

● サンドイッチ法を測定原理に用いたエストラジオール測定試薬の開発

バイオサイエンス事業部	第一開発部	試薬グループ	岸 亮太
(現：東ソー・エイアイエイ株式会社)	製造グループ		
バイオサイエンス事業部	第一開発部	試薬グループ	
東ソー・エイアイエイ株式会社	品管・品証グループ		篠崎 悠奈
バイオサイエンス事業部	第一開発部	試薬グループ	武藤 悠
			北岡 憲二

1. 序論

エストラジオールは、女性ホルモンであるエストロゲンの中で最も高活性で、主に性成熟期の女性の卵巣から産生・分泌され、女性生殖器に作用して生殖機能を支えるほか、エネルギー代謝、脂質代謝、骨代謝、血管機能、脳機能などを良好に維持している [文献 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、不妊症治療における卵巣成熟や排卵誘発のモニタリングの一手段としても有用とされている [文献 3, 4, 5]。

排卵誘発のモニタリングや体外受精の準備などの臨床状況では、エストラジオールの測定にはそれほど低濃度域の感度が要求されない場合が多いが、小児や更年期の性腺機能把握、乳がん治療のためのアロマターゼ阻害剤療法を受けている患者、性ステロイド代謝の先天性異常の診断、思春期障害および低用量ホルモン補充療法を受けている患者の治療モニタリングなどに対してはエストラジオールの高感度測定の臨床ニーズが高まっている [文献 6]。高感度・高特異的なエストラジオールの測定には、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) および液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) が優れているが、機器の操作や維持管理に高度の専門知識が要求されること、サンプルの前処理操作などマニュアル操作に頼る部分が多いことなど臨床検査として不利な点がある [文献 7]。一方で、イムノアッセイにおいては、類似化合物による交叉反応が起こり得ること、低濃度域の定量性が不十分な点などが問題として挙げられている。

当社は既に、全自動エンザイムイムノアッセイ装置専用試薬として E テスト「TOSOH」II (hsE2) および E テスト「TOSOH」II (ieE2)、全自動化学発光酵素免疫測定装置専用試薬として AIA-パック CL エストラジオールを販売しており、特に高感度試薬であ

る E テスト「TOSOH」II (hsE2) は低濃度域の感度が必要な臨床状況に対して有効であることを示している [文献 8]。一方で E テスト「TOSOH」II (hsE2) は測定時間が 30 分以上必要であったことから、より短時間で高感度を達成可能な試薬の製品化が期待されていた。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) を用いて既存の高感度試薬よりも更に迅速で高感度な試薬となる AIA-パック CL hs-E2 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

免疫検査には、サンドイッチ法と競合法の 2 つの測定原理があり、一般的に競合法はサンドイッチ法と比べ高感度化には不利という特徴を有する [図 1]。測定対象が高分子抗原であれば 2 つの抗体によって抗原を挟み込むサンドイッチ法での測定が可能であるが、エストラジオールなどの低分子抗原の場合は抗体に対して抗原が微小であるためサンドイッチ法での測定が困難である。そのため従来試薬では競合法を選択せざるを得なかった。そこで本開発では、磁性微粒子に固定化した抗体とエストラジオールが結合した免疫複合体を高分子抗原として認識する抗体を新規に取得することによって、サンドイッチ法によるエストラジオールの測定を可能とした [文献 9] [図 2]。

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抗エストラジオールウサギモノクローナル抗体を含む凍結乾燥体が、セル (2) には酵素としてアルカリ性ホスファターゼが標識された抗エストラジオール免疫複合体マウスモノクローナル抗体の凍結乾燥体が封入されている。この試薬カップのセル (1)

