

AIAシステムを用いた抗甲状腺抗体精密測定法の開発

島 田 英 実
高 橋 佐 知 枝

Development of the Sensitive Assay of Anti-thyroid Autoantibodies on the AIA systems

Hidemi SHIMADA
Sachie TAKAHASHI

Thyroid peroxidase (TPO) and thyroglobulin (Tg) are both well known as the target antigens of autoantibodies found in the sera of patients suffering from autoimmune thyroid disease. Conventional measurement of such antibodies have been based on the semi-quantitative methods of low sensitivity. We report herein the development of highly sensitive assays of both anti-TPO and anti-Tg on the TOSOH AIA Series of fully automated immunoassay analyzer. Many parameters of these assays were investigated to attain high sensitivity and specificity. We have mainly focused on the antigen itself used on solid phase and also enzyme-anti-human IgG antibody conjugate, which is used to detect the bound human IgG type autoantibodies. Further investigation proved a favorable effect of some added component on the assays, leading to the enhancement of sensitivity. These assays have been evaluated as the AIA-pack reagent from both basic and clinical standpoints and their usefulness for medical examination has been well established.

1. はじめに

抗甲状腺抗体とは甲状腺組織に対する自己抗体のことであり、その主な自己抗原として甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) およびサイログロブリン (Tg) が知られている。抗甲状腺抗体の測定は半定量的な測定法が主流であったが、近年、定量精密測定的重要性が示唆されて来た。¹⁾²⁾ 現在ではこれらの抗体の測定をおこなうことはバセドウ病や橋本病といった甲状腺疾患のうち大きなウェートを占める自己免疫性甲状腺疾患の鑑別およびその病態把握に不可欠とされており、その重要性はますます高まっている。筆者らはこれらの自己抗体の測定系をAIAシステムにおける測定メニューに加えるべく、その測定系の開発をおこなってきた。

本稿では測定系の構築とその評価に分けてその主な検討結果を報告する。なお、抗TPO抗体測定系をTPOAb、抗Tg抗体測定系をTgAbと以下略称する。

2. 検討内容

検討内容は測定系の構築及び、構築された測定試薬の性能評価に大別される。

[1] 測定系の構築

<測定原理>

抗甲状腺抗体精密測定系は1) 抗原-抗原サンドイッチ法 (1ステップ法)、2) 抗原-IgG検出型サンドイッチ法 (2ステップ法)、3) 競合法などが挙げられるが、最も一般的でAIAシステムにおいて測定系の構築が容易な2) の抗原-IgG検出型サンドイッチ法

(2ステップ法)をターゲットとした。測定原理をFig. 1に示す。固相には抗原(TPO又はTg)が固定化されており、希釈検体(希釈倍率は51倍)を混合すると、抗体が存在する場合には固相抗原と反応する(第一反応)。洗浄(Bound/Free分離)後、抗ヒトIgG抗体のアルカリ性ホスファターゼ標識物(コンジュゲート)を混合すると、先の第一反応で固相に結合したIgG抗体と反応し、サンドイッチを形成する(第二反応)。B/F分離後、固相の酵素活性を測定することにより検体中の抗体量を定量する。

〈測定方法〉

測定装置として東ソー製全自動免疫測定装置、AIA-1200XLまたはAIA-600を使用した。

〈検討内容〉

(1) 固相基材の選択～パリレンビーズの採用

AIA試薬用固相用基材としてはフェライトコート玉(EVA(エチレン酢酸ビニル共重合体)の表面にフェライトを熱融着したもの)及びパリレン玉(フェライト練り込みEVA玉の表面をパリレン(ジパラキシリレン)蒸着コートしたもの)を現在使用している。後者は免疫反応に供した場合、非特異的吸着(NSB)が小さいという特長があり、このことは高感度を必要とする測定項目においては重要なポイントである。

