

特集●Vol.53 No.1 生体成分を測定する～基礎から応用まで～

臨床検査におけるバイオマーカーの免疫測定法：進歩と展望

小林典裕, 森田いずみ

はじめに

免疫測定法(イムノアッセイ immunoassay)は、1959年、BersonとYalowによりインスリンの測定法として発明された¹⁾。生体内ホルモンの超微量定量と動態解析を可能とし、医学の発展に大きく貢献した革命的な分析法である。抗体の作製さえ可能であれば、低分子化合物も高分子量のタンパク質も測定対象となる。操作が簡便で測定結果判定までの所要時間(turn around time; TAT)の短縮が可能であるため、臨床検査項目となる各種バイオマーカーの日常分析法に発展し、現在、世界中の医療機関でフル稼働している。

著者(の一人=小林)は大学での卒論研究から40年以上にわたり免疫測定法の研究に携わってきた。いま振り返ればそれは劇的に変貌している。開発当初は抗原抗体反応を放射性同位体標識により追跡していたが、今日では酵素や化学発光物質で標識する非放射性測定法が標準的である²⁾。分析種(すなわち「抗原」)に対する抗体も進化した。さまざまな抗体分子の混合物である抗血清[ポリクローナル抗体(PAb)]に代わって均質なモノクローナル抗体(MAb)が主流となり、測定系の再現性が担保されることとなった³⁾。

こうした革新にも支えられ、実試料測定の実験能力も飛躍的に向上した。医療機関の検査室における免疫測定法は、基礎研究室のそれとは異なり、専用

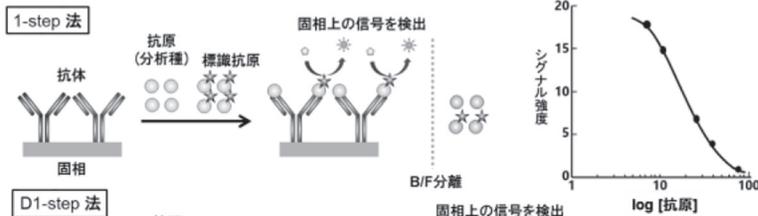
の機器により全自動で運用される⁴⁾。抗原抗体反応のインキュベーション時間も著しく短い。著者の学生時代、オーバーナイトは「ふつう」であったが、検査室では全工程が10～30分程度で終了する。場合によっては不可避、と考えられていた試料の前処理は含まれない。いわゆる direct assay が大原則であり、さまざまな夾雑物の共存下で抗原抗体反応が進行する。「鍵と鍵穴の特異性」がその身上とは言え、容易なことではない。臨床検査機器・試薬メーカーにおける不断の研究と徹底的な最適化による成果である。本稿では、臨床検査の現場におけるバイオマーカーの免疫測定法を基礎研究者の立場から俯瞰し、その進歩と今後の展望に言及したい。

1. 免疫測定法の原理

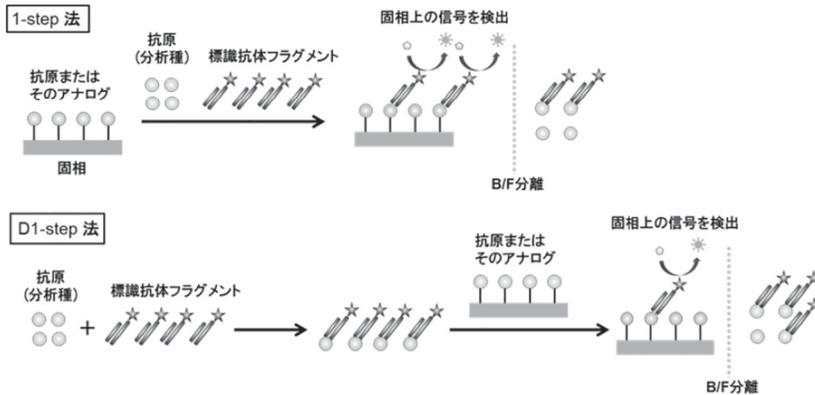
免疫測定法は、試料中の抗原と抗体を反応させると抗原量に応じたシグナルが直ちに得られる均一系と、生成した複合体を未反応の抗原や抗体から分離(B/F分離)する工程を含む非均一系に分類される²⁾。前者は薬物のPOCT(point of care testing)に適しているが、ホルモンなど生体成分の超微量定量には感度に優り夾雑物の干渉を受けにくい後者が常用されている。非均一系測定法は、さらに競合法と非競合法(サンドイッチ法)に分類される。競合法(図1A)は、ステロイド類や甲状腺ホルモンなど、低分子抗原(ハプテン)の測定に重用される。抗原を標識(抗体を固定)する方法(i)と抗体を標識(抗原を固定)する方法(ii)がある。いずれの場合も、抗原量が増加

A. 競合法

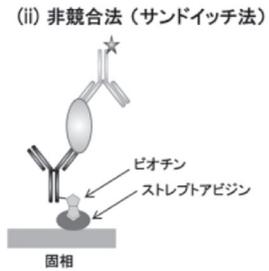
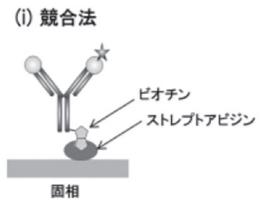
(i) 抗原を標識する方法