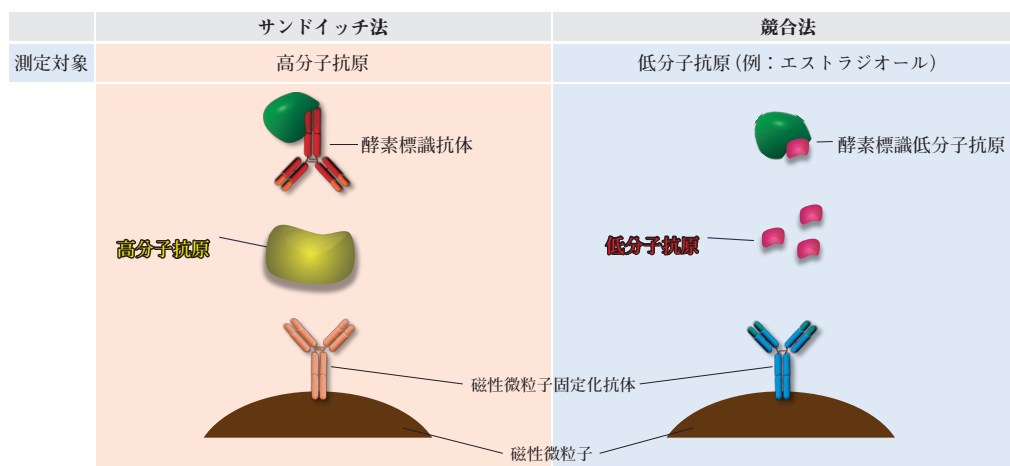


図1 サンドイッチ法と競合法の測定原理

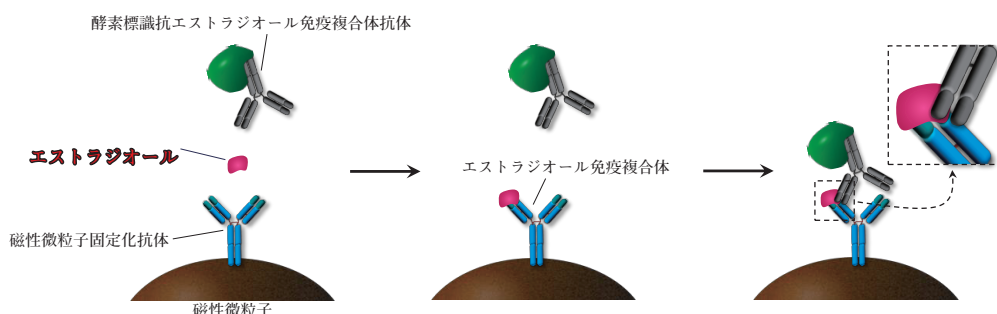


図2 エストラジオールのサンドイッチ法測定原理

に分注水と検体を、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。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、洗浄水で洗浄することにより、未反応の検体成分を除去する (B/F 分離)。B/F 分離後、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、未反応の酵素標識抗体を除去する。その後、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、検体中のエストラジオール濃度を測定する。

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、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、測定開始から約 15 分後に結果が得られる。(試薬の主な仕様を表 1 に示す)

3. 基本性能評価

[1] 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、0.5 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 1 日あたり 4 重測定を 3 日間繰り返して、総計 60 のデータから検出限界 (Limit of Detection) を算出したところ、0.9 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 1 日あたり 8 重測定を 5 日間繰り返して、Precision profile にて定量限界 (Limit of Quantitation) を算出した [図 3]。その結果、定量限界は CV10% において 2.7 pg/mL、CV20% において 1.0 pg/mL となり、AIA パック CL エストラジオールと比較して約 20 倍、E テスト「TOSOH」II (hsE2) と比較して約 4 倍、E テスト「TOSOH」II (ie2) と比較して約 15 倍の感度を有していることが確認された [表 2]。

表 1 試薬仕様 (既存試薬との比較)

試薬名称	AIA-パック CL [®] hs-E2	AIA-パック CL [®] エストラジオール
測定原理	2 ステップサンドイッチ化学発光酵素免疫測定法	ディレイ 1 ステップ競合化学発光酵素免疫測定法
反応関与成分	固相：抗エストラジオールウサギモノクローナル抗体 標識：抗エストラジオール免疫複合体マウスモノクローナル抗体	固相：抗エストラジオールウサギモノクローナル抗体 標識：エストラジオール誘導体
測定装置	全自動化学発光酵素免疫測定装置	全自動化学発光酵素免疫測定装置
対象検体種	血清または血漿 (ヘパリン)	血清または血漿 (ヘパリン)
検体量	10 μ L	30 μ L
測定範囲	2.0 ~ 2,000 pg/mL	20 ~ 3,000 pg/mL
結果報告時間	15 min	15 min