TPOAbにおいて、固相の違いとS/N比の関係をフェ

ライトコート玉とパリレン玉で比較し、パリレン玉の感度面における有用性を検討した。方法としてはそれぞれにTPOを固定化し、抗TPO抗体陽性血清および抗TPO抗体陰性血清を測定した。

(2) TPOAb固定化抗原の選定

TPOAbで固相に固定化して使用するTPOは共同研究先の日水製薬(株)より遺伝子組換えヒトTPO(rhTPO)⁴⁾の提供を受けて基礎検討を開始した。組換えTPOのほかにThyroid microsomal antigen(TMA)および天然型TPO(nhTPO)のようなヒト甲状腺由来の精製抗原も理論的には使用可能である。そこでこれらの抗原の比較検討を行った。評価は以下の2つの方法で実施した。

1) rhTPOを固定化した抗TPO抗体測定系に上記3種類の抗原を添加し、固相抗原との競合阻害アッセイでその純度(抗原活性純度)の確認を行う方法。この方法では抗体陽性血清測定時に得られるレスポンスに対し、抗原添加により結合阻害が起こる割合から抗原純度を推定した。

2) 実際に固定化してその性能を評価する方法。(抗体との結合能の直接評価)

この方法ではそれぞれの抗原を固定化した固相を用いて陽性血清および陰性血清の測定値をおこない、S/N比をもとめた。

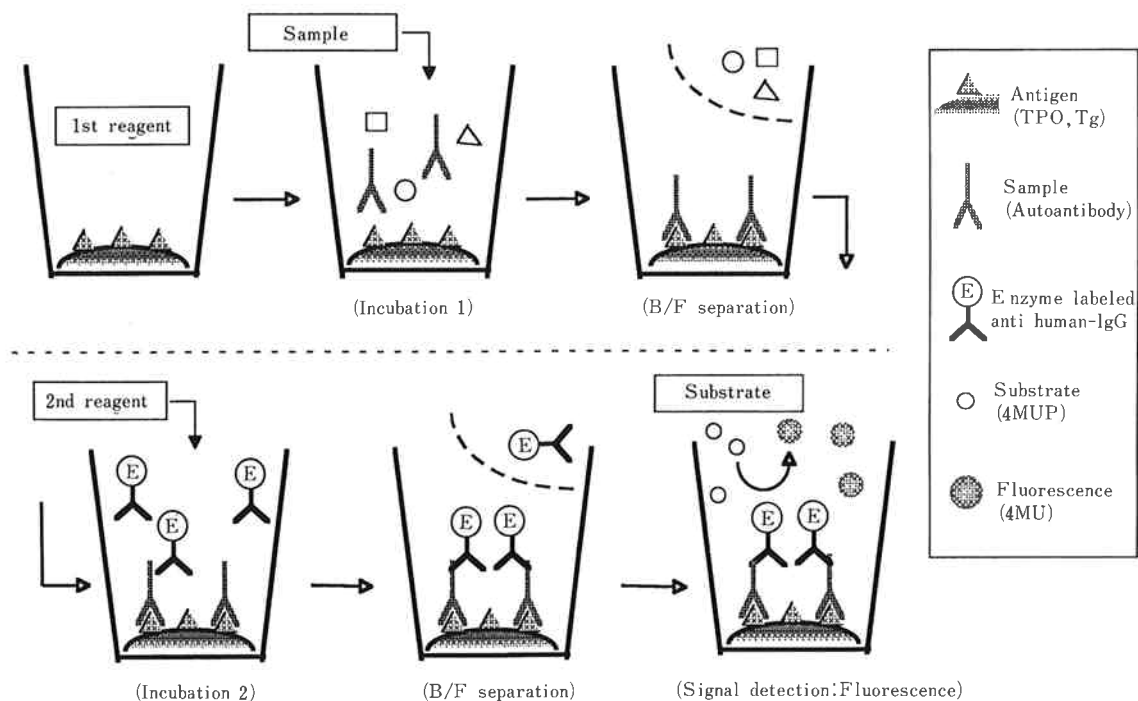


Fig. 1 Assay principle of TPOAb and TgAb

Table 1 Comparison of the performance of bead

	Serum dilution 1/21			Serum dilution 1/51			Serum dilution 1/101		
	Posi.	Nega.	S/N	Posi.	Nega.	S/N	Posi.	Nega.	S/N
Ferrite Coat	480.123	32.331	14.85	280.216	15.264	18.36	161.452	6.151	26.25
Parylene	420.451	4.264	98.60	245.134	2.353	104.18	136.321	1.131	120.53

