[3] 希釈性能試験

濃度の異なる3種の血清検体を用い、希釈性能試験を行った[表4]。各々の検体を葉酸・ビタミンB12共通の検体希釈試薬(AIA-CL用 検体希釈試薬F)を用いて測定装置上で10倍まで自動希釈を実施した。4重測定した結果、いずれの血清検体においても理論濃度に対する回収率が±15%以内に収まっており、良好な希釈性能を有することが示された。

[4] ブランク上限、検出限界、定量限界

0濃度サンプル4種類を5日間3重測定し、総計60のデータからブランク上限(Limit of Blank)を算出したところ、葉酸は0.322 ng/mL、ビタミンB12は36.2 pg/mLであった。また、5濃度のプール血清を調製し、それらの検体について一日あたり4重測定を3日間繰り返し、総計60のデータから検出限界(Limit of Detection)を算出したところ、葉酸は0.775 ng/mL、ビタミンB12は47.8 pg/mLであった。さらに10濃度のプール血清を調製し、それらの検体について一日あたり8重測定を5日間繰り返し、Precision profileにて定量限界(Limit of Quantitation)を算出し

た[図6]。その結果、葉酸の定量限界はCV10%において2.24 ng/mL、CV20%において1.09 ng/mLとなった。また、ビタミンB12の定量限界はCV10%で91.8 pg/mL、CV20%で45.6 pg/mLとなった。

[5] 相関性

大阪大学医学部附属病院の協力のもと、AIA-CL2400(y)を用いて、対照となる2種の既存体外診断用医薬品キット(x)との相関性を確認した⁷⁾[図7]。その結果、葉酸は対照キット-1においてn=130、回帰式 $y=1.08x-1.78$ 、相関係数 $r=0.930$ であり、対照キット-2についてはn=130、回帰式 $y=1.08x-0.548$ 、相関係数 $r=0.951$ であった。ビタミンB12について対照キット-1との相関性はn=121、回帰式 $y=0.967x-9.16$ 、相関係数 $r=0.966$ であり、対照キット-2についてはn=116、回帰式 $y=1.05x+36.0$ 、相関係数 $r=0.986$ であった。

[6] 機種間差

AIA-CL2400(x)と、中型機のAIA-CL1200(y)、および小型機であるAIA-CL300(y)との機種間差を確認

表4 希釈性能試験

| 1) 葉酸 | | | | | 2) ビタミンB12 | | | | |
|-------|-----|-----------------|-----------------|------------|------------|-----|-----------------|-----------------|------------|
| | 希釈率 | 理論濃度 [ng/mL] | 測定濃度 [ng/mL] | 回収率 [%] | | 希釈率 | 理論濃度 [pg/mL] | 測定濃度 [pg/mL] | 回収率 [%] |
| 血清-1 | - | 16.1 | 16.1 | - | 血清-1 | - | 1,709 | 1,709 | - |
| | 5 | 3.2 | 3.2 | 100 | | 5 | 342 | 375 | 110 |
| | 10 | 1.6 | 1.4 | 88 | | 10 | 171 | 162 | 95 |
| 血清-2 | - | 14.8 | 14.8 | - | 血清-2 | - | 1,637 | 1,637 | - |
| | 5 | 3.0 | 2.6 | 87 | | 5 | 327 | 345 | 105 |
| | 10 | 1.5 | 1.3 | 87 | | 10 | 164 | 145 | 89 |
| 血清-3 | - | 14.4 | 14.4 | - | 血清-3 | - | 1,299 | 1,299 | - |
| | 5 | 2.9 | 3.2 | 110 | | 5 | 260 | 225 | 87 |
| | 10 | 1.4 | 1.3 | 90 | | 10 | 130 | 115 | 88 |