試薬名称	E テスト「TOSOH」 [®] II (hsE2)	E テスト「TOSOH」 [®] II (ieE2)
測定原理	ディレイ 1 ステップ競合蛍光酵素免疫測定法	1 ステップ競合蛍光酵素免疫測定法
反応関与成分	固相：抗エストラジオールウサギモノクローナル抗体 標識：エストラジオール誘導体	固相：抗エストラジオールウサギモノクローナル抗体 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-360 を除く)	全自動エンザイムイムノアッセイ装置
対象検体種	血清または血漿 (ヘパリン)	血清または血漿 (ヘパリン)
検体量	75 μ L	75 μ L
測定範囲	7 ~ 1,000 pg/mL	20 ~ 3,000 pg/mL
結果報告時間	35 min	18 min

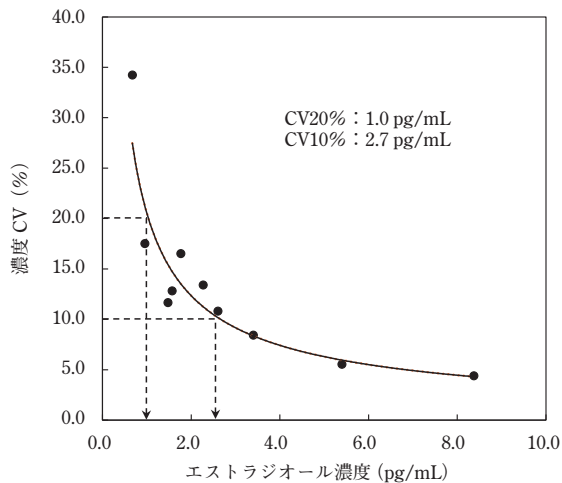


図 3 定量限界

表 2 定量限界比較

	定量限界 [pg/mL] CV20%
本法	1.0
AIA-パック CL エストラジオール	22.2 ^{*1}
E テスト「TOSOH」II (hsE2)	4.2 ^{*2}
E テスト「TOSOH」II (ieE2)	17.9 ^{*1}
他社 ECLIA 法	11.5 ^{*3}

※1 社内データ、※2 文献 10、※3 文献 11

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 0.4 ~ 2.1%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 99 日間に渡って合計 80 回測定)、各試料の測定値の CV は 2.1 ~ 2.6%であった [表 3]。

[2] 再現性

測定内再現性、測定間再現性試験を 3 種のプール血清およびプール血漿 (ヘパリン) を用いて行った。使

表 3 測定内および測定間再現性

	エストラジオール濃度 [pg/mL]					
	プール血清			プール血漿		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High
測定内再現性 (n=5)						
mean [pg/mL]	53.0	507.7	1,478.1	51.4	506.5	1,421.7
SD	0.2	8.4	30.7	0.8	2.0	17.9
CV [%]	0.4	1.7	2.1	1.5	0.4	1.3
測定間再現性 (n=80, 99 日間)						
mean [pg/mL]	53.5	509.6	1,466.8	51.0	507.3	1,439.5
SD	1.4	12.8	31.8	1.1	11.0	21.0
CV [%]	2.6	2.5	2.2	2.1	2.2	2.2

[3] 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〔表4〕。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、ヘパリンを各々表4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

表4 共存物質の影響

		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]	18	18
抱合型ビリルビン	[mg/dL]	17	17
脂質	[mg/dL]	1,600	1,600
ヒト血清アルブミン	[g/dL]	5.0	5.0
アスコルビン酸	[mg/dL]	20	20
ヘパリン	[U/mL]	100	100

あったため、これら物質は表4に記載の濃度まで添加しても影響しないと判断した。

[4] 希釈直線性試験

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て希釈直線性試験を行った〔図4〕。各々の検体を専用希釈液（AIA-CL用 検体希釈試薬D）を用いて、5段階の希釈系列を作製し4重測定した。その結果、いずれの血清検体およびヘパリン血漿検体においても図4に示すとおり良好な直線性が得られ、いずれの希釈サンプルも理論濃度に対する回収率が±10%以内に収まっていた〔表5〕。