なおTgAbについては精製抗原を用いており、種類の違う抗原の選定は必要としなかった。

(3) コンジュゲート用抗体 (抗ヒトIgGマウスモノクローナル抗体) の性能評価～IgGサブクラス反応性について

コンジュゲートに使用している抗ヒトIgG抗体は外部より購入しているが、そのIgGサブクラス反応性は不明であった。そこで反応性を確認するため評価系を確立し、以下のような評価を行った。すなわち固相に適量の精製IgG1を固定化し、これに対しコンジュゲートが反応するようなアッセイ系とした。ここへIgGアイソタイプすなわちIgGn (n=1~4) を各々添加してその阻害の割合を測定した。

(4) 高感度化のための工夫～アッセイ系への添加物質の検討

パリレン玉の採用により、コンジュゲートのNSBは低く抑えられたが、検体中の非特異的IgGの吸着に起因するNSBは十分に抑えることが出来なかった。そこで第一反応緩衝液に何らかのNSB防止物質の添加が必要と考えられ、検討を行った。検討方法としてTPOAbで、抗体陰性健常人血清を試料として用い、各種添加物の添加によるNSBの軽減の割合を評価した。添加物としてカゼイン (Hammarsten grade)、トリプチケース (カゼインのトリプシン分解物)、水溶性ゼラチン、BSAを対照である0.1M Tris-HCl pH8に添加して評価した。

その後の健常人の多数検体測定による検討で疑陽性例 (抗原添加で陰性化しないもの) を認めたのでTgAbにおいて代表的な3検体について牛血清の添加を検討した。

〔2〕 試薬評価

測定系確立後、両測定系のキット化を行い、それらを用いて、以下のような性能評価を行った。測定はAIA-1200XLで行った。

〈検討内容〉

(1) 基本性能評価

同時・日差再現性、最小検出感度)

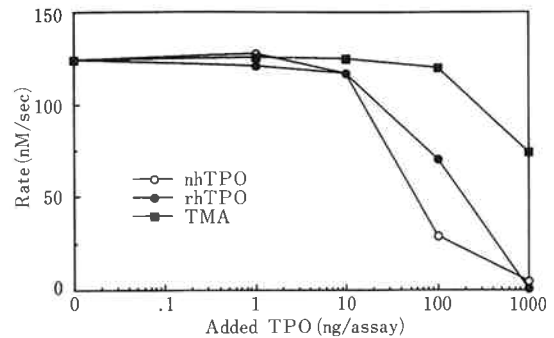


Fig. 2 The evaluation of Antigen for TPOAb (1)

同時再現性 (Intra-assay precision) および測定間再現性 (Inter-assay precision) を評価した。また3ロットの試薬を用いて2SD法で最小検出感度を算出した。

(2) 臨床的評価

従来法との相関性、感度の比較)

自己免疫性甲状腺疾患患者検体を用いて従来の半定量法であるParticle agglutination method (PA法) との相関性を調べた。またTPOAbについては別に従来法で感度以下と測定された橋本病検体109例についてRIA法と本法で測定した。

各疾患群での抗体測定値)