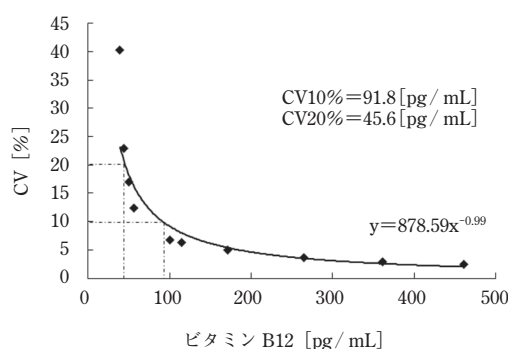
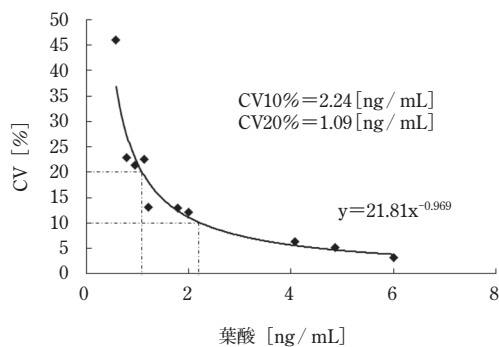


図6 定量限界

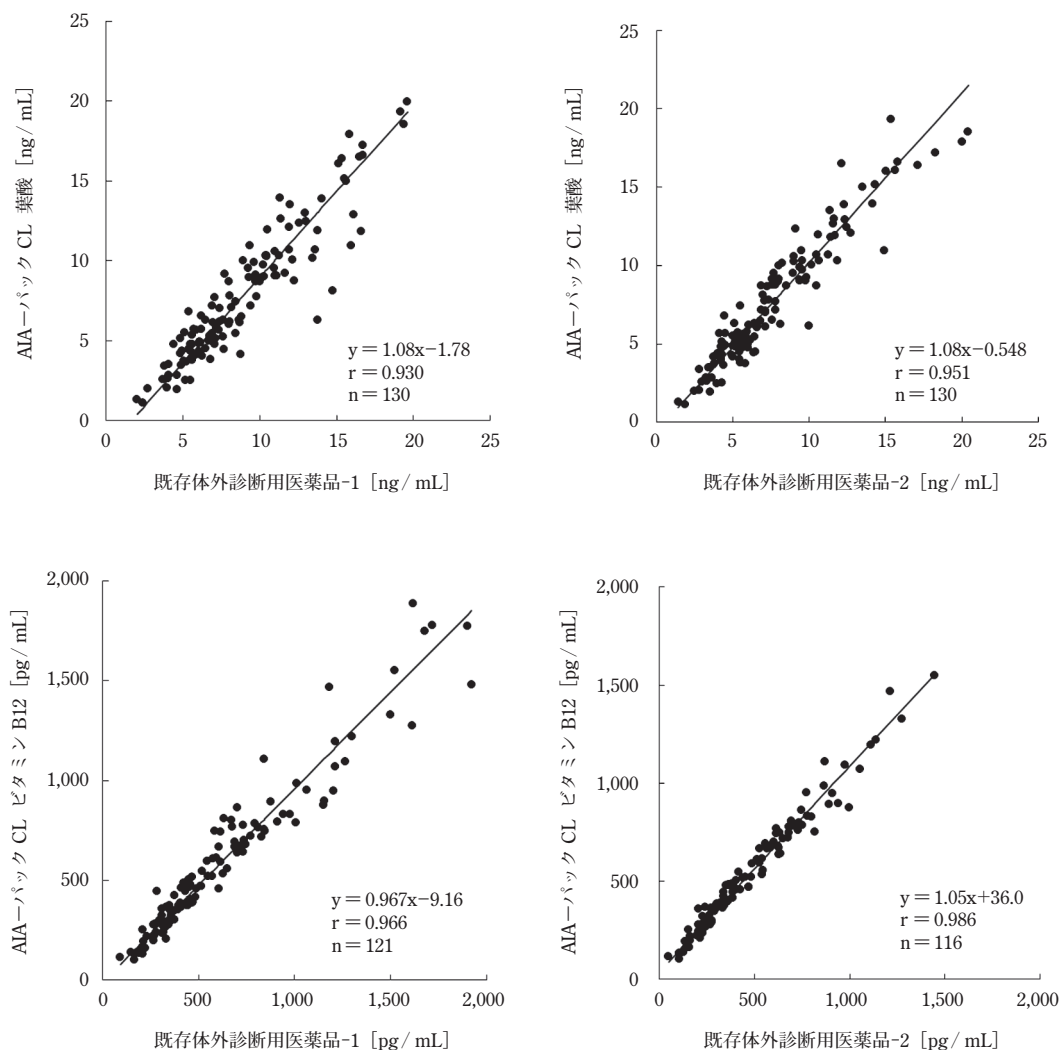


図7 既存体外診断用医薬品キットとの相関性

した [図 8]。その結果、葉酸は AIA-CL2400 と AIA-CL1200 の機種間差は $n=100$ 、回帰式 $y=0.984x-0.01$ 、相関係数 $r=0.977$ であり、AIA-CL2400 と AIA-CL300 では $n=100$ 、回帰式 $y=0.998x+1.11$ 、相関係数 $r=0.984$ であった。ビタミン B12 は AIA-CL2400 と AIA-CL1200 の機種間差は $n=100$ 、回帰式 $y=1.00x-6.85$ 、相関係数 $r=0.999$ であり、AIA-CL2400 と AIA-CL300 では $n=99$ 、回帰式 $y=1.01x+16.8$ 、相関係数 $r=0.996$ であった。

5. 総括