[5] 健常者の濃度分布

健常者319例（女性：214例，男性：105例）について、血清中のエストラジオール濃度を測定した〔表6〕。

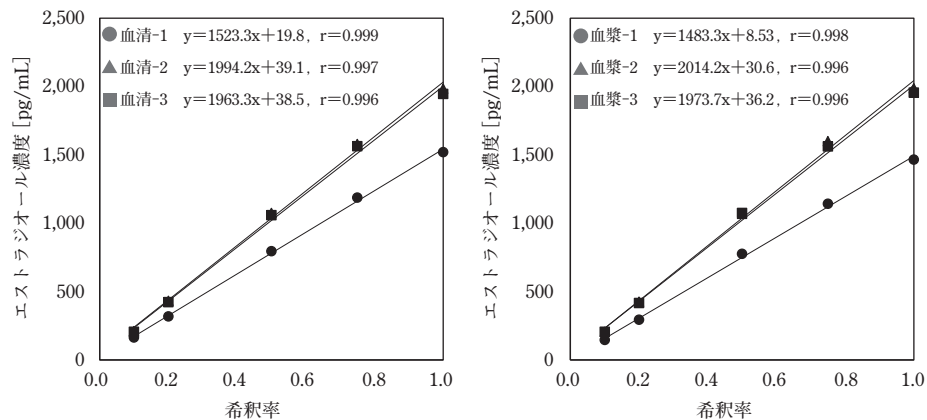


図4 希釈直線性

表5 希釈直線性

	希釈率	理論濃度 [pg/mL]	測定濃度 [pg/mL]	回収率 [%]
血清-1	—	1,519.9	1,519.9	—
	0.75	1,139.9	1,187.1	104
	0.5	759.9	794.9	105
	0.2	304.0	317.5	104
	0.1	152.0	163.8	108
	0.05	76.0	81.9	108
血清-2	—	1,984.8	1,984.8	—
	0.75	1,488.6	1,578.9	106
	0.5	992.4	1,075.3	108
	0.2	397.0	431.6	109
	0.1	198.5	210.3	106
	0.05	99.2	105.1	106
血清-3	—	1,946.9	1,946.9	—
	0.75	1,460.2	1,564.3	107
	0.5	973.4	1,059.3	109
	0.2	389.4	423.0	109
	0.1	194.7	205.6	106
	0.05	97.3	102.8	106
血漿-1	—	1,466.2	1,466.2	—
	0.75	1,099.7	1,142.6	104
	0.5	733.1	775.5	106
	0.2	293.2	294.2	100
	0.1	146.6	146.6	100
	0.05	73.3	73.3	100
血漿-2	—	1,988.3	1,988.3	—
	0.75	1,491.2	1,601.2	107
	0.5	994.2	1,069.4	108
	0.2	397.7	425.0	107
	0.1	198.8	205.2	103
	0.05	99.4	102.5	103
血漿-3	—	1,956.1	1,956.1	—
	0.75	1,467.1	1,561.7	106
	0.5	978.0	1,074.3	110
	0.2	391.2	415.6	106
	0.1	195.6	206.1	105
	0.05	97.8	103.0	105

表6 健康者の濃度分布

検体群	参考基準範囲 [pg/mL]
女性	
卵胞期	15.6~186.4
排卵期	20.9~267.7
黄体期	14.6~512.6
閉経後	<2.0~47.3
妊娠前期	448~3,028
妊娠中期	707~26,743
妊娠後期	9,500~40,542
男性	8.5~48

[6] 相関性試験

東京慈恵会医科大学附属第三病院の協力のもと、本試薬 (y) と AIA-パック CL エストラジオール (x) および他社 ECLIA 法 (x) との相関性を確認した [図5]。その結果、AIA-パック CL エストラジオールとの相関性は $n=103$ 、回帰式 $y=0.968x+2.84$ 、相関係数 $r=0.986$ であり、他社 ECLIA 法については $n=103$ 、回帰式 $y=0.909x-15.9$ 、相関係数 $r=0.989$ であった。また、社内において本試薬 (y) と E テスト