TPOAb、TgAb双方について各疾患群血清を測定し、抗体価を調べた。

3. 結果と考察

〔1〕 測定系の構築について

(1) 血清希釈倍率を変えて固相用の玉の違いによる性能の差を調べた結果をTable 1に示したが、いずれの希釈倍率においても両者で陽性血清から得られたレスポンス (S) は同等であるが、陰性血清 (N) はフェライト玉では著しく高く、その結果S/N比としてはパリレン玉が非常に良い結果であった。固相用の玉の解析については、東京研究所でその物性とイムノアッセイに供した時の性能の関係が検討され、パリレン玉の有用性がすでに報告されている。今回の検討において同様のことが示唆された。

(2) Fig. 2 に固相化したrhTPOと添加された各種抗原との競合阻害アッセイでその純度(抗原活性純度)の確認を行った結果を示した。

TMAは極めて純度が低く使用不可能と思われたが、nhTPOはrhTPOには劣るものの、純度の点では使用可能と思われた。そこで実際に固定化してその性能を確認した結果をTable 2 に示した。nhTPOは実際に固定化した場合、rhTPOに比べ著しく低いレスポンスしか得られず、1) 固定化効率が低い。2) 固定化された状態での抗原活性が落ちている(例えば固相への固定化により立体構造に変化があり、抗体認識に支障を来す)等の可能性が考えられた。またNSBも高く、その結果S/N比でも大きな差となり、固相抗原として不適当であると思われた。これよりrhTPOの固相抗原としての有用性が示された。

(3) 阻害試験で調べた各IgGサブクラスの反応性をFig. 3 に示した。コンジュゲート用抗ヒトIgG抗体はすべてのIgGサブクラスと反応し、その反応性はIgG3 < IgG4 < IgG2 < IgG1 となった。

実検体における抗TPO抗体のIgGサブクラスについて河野らは抗体陽性の健常人と患者とではその血清中で構成比が異なると報告している。⁴⁾

したがってアッセイ系としてIgG検出系を採用する上ではサブクラスによっては検出できないような場合があることは好ましくない。実際現在市販されている

Table 2 The evaluation of antigen for TPOAb (2)
Immobilized on parylenle beads at 24ng/bead

	Posi.	Nega.	S/N
rhTPO	188.542	0.485	388.75
nhTPO	31.168	4.111	7.58

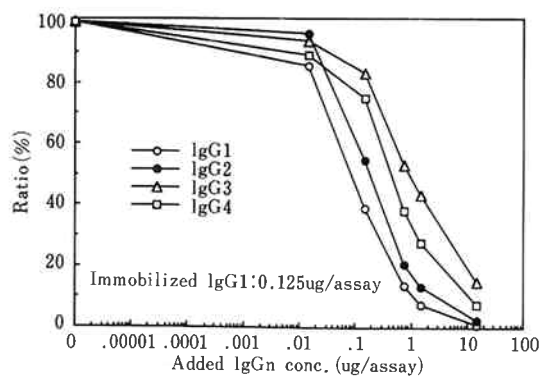


Fig. 3 IgG isotype reactivity of anti-human IgG antibody

IgG検出型他社キット間でも異なるさまざまな抗ヒトIgG抗体が使用されており、また同様の目的で抗ヒトIgG抗体の代わりにプロテインAが使用されているものもあることから、これらキット間での測定値の乖離が見られた場合、このような検討は有用であると考ええる。

(4) 各種添加物を検討した結果、カゼインの添加がNSBの軽減に極めて有効であることが判明した。他の主な添加物との比較を添加濃度とNSBの関係をFig. 4 に示した。細胞膜タンパク質に対するELISAにおいて、検体の希釈液、洗浄液にカゼインの添加が低NSB化に有効であるとの報告⁶⁾があり、おそらく疎水性の高い抗原とIgG分子の疎水の相互作用を反応系中でミセル構造をとったカゼインが防いでいるものと考えられる。カゼインの加水分解物であるトリプテケースでNSB軽減効果が小さいのは加水分解物にはもはやミセル形成能がないためその効果が極端に落ちたものと思われる。本検討結果から第一反応緩衝液へ0.5%のカゼインを添加したアッセイ系で以降の検討を行った。その後の健常人の多数検体測定による検討で検体によってはカゼインの添加で抑えられない疑陽性例が認められ、これらの例では牛血清の添加が有効であった。第一反応緩衝液への牛血清の添加効果を示した。