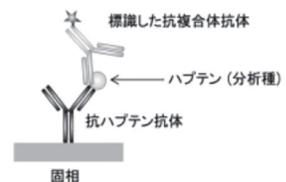
(ii) 抗体を標識する方法



C. ビオチン-アビジン反応を利用して抗体を固定する測定系



D. 免疫複合体を認識する抗体を用いるハプテン非競合法



B. 非競合法 (サンドイッチ法)

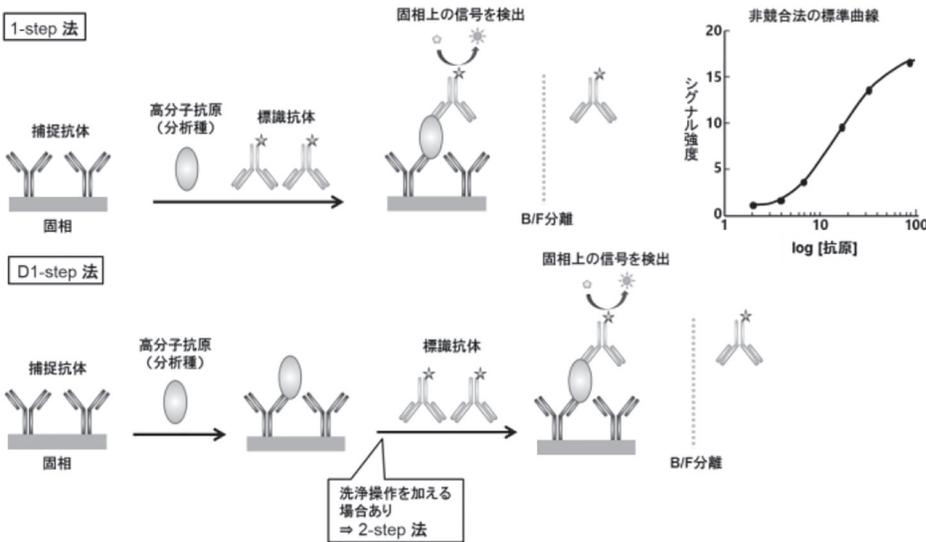


図1 免疫測定法の原理

(A) 競合法には、(i) 抗原を標識(抗体を固定)する方法と(ii) 抗体を標識(抗原を固定)する方法がある。(i)には、抗原(分析種)と標識抗原を同時に抗体と反応させる1-step法と、まず分析種のみを抗体と一定時間反応させ、次いで標識抗原を添加するdelay-1-step法(D1-step法; 従来「逐次飽和法」と呼ばれていた^{2,33)})がある。分析種と抗体の反応後に、試料由来の夾雑物(および過剰の分析種)を洗浄除去したのちに標識抗原を添加する方法を2-step法と呼んでいる。競合法というより置換法である。D1-step法と2-step法は、1-step法より高感度となることが多い。(ii)の原理は1個の抗体フラグメント(Fabなど)を用いる例で示した。2個のIgG型抗体も利用できるが、アビディティ効果に留意が必要である⁵²⁾。高感度化するためにD1-step法を採用することが多い。(B)サンドイッチ法も1-step法、D1-step法、2-step法に分類される。2-step法は、検体に由来する夾雑物を洗浄・除去できる点で有利である。(C)、(D)については本文を参照のこと。

するにつれて固相上の標識量が減少し、逆S字(右下がり)の標準曲線が得られる。サンドイッチ法(図1B)はタンパク質など高分子抗原に適用される。固相に固定した過剰量の抗体(捕捉抗体)で標的抗原を捕捉し、エピトープを異にする標識抗体を過剰に反応させて検出する。抗原量の増加とともに固相上の標識量が増加し、S字(右上がり)の標準曲線が得られる。競合法より高感度で、特異性に優れるが(2種の抗体による二重の認識が働くため)、ハプテンに適用することは難しい。分子サイズが小さく、2種の抗体が同一分子に結合することが不可能なためである。標識としては一般の検査室で扱える非放射性物質が利用される。高感度測定に適する酵素あるいは化学発光物質が多用され、それぞれ酵素免疫測定法(enzyme immunoassay; EIA)、化学発光免疫測定法(chemiluminescence immunoassay; CLIA)と呼ばれる。酵素を標識しているが、その活性測定に化学発光性基質を用いるものは化学発光酵素免疫測定法(chemiluminescence enzyme immunoassay; CL-EIA)という^{2,5)}。

検査室における免疫測定法は、専用の機器で自動的に運用されている⁴⁾。96ウェルプレートで行われるような多数の反応の同時処理ではなく、各ウェルで行われる1セットの反応[検体の投入から発光(発色)計測まで]を、ウェルの数だけ次々に処理していく形式が標準である。B/F分離を迅速化するために、抗体あるいは抗原が粒径の小さい磁性粒子(鉄酸化物をプラスチックで覆ったもの)に固定されている。抗原抗体反応時には均一な懸濁液となるが、反応後、磁石を利用して瞬時に液相と分離できる。抗体やタンパク質抗原はそれ自体の疎水性相互作用を利用して粒子に受動吸着させることができるが、それらをビオチンで標識し、ストレプトアビジンをコーティングした粒子に反応させることもある(図1C)。ハプテンを固定する場合は、ハプテンをタンパク質との結合体として吸着させる。

2. 免疫測定法の干渉因子

検査室において免疫測定法が適用される生体試料(以下、検体)の多くは血液(血清または血漿)である。血液中には、分析種と特異抗体との反応に干渉し、

偽高値(「真の値」に対して過大な値)や偽低値(「真の値」に対して過小な値)を与えうるさまざまな因子が存在する。「免疫測定法はdirect assayで当たり前」と期待されるが、決して容易なことではない。