今回、我々は葉酸測定試薬及びビタミン B12 測定試薬を開発した。これらの試薬は測定機器として全自動化学発光酵素免疫測定装置 AIA-CL シリーズを用いて、迅速 (約 25 分) かつ多検体の測定が可能である。本試薬は葉酸及びビタミン B12 測定に必要な前処理操作を凍結乾燥技術によりモノテスト仕様とし、前処

理工程の自動化に成功した。用手調製が不要であることや、試薬有効期間が 25 ヶ月と長期にわたって安定であることが大きな特長となっている (ビタミン B12 前処理試薬については凍結乾燥品と液状品の 2 種類での供給となる)。

また、試薬の基本性能として、測定内、測定間再現性は 5% 以内と良好であり、検体中の共存物質の影響を受けにくいことが確認された。葉酸及びビタミン B12 測定試薬に共通の検体希釈試薬 (AIA-CL 用 検体希釈試薬 F) を用いて装置上での自動希釈性能を確認したところ、10 倍希釈まで良好な希釈性能を有することが確認された。既存の体外診断用医薬品 2 キットとの相関性も良好であった。さらに大型機である AIA-CL2400 と中型機の AIA-CL1200、および小型機の AIA-CL300 の同等性も確認できたことから、大病院から個人経営のクリニックまで幅広いユーザーの要望に答えることができる仕様となっている。