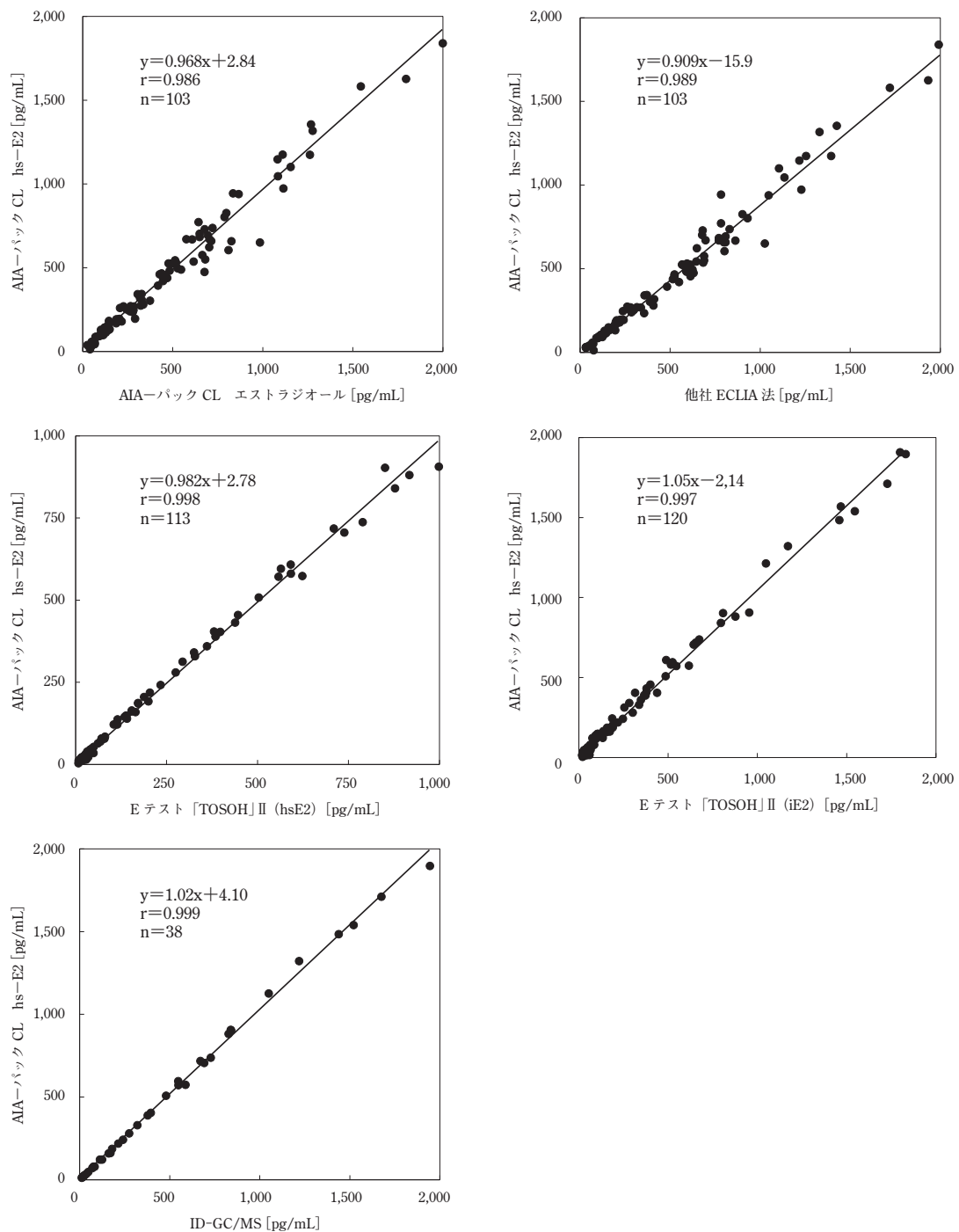


図5 既存エストラジオール測定法との相関性

「TOSOH」Ⅱ (hsE2) (x)、E テスト「TOSOH」Ⅱ (iE2) (x) および高感度・高特異的なエストラジオール測定法である ID-GC/MS 法 (x) との相関性を確認した。その結果、E テスト「TOSOH」Ⅱ (hsE2) との相関性は $n=113$ 、回帰式 $y=0.982x+2.78$ 、相関係数 $r=0.998$ 、E テスト「TOSOH」Ⅱ (iE2) との相関性は $n=120$ 、回帰式 $y=1.05x-2.14$ 、相関係数 $r=0.997$ 、ID-GC/MS 法については $n=38$ 、回帰式 $y=1.02x+4.10$ 、相関係数 $r=0.999$ であった。