2.1 干渉因子

多くの総説があるが⁶⁻¹⁵⁾、本稿では免疫化学的な観点から興味深い干渉因子に絞り、その機構について要約する。

a. 抗原類似物質

分析種に類似する構造を持つ化合物(生合成前駆体、代謝物など)が抗体と交差反応する結果、偽高値を与える。抗体の特異性が不十分なために起きる干渉である。ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)と黄体形成ホルモン(LH)は、構造が両者に共通の α サブユニットと、各々に特異的なアミノ酸配列を含む、 β サブユニットから成る。このため、PAb(両者に共通するエピトープに対する抗体も含まれる)の時代にはhCG、LHの測定において互いの交差反応が問題となったが、 β サブユニット上の特異的なエピトープに反応するMAbを導入することにより抜本的に改善された^{7,16)}。MAbの特異性に関する長所が示された好例である。

一方、ハプテンに相当する低分子バイオマーカーはそれ自体が単一のエピトープであり、検体に多様な類似化合物が含まれる場合、MAbを用いても交差反応が問題となる^{7,14,17)}。グルクロン酸抱合体など、極性が大きい代謝物ならば有機溶媒抽出により除去できる。「アクセス コルチゾール」は、難しい尿中レベルの定量も可能とする貴重なコルチゾール(CS)測定キットであるが、尿検体の酢酸エチル抽出を推奨している。余計な工程が加わるが、全自動化が可能で分析種が定量的に回収され、測定値の信頼性が飛躍的に向上するならば前処理の導入も一考に値しよう。構造が類似する合成医薬品を服用している被検者の検体には要注意である。抗炎症薬ブレドニゾロンはCSに酷似しているため(図2A)、測定キットに用いられている抗CS抗体の交差反応は100%を超えることがある(C=C結合の有無は識別が難しい)^{7,13)}。エストラジオール(E₂)測定における乳がん治療薬フルベストラント(Ful)の干渉も指摘されている(図2B)^{14,18)}。E₂をその7位(Fulでフッ素

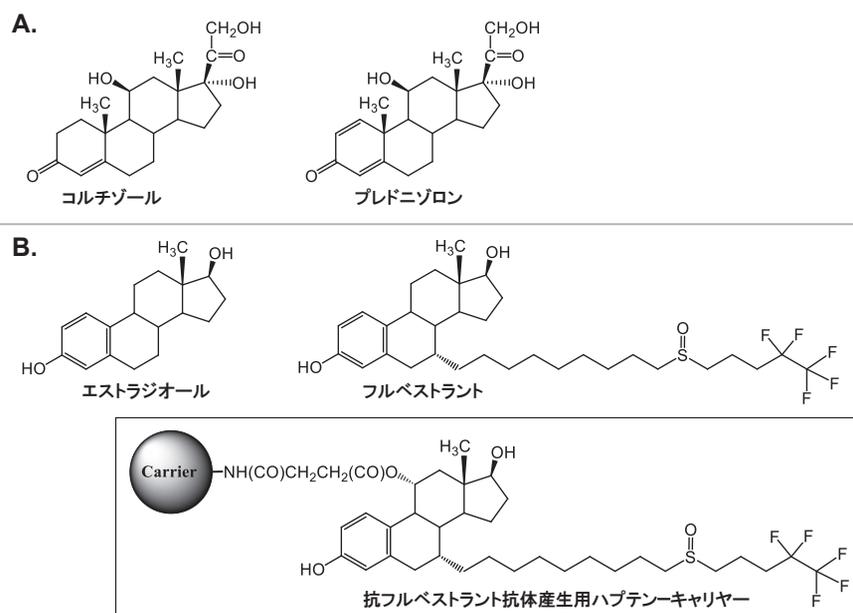


図2 交差反応する構造類似薬物の例

(A) コルチゾール(副腎皮質ホルモン)の測定においては合成糖質コルチコイドである抗炎症薬プレドニゾロンの交差反応が、(B)エストラジオール(卵胞ホルモン)の測定においては乳がん治療薬フルベストラントの交差反応が問題となる。枠内のハプテン-キャリアー結合体で動物を免疫すると、キャリアー結合部位(11位)の逆サイドに位置する7位側鎖[-(CH₂)₉SO(CH₂)₃CF₂CF₃]をよく認識し、フルベストラントに特異的な抗体が得られるものと期待される³²⁾。

化された側鎖が導入されている位置)を介してキャリアーと連結した免疫原(内因性E₂代謝物の識別に優れる抗体の産生には有効である)で得られた抗E₂抗体は、大きく交差反応するだろう。この場合、「妨害化合物に特異的な抗体」を添加してブロックすることも解決策になりうる。Fulに特異的で、かつE₂とは全く反応しない抗体は、図に示すハプテン-キャリアーによる免疫で得られるものと期待される¹⁹⁾。

b. 抗原をマスクする物質

脂溶性の低分子化合物は、特異的な結合タンパク質と複合体を形成して体内を循環することが多い。E₂、チロキシン(T₄)、25-ヒドロキシビタミンD(25D; 25D₃および25D₂)がその例で、それぞれ性ステロイド結合グロブリン(結合定数K_a=~2×10⁸ M⁻¹)²⁰⁾、チロキシン結合グロブリン(K_a=1×10¹⁰ M⁻¹)²¹⁾、ビタミンD結合タンパク質(K_a=~1.5×10⁸ M⁻¹)²²⁾と強く結合している。ちなみに免疫測定法で利用される抗体のK_aは10⁸~10¹¹ M⁻¹程度である。これらの血中総濃度を求めたい場合、そのまま測定に付すと著しい偽低値となる。タンパク結合率の高い薬物の測定も同様で、検体中のアルブミ