以上より、葉酸及びビタミン B12 測定試薬は前処

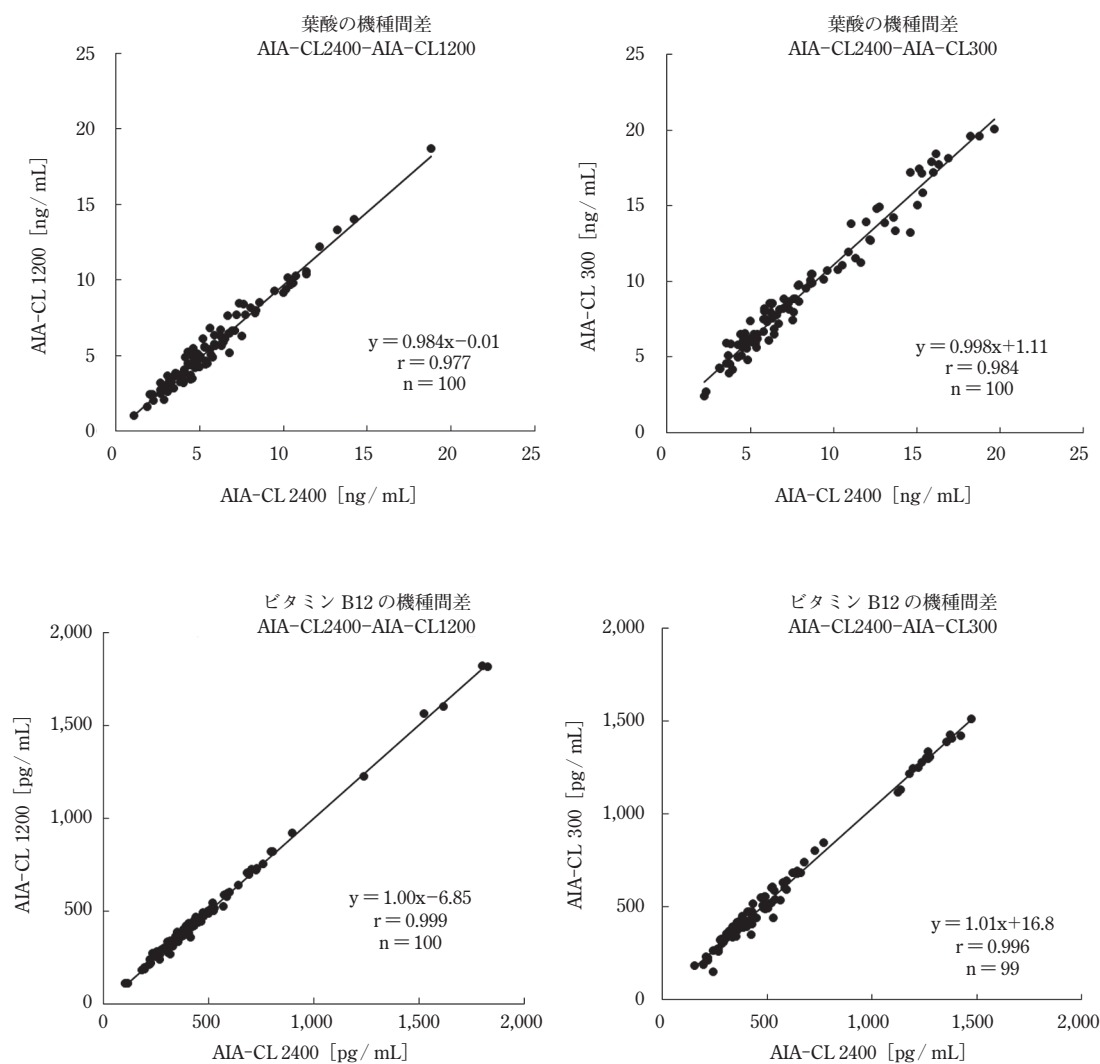


図8 機種間差

理試薬の用手調製が不要であり、かつ高い試薬安定性を有しているため、臨床検査現場の工数削減及び診断補助の一助となることが期待される。

6. 謝辞

本開発において、臨床評価、基礎評価ならびに多くの助言を頂きました大阪大学医学部附属病院臨床検査部・日高洋教授、同病院医療技術部検査部門・畑伸顕検査技師、家原暉恵検査技師に心より感謝を申し上げます。

7. 文献

- 1) 日本ビタミン学会、水溶性ビタミン学、**2**、390 (1980)
- 2) 厚生労働省、日本人の食事摂取基準 (2020年版)
- 3) U. S. Food and Drug Administration, *Food Standards:Amendment of Standards of Identity For Enriched Grain Products to Require Addition of Folic Acid.*, 61 (4), 8781-8797 (1996)
- 4) T. Bottiglieri, *Nutrition Reviews*, **54**(12), 382-390 (1996)
- 5) 渡邊文雄、ビタミン、**91**、595-602 (2017)
- 6) 東ソー株式会社、特開 2019-78590、2019-5-23
- 7) 家原暉恵、畑伸顕、日高洋ほか、医療検査と自動化、**47**(2)、168-177 (2022)