[7] 認証標準物質

IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) が供給する認証標準物質 (CRM) である BCR-576、BCR-577、BCR-578 を測定した。その結果、いずれも表示値に対する回収率が $\pm 10\%$ 以内に収まっていた [表 7]。

[8] 交叉反応性試験

血清検体に血中に存在する種々のステロイドや婦人

表 7 認証標準物質

	表示値 [pg/mL]	測定濃度 [pg/mL]	回収率 [%]
BCR-576	31.1	30.8	99
BCR-577	188	185.3	99
BCR-578	365	357.8	98

科領域で用いられる薬剤由来の化合物を添加して交叉反応性を評価した。評価した全てのステロイド及び薬剤で交叉反応性が概ね 1% 以下を示し、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 [表 8]。また、従来試薬よりも改善を認めるものの、 17α -ethynylestradiol および Fulvestrant [文献 12] は投与状況によっては注意を要する。

[9] 機種間差

AIA-CL2400 (x) と、準大型機の AIA-CL1200 (y)、および小型機である AIA-CL300 (y) との機種間差を確認した [図 6]。その結果、AIA-CL2400 と AIA-

表 8 交叉反応性

交叉反応物質	交叉反応性 [mol%]			
	AIA-バック CL hs-E2	AIA-バック CL エストラジオール	E テスト「TOSOH」Ⅱ (hsE2)	E テスト「TOSOH」Ⅱ (iE2)
17α -estradiol	0.012	0.011	0.012	0.022
Estrone	0.020	0.37	0.32	1.1
Estriol	0.051	0.11	0.082	0.25
17β -estradiol-3-sulfate- 17β -D-glucuronide	< 0.001	N.D	N.D	N.D
17β -estradiol 17-propionate	0.17	0.18	0.10	0.12
17β -estradiol 17-valerate	0.079	0.079	0.044	0.057
17β -estradiol-17-glucuronide	0.008	0.007	0.004	0.004
17β -estradiol-3-glucuronide-17-sulfate	< 0.001	N.D	N.D	N.D
17β -estradiol-3-sulfate	0.015	0.013	0.03	0.04
Estriol 3-sulfate	< 0.001	N.D	N.D	N.D
d-Aldosterone	< 0.001	N.D	N.D	N.D
Androstendion	< 0.001	N.D	N.D	N.D
5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol	< 0.001	N.D	N.D	N.D
Cortisone	< 0.001	N.D	N.D	N.D
Danazol	< 0.001	N.D	N.D	N.D
DHEA	< 0.001	N.D	N.D	N.D
DHEAS	< 0.001	N.D	N.D	N.D
Equilin	< 0.001	0.011	0.01	0.03
Ethisterone	< 0.001	N.D	N.D	N.D
17α -ethynylestradiol	1.1	4.4	3.6	8.2
Hydrocortisone	< 0.001	N.D	N.D	N.D
17α -hydroxypregnenolone	< 0.001	N.D	N.D	N.D
17α -hydroxyprogesterone	< 0.001	N.D	N.D	N.D
Mestranol	0.15	0.14	0.17	0.70
Norethindrone acetate	< 0.001	N.D	N.D	N.D
Progesterone	< 0.001	N.D	N.D	N.D
Testosterone	< 0.001	N.D	N.D	N.D
Clomiphene citrate salt	< 0.001	N.D	N.D	N.D
Tamoxifen	< 0.001	N.D	N.D	N.D
Fulvestrant	0.27	0.63	1.5	0.66

* N.D.: 検出限界以下 (Not detectable)