ン濃度に留意が必要である。かつては事前に検体を抽出あるいは加熱処理していたが、近年のdirect assayでは「displacer」(結合タンパク質と強く結合するが抗体には交差反応しない化合物)の添加により競合的に分析種を遊離させている。古くから、E₂の測定ではダナゾールやジヒドロテストステロンなどが²³⁾、総T₄の測定ではサリチル酸ナトリウム²⁴⁾や8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸²⁵⁾などが有効とされてきたが、各検査薬メーカーはより優れた化合物を独自に開発していると思われる。血漿中25Dの測定において検体のペプシン処理が良好な結果を与えたとする報告があり、興味深い²⁶⁾。ところで、患者の血中に分析種(チログロブリン、インスリン、トリヨードチロニン、T₄、テストステロンなど)に反応する自己抗体が存在した例が報告されている^{10,13,14)}。上記の結合タンパク質と同様の干渉を引き起こすことがありうる。

脂溶性分析種の測定では、血中の脂質も大敵である。疎水性相互作用により分析種を取り込み、抗体の接近を妨げる。EIAでは、標識抗原が水溶性であるため、偽低値をもたらさう。著者も、25D₃の

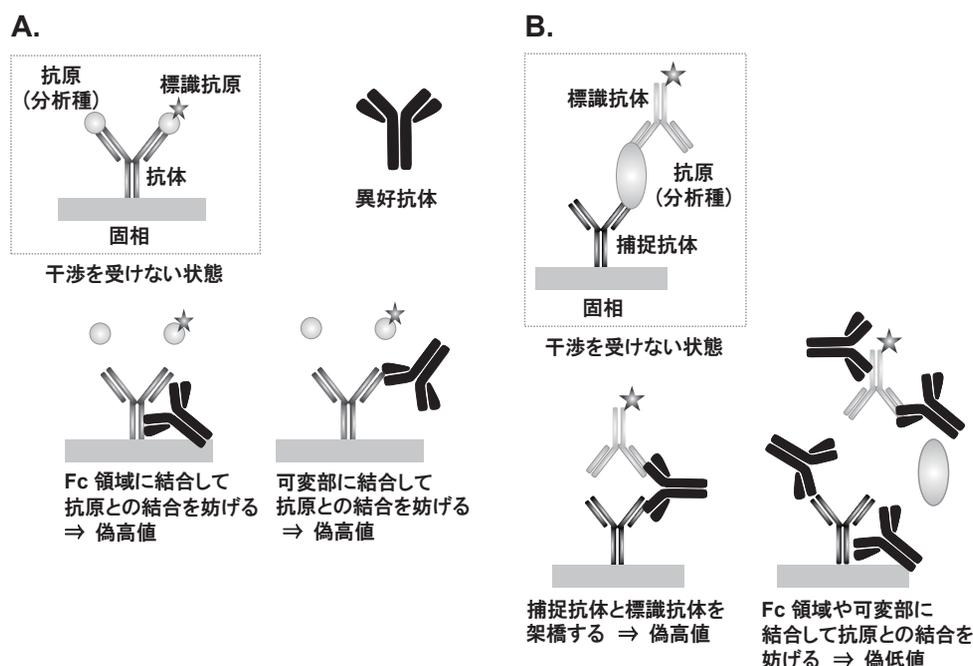


図3 異好抗体の干渉作用

(A)競合法と(B)非競合法(サンドイッチ法)の場合。

EIA 開発時、この妨害に苦しめられた²⁷⁾。リパーゼ処理は著効を示さなかった。測定件数の多い遊離 T_4 の定量では、 T_4 と結合タンパク質との複合体を保持した状態で抗 T_4 抗体と反応させる。検体中の遊離脂肪酸が T_4 とアルブミンの結合を阻害した結果、偽高値を与えたとの報告がある⁸⁾。

c. 抗体をマスクする物質

免疫測定法に用いられる分析種特異抗体の多くは、マウスまたはウサギに由来する³⁾。ヒト血液中には、こうした「異種動物の抗体」と反応して正確な測定を妨げる被検者由来の抗体(自己抗体)が存在しう。これらは異好抗体(heterophile antibody)と総称される⁶⁻¹⁵⁾。マウス抗体に対する抗体はHAMA(human anti-mouse antibody)の略称で知られるが、ウサギ、ヒツジ、ヤギ由来抗体に対する異好抗体も知られている^{10,11)}。わが国の検体におけるHAMAの出現頻度(マウス血清と反応するタイプ)は10.6%(170例中18例)、そのうち $F(ab')_2$ 分画と反応するものは3.5%(170例中6例)であったという²⁸⁾。異好抗体がヒト体内に産生される原因については、動物飼育、抗体医薬の使用、ワクチン接種、輸血、病原体の感染などが挙げられている¹⁰⁾。その反応点は主

に動物抗体の定常部(Fc領域)であるが、可変部に反応することもある。立体障害などにより標識抗原の結合を妨げるため、競合法では偽高値を招くが、偽低値となる場合もあるという(図3A)¹⁴⁾。サンドイッチ法では捕捉抗体あるいは標識抗体の抗原との結合を阻害することで偽低値を招くが(図3B)、捕捉抗体と標識抗体の架橋により偽高値を与えることもある^{13,14)}。異好抗体による干渉の頻度は0.05~6%との報告があるが¹⁵⁾、測定系にマウスあるいはウサギ免疫グロブリンを吸収剤として添加することで改善されうる^{8,10,14,15)}。これらを成分とする「ブロッキング剤」が各種市販されている。測定に用いる抗原特異抗体をFabあるいは $F(ab')_2$ フラグメントとすることも改善策であろう。ただし、可変部に結合する異好抗体には無効である。