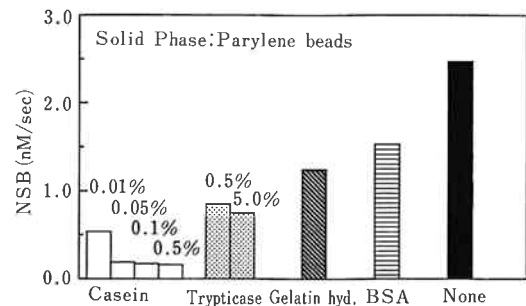


Fig. 4 The effect of the additives to eliminate NSB

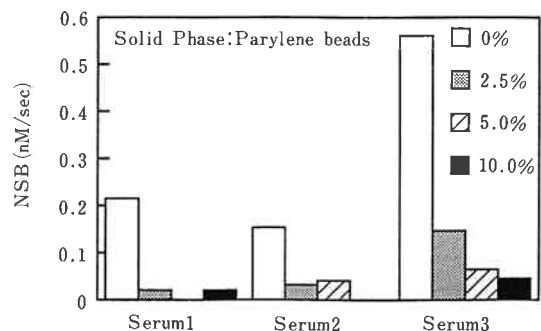


Fig. 5 The effect of addition of Bovine serum

今回検討した3検体ではいずれにおいても牛血清の添加でNSBが抑えられることがわかった。(Fig. 5) ヒト血清成分中にはリウマチ因子、抗動物イムノグロブリン抗体といった異好性抗体の存在やさまざまな固着因子の存在が知られ、動物血清の添加が有効であることが多い。今回の知見もこうしたものの一つと考えられるが、その原因物質については解析できなかった。

〔2〕 試薬性能の評価

同時・日差再現性)

日差および同時再現性の結果をTable 3 に示した。

同時再現性は十重測定結果で、また測定間再現性は10日間測定の結果で示している。

最小検出感度)

TPOAb、TgAbについてそれぞれ3ロットの試薬を評価したところ、2SD法でそれぞれ2.1~2.7IU/ml、3.3~5.1IU/mlだった。

従来法との相関性、感度の比較)

Fig. 6 に従来法 (PA法) との相関結果を示した。

TPOAb: PA法との相関性は良好であったが、低濃度域にPA法で感度以下であり、本法で陽性となる例が数例認められた。

相関結果からは感度の差の明確な結果は得られなかったため、PA法で陰性であった橋本病患者119例について本法とRIA法で測定した。その結果、119例中35例

Table 3 The results of Imprecision studies (Intra-Assay and Inter-Assay precision)

	n	TPOAb(IU/ml)			TgAb(IU/ml)		
		Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)
Intra-Assay precision							
Sample 1	10	97.3	3.47	3.6	148.6	6.82	4.6
2		535.5	28.16	5.3	608.3	24.8	4.1
3		856.9	48.58	5.6	1152	36.1	3.1
Inter-Assay precision							
Sample 1	10	93.4	2.36	2.5	148.3	6.09	4.1
3		803.4	30.28	3.8	1138	32.4	2.8