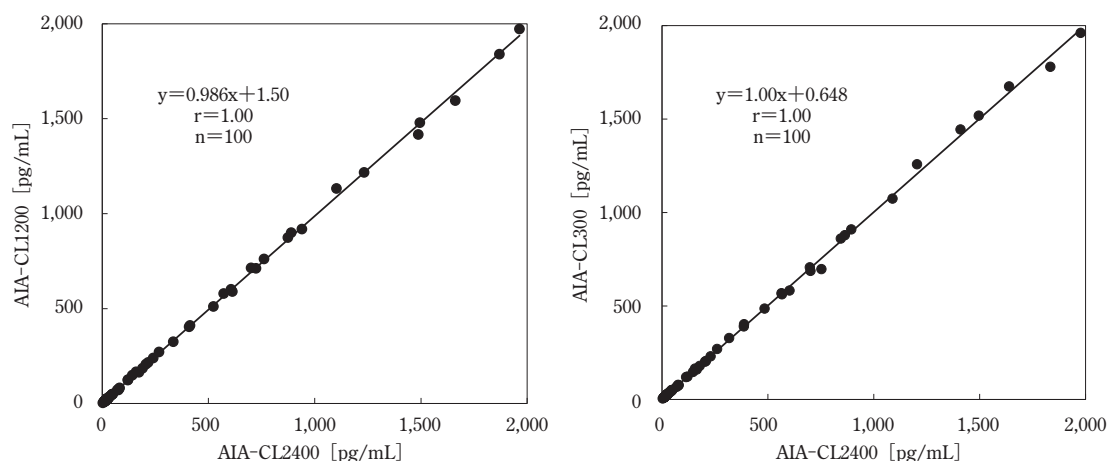


図6 機種間差

CL1200の機種間差は $n=100$ 、回帰式 $y=0.986x+1.50$ 、相関係数 $r=1.00$ であり、AIA-CL2400とAIA-CL300では $n=100$ 、回帰式 $y=1.00x+0.648$ 、相関係数 $r=1.00$ であった。

4. 総括

今回、我々は迅速かつ高感度な測定を可能とするためにサンドイッチ法を測定原理に用いたエストラジオール測定試薬を開発した。本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15分）かつ多検体の測定が可能である。試薬の基本性能として、ブランク上限は0.5 pg/mL、検出限界は0.9 pg/mL、定量限界は2.7 pg/mL (CV10%) 及び1.0 pg/mL (CV20%) と、AIA-パックCL エストラジオールと比較して約20倍、Eテスト「TOSOH」II (hsE2)と比較して約4倍、Eテスト「TOSOH」II (iE2)と比較して約15倍であり、本試薬が最も高感度であることが確認された。また、測定内、測定間再現性は5%以内と良好であったこと、検体中の共存物質の影響を受けにくいこと、専用希釈液（AIA-CL用 検体希釈試薬D）を用いた希釈直線性は10倍希釈まで良好であったこと、既存の体外診断用医薬品およびID-GC/MSとの相関性は良好であったこと、認証標準物質の表示値と同様の値が得られたこと、交叉反応性試験結果からエストラジオールに対する特異性が非常に高いことが確認された。さらに大型機であるAIA-CL2400と準大型機の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応えることができる仕様となっている。

以上より、本試薬は優れた感度を有しており、不妊治療のモニタリング等に加え、小児や更年期の性腺機能の把握や診断、がんなどの疾患の治療効果の早期判断などによって臨床診断への新たな有用性を提供できると期待される。

5. 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東京慈恵会医科大学附属第三病院中央検査部・阿部正樹技師長、俵木美幸検査技師、八木道隆検査技師に心より感謝を申し上げます。

6. 文献

- 1) Franck Mauvais-Jarvis et al, *Endocrine Reviews*, **34**(3), 309-338 (2013)
- 2) 森本恵子、化学と生物、**57** (2)、74-75 (2019)
- 3) Cunningham FG et al, *Williams Obstetrics 23rd Edition*, (2009)
- 4) Nader S et al, *Fertil. Steril.*, **45**, 75-78 (1986)
- 5) Ben-Rafael Z et al, *Fertil. Steril.*, **45**, 51-57 (1986)
- 6) Hemamalini Ketha et al, *Steroids*, **99**, 39-44 (2015)
- 7) 野村文夫、日本内科学会雑誌、**102** (12)、3096-3102 (2013)
- 8) 水本好美ほか、日本臨床検査自動化学会会誌、**39** (1)、115-120 (2014)
- 9) 東ソー株式会社、特許第6031944号、2016-11-24
- 10) 小崎慎矢ほか、東ソー研究・技術報告、**55**、37-43 (2011)
- 11) 松崎利也ほか、医学と薬学、**72** (5)、931-941 (2015)

- 12) 関田綱基、医療検査と自動化、**48** (Suppl1)、36-
37 (2023)