リウマチ因子(rheumatoid factor; RF)は、ヒトIgGのFc領域に対する自己抗体で⁶⁻¹⁵⁾、IgMクラスのもの代表的である。IgM RFは主に関節リウマチ患者にみられるが、健常者でも1~4%、65歳以上では75%にみられるとされる²⁹⁾。主に均一系測定法で問題となる干渉因子であるが、マウス抗体にも反応し、HAMAと同様の干渉をひき起こしうる。

d. 標識の活性を低下させる物質

抗原や抗体の標識に用いられる酵素[ペルオキシダーゼ, アルカリホスファターゼ(ALP)]や化学発光物質(ルテニウム錯体)と結合し, その活性を変化させる自己抗体が報告されている¹⁴⁾. 一般に, 競合法では偽高値に, サンドイッチ法では偽低値につながる.

e. ビオチン-アビジン反応を妨害する物質

最近の話題である. 抗体の固定化にビオチン-アビジン反応を利用する測定系 [実際にはストレプトアビジン(SA)が多用される] (図1C)を用いる場合, 過量のビオチンや, SAに対する自己抗体が含まれている検体に注意が必要である^{14,15,30)}. 一般に, 競合法では偽高値に, サンドイッチ法では偽低値になる. 特にサプリメントなどでビオチンを多量に摂取した患者で問題となる. 抗SA抗体の出現頻度は0.6%と見積もられている¹⁵⁾. 2019年9月, 厚生労働省は「測定系にビオチンを用いる体外診断用医薬品の添付文書の自主点検等について」の通知(薬生安発0912第4号)を発出した.

2.2 干渉の検出法

測定値の異常が疑われた場合, 干渉因子を特定し, 対策を講じなければならない. 臨機応変な対応も求められるが, 下記の手段は多くの場合に有効である^{11,13-15,31)}. 次節で紹介する測定試薬キットも, こうした検討を重ねたうえで上市に至ったものであろう.

a. 試料段階希釈試験

検体を段階希釈して測定する. 干渉を受けていなければ標準曲線から直読した「生の測定値」は希釈倍率の逆数に対して直線性を示し, 希釈倍率で補正された「原検体についての定量値」は一定である. 希釈倍率を高めるにつれて定量値が低下する(真の値に近づく)場合は類似抗原による交差反応が疑われる. 希釈倍率を高めるにつれて定量値が増大する(真の値に近づく)ならば, 抗原あるいは抗体をマスクする物質による干渉が疑われる. 簡便に干渉の有無を判別できるが, 抗体に対して分析種と同じ挙動を示す干渉因子, 例えば交差反応100%の妨害物質を検出することは難しい. 干渉因子を含むことが既知の検体を試験したところ, その~40%が直線性を示したとの報告もあり¹⁵⁾, 判定には慎重を期す必要がある.

b. 前処理の効果の比較

異なる前処理(除タンパク, 溶媒抽出, クロマトグラフィーなど)の後に測定を行い, 値を比較する. 残存する夾雑物の質と量は自ずと異なるが, 変動の小さい定量値を与える分析法は特異性に優れ, 値の真度も高いと判断される. 異好抗体, RF, 標識やSAに対する抗体(いずれも免疫グロブリン)による干渉を受けているならば, 検体をポリエチレングリコールやプロテインG(またはA)固定化ビーズで処理すれば測定値が変動する(真の値に近づく)と予想される. ビオチンによる干渉ならば, SA固定化ビーズによる処理が有効であろう.

c. 標準測定法との比較

既に十分な実績のある免疫測定法あるいは測定原理の異なる分析法による測定値と比較する. 分析種が低分子化合物ならば, 安定同位体標識体を内標準物質とする液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC-MS/MS)が強力な手段となる. LCで夾雑物と分離したのち特異的なフラグメントイオン生成反応を追跡するため, 測定値の信頼性は高い.

3. 臨床検査における免疫測定法

医療機関において免疫測定法が適用される分析項目は多岐にわたる. 内分泌学的検査分野の代表的な項目と測定試薬キットを販売している会社を表1にまとめた. 上段はタンパク質・ペプチド(分子量>3,000), 下段は低分子化合物(分子量<1,000)である. それぞれの代表例としてインスリンとE₂を取り上げ, 市販測定試薬キットの詳細を調べた(表2). この表から検査の現場における免疫測定法を俯瞰することができる. すべて全自動装置での運用を前提とした製品である. まず, インスリン, E₂の両キットに共通する事項を列挙する.

- ①すべて非均一系である.
- ②すべてdirect assayである.
- ③すべて血清と血漿に適用できる.
- ④すべて化学発光検出を利用している. その大半がCL-EIAであるが, 1社がルテニウム錯体を標識する電気化学発光免疫測定法(electrochemiluminescence immunoassay; ECLIA)⁵⁾を採用している.
- ⑤ほとんどすべてが磁性粒子を利用している. 4社

表1 代表的な内分泌学的検査項目と測定試薬キットを販売する会社

会社名	LSIメデイエンス	アポットジャパン	栄研化学	ダイアグノステイックス	オーソ・クリニカル・ダイアグノステイックス	ダイアグノステイックス	シスメックス	島津ダイアグノステイックス	東ソー	富士フイルム和光純薬	富士レビオ	ベックマン・コールター	ミナリスメデイカル	ロシユ・ダイアグノステイックス
GH	○		○		○			○	○			○		○
プロラクチン	○	○	○	○	○			○	○		○	○	○	○
ACTH	○		○		○			○	○	○				○
LH	○	○	○	○	○			○	○		○	○	○	○
FSH	○	○	○	○	○			○	○		○	○	○	○
TSH	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○
チログロブリン	○	○	○		○			○	○	○	○	○		○
PTH-I	○	○	○	○	○			○	○	○		○	○	○
Whole-PTH			○					○	○		○			○
hCG	○	○	○		○			○	○				○	○
β-hCG			○	○			○	○	○		○	○		○
抗ミューラー管ホルモン								○			○	○		○
インスリン	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○
C-ペプチド	○	○	○	○	○			○	○	○	○		○	○
ヒト心房性Na利尿ペプチド			○				○	○	○				○	
ヒト脳性Na利尿ペプチド	○	○	○		○			○	○		○		○	
ヒト脳性Na利尿ペプチド前駆体N端フラグメント	○	○		○	○	○		○		○			○	○
エリスロポエチン					○							○	○	
オステオカルシン			○					○	○					○
T ₃	○	○	○	○	○			○	○		○	○	○	○
FT ₃	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○
T ₄	○	○	○	○	○			○	○		○	○	○	○
FT ₄	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○
コルチゾール	○	○	○	○	○			○	○	○		○	○	○
DHEA-S	○		○		○			○	○			○	○	
アルドステロン										○	○			
エストラジオール	○	○	○	○	○			○	○		○	○	○	○
プロゲステロン	○	○	○	○	○			○	○		○	○	○	○
テストステロン	○	○	○	○	○			○	○		○	○	○	○