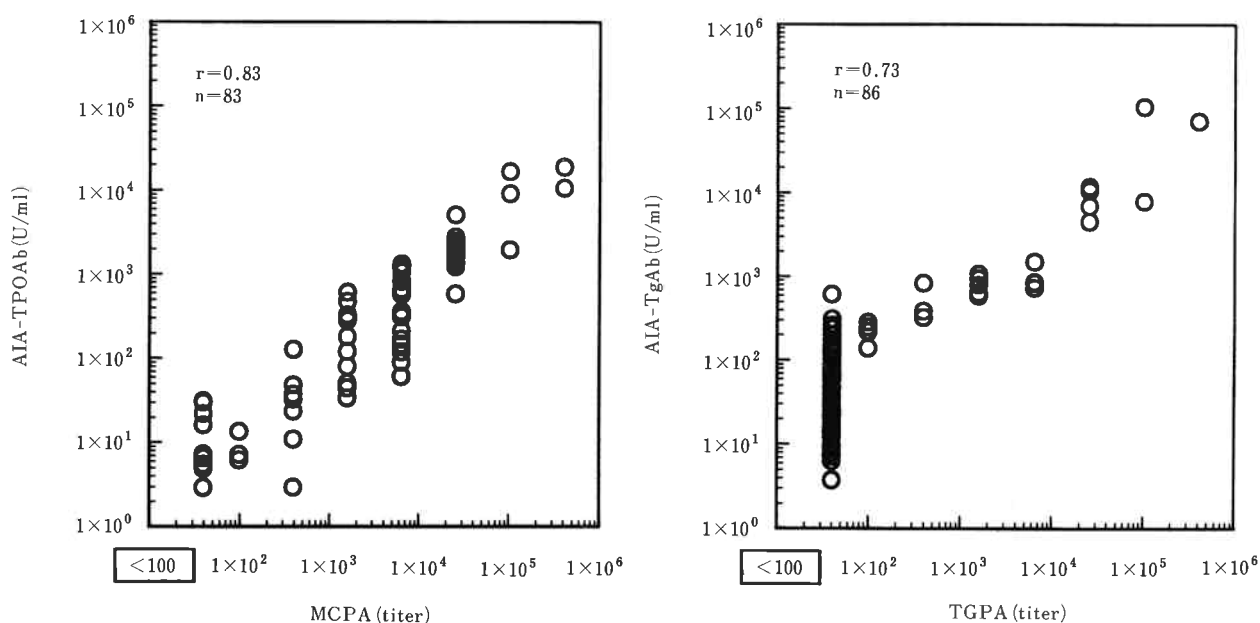


Fig. 6 Correlations between PA method and AIA

(29.4%) がRIA、本法とも陽性となった。RIA法については同様の報告⁶⁾ がなされており、これら精密測定法の感度の高さが示唆された。

TgAb: TPOAbでの結果に比べ相関性は悪い結果であった。この理由として従来法で感度以下で本法で陽性となる例が多いことが挙げられる。抗Tg抗体測定においては従来の半定量法における感度不足が指摘されており^{6) 7)}、本法の高感度が示唆された。

各疾患群での抗体測定値)

TPOAb、TgAbにおける各疾患と抗体価の関係はFig. 7、8に示した。バセドウ病(Graves')、橋本病(Hashimoto's)といった自己免疫性甲状腺疾患において有意に抗体価が上昇していた。

以上の評価結果より自己免疫性甲状腺疾患診断における本測定系の有用性が示された。AIAシステムではすでに甲状腺関連項目としてTSH、T₃、T₄、フリー

T₃、フリーT₄の5項目が同時測定可能であり、今回新たに抗体測定2項目が加わろうとしている。⁸⁾ 今後、これら甲状腺マーカーとの同時測定によりその臨床的有用性に関するさらなるデータの蓄積が可能となろう。

4. まとめ

抗甲状腺抗体測定系の構築に当たり、感度、特異性に留意しつつ検討を進めた。

その結果、TPOAb、TgAb両測定系の試薬化に成功し、その性能評価において良好な成績をおさめた。自己免疫性甲状腺疾患についてはその発症機序の研究、診断・治療方法のさらなる進歩が期待される。TPOAb、TgAb両試薬は近日上市が予定されており、今後汎用され、診断面において寄与することが期待される。