JACLaS EXPO 2023 臨床検査・試薬・システム展示会の冊子(16. 体外診断用医薬品 生化学検査)を参考に作成した。略号は以下のとおり：GH, 成長ホルモン；ACTH, 副腎皮質刺激ホルモン；LH, 黄体形成ホルモン；FSH, 卵胞刺激ホルモン；TSH, 甲状腺刺激ホルモン；PTH, 副甲状腺ホルモン；hCG, ヒト絨毛性ゴナドトロピン；T₃, トリヨードチロニン；FT₃, 遊離T₃；T₄, チロキシン；FT₄, 遊離T₄；DHEA-S, デヒドロエピアンドロステロンサルフェート。

表2 インスリンおよびエストラジオールの測定試薬キット

A. インスリン測定試薬キット

項目	キット名 (会社名)	インスリン・アボット (アボットジャパン)	ビトロス® インスリン (オーソ・クリニカル・ダイアグ ノスティックス)	ケミルミ インスリン (シーメンスヘル スケア・ダイア グノスティックス)	HISCL™ イン スリン 試薬 (シスメックス)	アキュラシード インスリン (富士フイルム 和光純薬)	AIA-バック CL® インスリン (東ソー)	ルミバルス® インシュリン-N (富士レビオ)	アクセス インスリン (ベックマン・ コールター)	エクルーシス® 試薬インスリン (ロシュ・ダイア グノスティックス)
対応機器 (代表例)	Alinity i	—	ADVIA Centaur	HISCL-2000i	Accuraseed®	AIA®-CL2400	ルミバルス G1200	Access イムノ アッセイ アナライザー	コバス 6000	
測定原理 ^{a)}	CLIA (1-step サンドイッチ法)	CL-EIA (1-step サンドイッチ法)	CLIA (rD1-step サンドイッチ法)	CL-EIA (2-step サンドイッチ法)	CL-EIA (2-step サンドイッチ法)	CL-EIA (2-step サンドイッチ法)	CL-EIA (1-step サンドイッチ法)	CL-EIA (1-step サンドイッチ法)	ECLIA (1-step サンドイッチ法)	
抗インスリン 抗体	捕捉, 標識 ともマウス MAb	捕捉: ビオチ ン化マウス MAb, 標識: マウス MAb	捕捉, 標識 ともマウス MAb	捕捉: ビオチ ン化マウス MAb, 標識: マウス MAb	捕捉, 標識 ともモルモッ ト PAb	捕捉, 標識 ともマウス MAb	捕捉, 標識 ともマウス MAb	捕捉, 標識 ともマウス MAb	捕捉: ビオチ ン化マウス MAb 標識: マウス MAb	
標識物質 ^{b)}	アクリジニウム	HRP	アクリジニウ ムエステル	ALP	POD	ALP	ALP	ALP	Ru(bpy) ₃	
基質 (酵素標識の 場合)	—	3-アミノフタル ヒドラジン ナトリウム	—	CDP-Star	ルミノール	DIFURAT	AMPPD	ルミジェン PPD	—	
固相 ^{c)}	磁性粒子	SA 固定化 ウェル	鉄微粒子	SA 結合磁性 粒子	粒子	磁性微粒子	フェライト 粒子	磁性粒子	SA コーティング 磁性マイクロ パーティクル	
適合する検体	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	
検体の投入体積 (μL)	—	20	25	10	20	10	10	20	20	
所要時間 (min) ^{d)}	—	24	7.5 (+ x)	10.5 (+ x)	6 (+ x)	—	25 (+ x)	35 (+ x)	18	
測定範囲 (μIU/mL) [pmol/L]	1.6~300.0 [11.5~ 2,152.5]	1.00~300 [6.00~1,800]	0.5~300	0.1~500	1~500	0.2~1,000	0.6~400	0.03~300	0.2~1000	
検出限界 (μIU/mL) [pmol/L]	0.4 [2.9]	—	—	—	—	—	0.25	—	—	
特異性[プロイ ンスリン(PI), C-ペプチド (CP) との交差 反応性 (%)]	PI ≤ 0.1 CP ≤ 0.001	—	1,000 ng/mL 添加時のイン スリン添加回収 率として算出 している	—	—	PI ≤ 0.01 CP ≤ 0.01 (mol%)	—	—	—	
添付文書の改定 日	2022年6月 (第5版)	2018年6月 (第2版)	2021年7月 (第16版)	2023年3月 (第7版)	2023年7月 (第6版)	2022年9月 (第4版)	2023年1月 (第6版)	2013年12月 (第4版)	2021年3月 (第10版)	

B. エストラジオール (E₂) 測定試薬キット

項目	キット名 (会社名)	バスファースト Estradiol (LSIメディエンス)	アーキテクト® エストラジオー ル II (アボットジャパン)	ビトロス® エ ストラジオー ル (オーソ・クリニ カル・ダイアグ ノスティックス)	シーメンス・イ ムライズエ ストラジオー ル II (シーメンスヘル スケア・ダイア グノスティックス)	AIA-バック CL® hs-E2 (東ソー)	ルミバルス® E ₂ -III (富士レビオ)	アクセス E2II (ベックマン・ コールター)	エクルーシス® 試薬 E2IV (ロシュ・ダイア グノスティックス)
対応機器 (代表例)	バスファースト	ARCHITECT i1000SR	ビトロス® ECiQ, 3600	イムライズ 2000	AIA®-CL2400	ルミバルス G1200	Access Immunoassay Systems	コバス 8000	
測定原理 ^{a)}	CL-EIA (D1-step 競合法 i)	CLIA (D1-step 競合法 i)	CL-EIA (D1-step 競合法 i)	CL-EIA (1-step 競合法 i)	CL-EIA (2-step サンドイッチ法)	CL-EIA (1-step 競合法 i)	CL-EIA (D1-step 競合法 ii)	ECLIA (D1-step 競合法 i)	
抗 E ₂ 抗体	ビオチン化 ウサギ PAb	ウサギ MAb	ビオチン化ヒツ ジ PAb および ビオチン化ウサ ギ PAb	ウサギ PAb	ウサギ MAb	ヒツジ MAb	ヒツジ MAb	ビオチン化 ウサギ MAb (2種を同時使用)	
標識物質 ^{b)} (被標識物質)	ALP (E ₂)	アクリジニウム (E ₂)	HRP (E ₂)	ALP (E ₂)	ALP (マウス抗 E ₂ 免 疫複合体 MAb)	ALP (E ₂)	ALP (抗 E ₂ 抗体)	Ru(bpy) ₃ (E ₂)	
基質 (酵素標識の 場合)	CDP-Star	—	3-アミノフタル ヒドラジンナ トリウム	PPD	DIFURAT	AMPPD	ルミジェン PPD	—	

表2 インスリンおよびエストラジオールの測定試薬キット

B. エストラジオール(E₂)測定試薬キット のつづき

項目	キット名 (会社名)	パスファースト Estradiol (LSIメディエン ス)	アーキテクト®・ エストラジオー ルII (アボットジャパン)	ビトロス®エスト トラジオール (オーソ・クリニ カル・ダイアグ ノスティックス)	シーメンス・イ ムライズエスト トラジオールII (シーメンスヘル スケア・ダイア グノスティックス)	AIA-バックCL® hs-E2 (東ソー)	ルミパルス® E ₂ -III (富士レビオ)	アクセス E2II (ベックマン・ コールター)	エクルーシス® 試薬 E2IV (ロシュ・ダイアグ ノスティックス)
固相 ^{c)}	SA 感作磁性ラ テックス	抗E ₂ 抗体固相化 磁性粒子	SA 固定化ウエル	抗E2抗体固相化 ビーズ	抗E2抗体結合 磁性微粒子	抗E ₂ 抗体結合 フェライト粒子	E ₂ 類似体結合 磁性粒子	SAコーティング マイクロ パーティクル	
適合する検体	血漿, 血清, 全血	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	血清, 血漿	
検体の投入体積 (μL)	25	—	—	25	10	50	25	15	
所要時間 (min) ^{d)}	16 (+x)	—	32 (+x)	65	12 (+x)	25 (+x)	25 (+x)	18	
測定範囲 (pg/mL)	20~2,000	25~1,000	6.36~3,813.6	20~2,000	2.0~2,000	19~2,000	15~5,200	5~3,000	
検出限界 (pg/mL)	—	10	—	15	—	10	15.0	5	
特異性 [エストロン(E ₁), エストリオール (E ₃)との交差反応 性(%)]	E ₁ 1.90 E ₃ 0.516	E ₁ 0.7 E ₃ 検出されず	—	E ₁ 0.69 E ₃ 0.81	E ₁ 0.020 E ₃ 0.051 (mol%)	E ₁ 0.35 E ₃ 0.37	E ₁ 0.40 E ₃ 0.050	E ₁ 0.761 E ₃ 0.325	
添付文書の改定日	2022年11月 (第8版)	2019年12月 (第7版)	2020年12月 (第6版)	2019年9月 (第5版)	2023年4月 (第1版)	2023年1月 (第6版)	2022年8月 (第3版)	2019年11月 (第6版)	

各社から発行されている添付文書の記載に基づいて作成した。複数のキットを販売している会社もあるが、添付文書の改定日が最新の製品、または独自の特徴が見られる製品を選んだ。a) CLIA, CL-EIA, ECLIAについては本文を、1-step法, D1-step法, 2-step法については図1を参照のこと。rD1(reversed D1)-step サンドイッチ法とは、まず分析種を過剰量の標識抗体と液相中で反応させ、次いで固定化した抗体を添加して免疫複合体を捕捉する方法である。b) HRP, 西洋ワサビペルオキシダーゼ; ALP, アルカリホスファターゼ; POD, ペルオキシダーゼ; Ru(bpy)₃, トリス(2,2'-ピピリジル)ルテニウム(II)。c) SA, ストレプトアビジン。d) 添付文書に抗原抗体反応の所要時間のみ記載されている場合、B/F分離などの時間が加算されることを考慮し、「記載の反応時間の合計(+x)」とした。