本研究開発成果のうち試薬の性能評価に関しては、

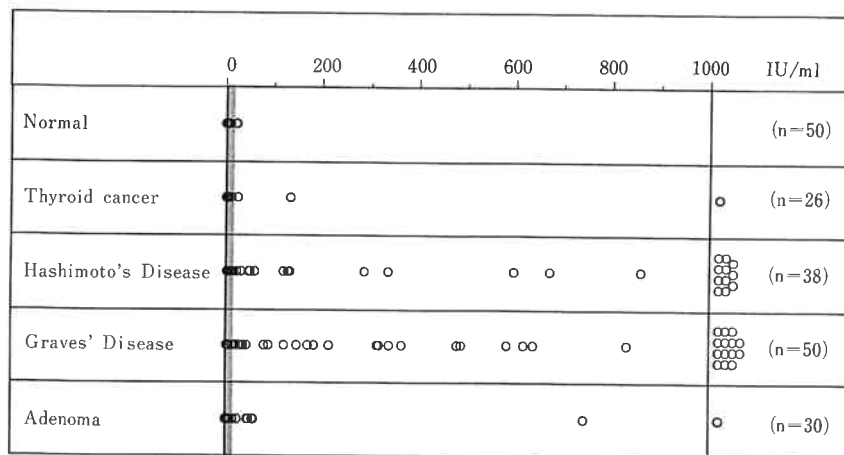


Fig. 7 TPOAb Concentrations in Normal Subjects and Patients

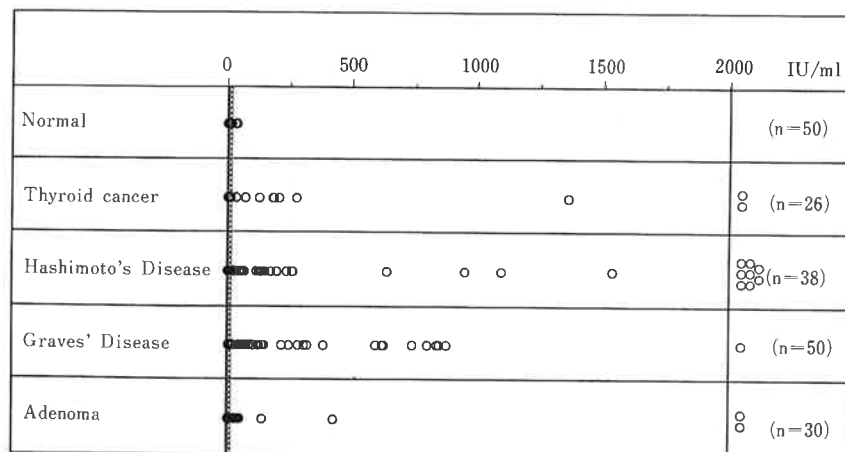


Fig. 8 TgAb Concentrations in Normal Subjects and Patients

免疫アッセイ研究会、日本臨床化学会東海北陸支部総会、第48回米国臨床化学会他でより詳細な発表を行った。

参 考 文 献

- 1) 笠木寛治、高坂唯子；ホルモンと臨床 43, 727, (1995)
- 2) 久保信彦、岩瀬 昇；機器・試薬 17, 1149, (1994)
- 3) Jun-ichiro Hata, Shinya Yamashita; Biochemical and Biophysical Research Communications, 164, 1268 (1989)
- 4) Yoichi Kohno, Masami Kijima; Endocrine Journal, 40, 317, (1993)
- 5) J. G. Kenna, G. N. Major; Journal of Immunological Methods, 85, 409, (1985)
- 6) 上條桂一；医学と薬学 34, 759, (1995)
- 7) 青野悠久子；臨床検査 37, 603, (1993)
- 8) 鎌田 智、塚本久雄、島田英実；日本臨床検査自動化学会誌 21, 251, (1996)



著 者

氏名 島田 英実
Hidemi SHIMADA
入社 昭和61年4月1日
所属 科学計測事業部
試薬開発部
試薬技術課



著 者

氏名 高橋 佐知枝
Sachie TAKAHASHI
入社 平成3年3月16日
所属 科学計測事業部
試薬開発部
試薬技術課