が抗体の磁性粒子への結合にビオチン-アビジン反応を利用しており、ビオチンによる干渉に配慮した記載がある。

抗原抗体反応は、50~200 μL程度の反応液中、37°C(1社のみ42°C)で行われる。測定の所要時間は1反応あたり10~30分程度である。強調すべきは、血清・血漿のdirect assayを可能としていることである。前節で記した干渉を克服してのことであり(E₂では結合タンパク質の影響もありうる)、反応に用いている緩衝液の組成に興味を持たれる。CLIA, CL-EIAが採用されているのは、高い感度が得られるうえ、TATも短縮できる(CL-EIAでは短時間の酵素反応で済む)からであろう。測定原理は、当然ながらインスリンではサンドイッチ法(表2A)、E₂では競合法(表2B)であるが、E₂測定キットの1例(AIA-バックCL hs-E2)はこれまでハプテンでは困難とされてきた非競合法(図1D)である。その効果か、同キットの測定範囲の下限は表2Bのキットの

なかで最も低い。

抗体の由来も興味深い。インスリン測定では1例を除き、捕捉・標識のいずれの抗体もマウスMABである。周知のようにハイブリドーマ法で作製されるMABは、従来、主にマウス由来であった³⁾。しかし、E₂測定ではマウス由来の抗E₂抗体は全く用いられず、ウサギ由来、またはヒツジ由来のMABが採用されている。いずれもその作製法は拡散しておらず、特定の企業が受託生産している。マウスはハプテンに対する免疫応答がウサギに劣る傾向が認められる。おそらくウサギやヒツジはより親和力の大きい抗E₂抗体を産生し、その導入が高感度測定を達成するうえでのキーポイントだったのであろう。HAMAに対する感受性の点でも有利である。なお、ウサギMABはCS測定キットにも、ヒツジMABは遊離T₄測定キットにも使用されている。25D測定キットもヒツジMAB, ウサギMABを採用している。E₂の測定について測定範囲下限と検体の投入

体積を考慮すると、ほとんどのキットについて0.5 pgのE₂の添加で有意な競合が起こることになる³²⁾。平衡法²⁾による免疫測定法ならば、抗体に10¹¹ M⁻¹以上のK_aが求められるところである。各キットで用いられている抗E₂抗体のK_aに興味を持たれるが、短時間の反応でも優れた感度が得られているのは、delay-1-step法(逐次飽和法)(図1A)^{2,33)}の採用によるところも大きいだろう。

4. 医療現場における免疫測定法の今後

医療機関の検査室では日々膨大な数の検体を扱う。現場における免疫測定法は、スルーポットの一層の向上を目指して進化するだろうが、測定値の信頼性が前提となる。今世紀に入ってLC-MS/MSの性能が格段に向上し、本法による血液中低分子ホルモンの定量が実用段階に入った³⁴⁾。それに伴い、免疫測定法(特にdirect assay)に対する優位性を主張する論文が相次いで発表された^{35,36)}。しかし、両測定法は相補的に活用されるべきである。1次スクリーニングやPOCTにおける免疫測定法の有用性は今後とも揺るがない。LC-MS/MSは、疑義の生じた検体についての確定分析法として、その真価を発揮するだろう。ただし、批判を前向きに受け止め、質量分析に基づく定量法(MS法)に遜色のない真度・精度を持つ免疫測定法を目指したい。E₂測定キット(表2B)のうち、3つの製品(A社、B社、T社)についてはMS法との相関($r > 0.95 \sim 0.999$)が明示されていた。両方法の測定値は、低値となる症例の検体で乖離する傾向があることから、免疫測定法には一層の測定感度の向上が望まれる。そのためには分析種に高い親和力を持つ抗体の使用が必須である³²⁾。ウサギやヒツジのMAbの性能に期待がかかる。ウサギ抗体³⁷⁻³⁹⁾は、マウス抗体と比べて抗原認識におけるL鎖の関与が大きく、抗原との相互作用に重要な役割を演じる相補性決定部、V_L-CDR3が長いという。わが国は出遅れた感が否めないが、自力産生する基盤が欲しい。

MS法と良好な相関を示したT社のE₂測定キットは、前述のとおり非競合型測定に基づいている(図1D)。E₂を固定化抗E₂抗体で捕捉したのち、生成したE₂と抗E₂抗体の複合体を、酵素で標識した

抗複合体抗体により検出するもので、いわば「セミサンドイッチ」アッセイである。1990年代に数例の成功が報告されたが^{32,40)}、抗複合体抗体(抗メタタイプ抗体⁴¹⁾ともいう)の作製が難しいため普及するに至っていない。しかし、サンドイッチ法の長所、すなわち高い感度、特異性、そして精度が期待できるため、確立できれば価値は大きい。最近、同じ原理のキット、ルミパルス 25-OH ビタミンDとアキュラシード アルドステロン・Sが開発された。前者では、抗複合体抗体をADLibシステム(トリ免疫細胞を用いたMAb作製システム)⁴²⁾により取得している。後者の測定値はLC-MS/MS法と良好な相関($r > 0.99$)を示し⁴³⁾、血清・血漿のみならず尿検体(塩酸による前処理が必要)にも適用が可能という。2019年にフィンランドの研究グループが組換え抗体フラグメント(scFv)のライブラリーからE₂と抗E₂抗体の複合体に特異的なscFvを単離し、高感度なE₂の非競合型測定法(検出限界3.0 pg/mL)を構築している⁴⁴⁾。抗複合体抗体の調製に突破口が開けるならば、低分子バイオマーカーの免疫測定法は大きく進歩するだろう。

著者らは、長年、低分子バイオマーカーに対するマウス抗体の遺伝子操作に取り組んできた⁴⁵⁻⁵¹⁾。抗体可変部に点変異を導入して、CSおよびE₂に特異的なscFvの親和力を、それぞれ61倍($K_a = 2.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ まで)⁴⁹⁾、372倍($K_a = 3.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ まで)⁵⁰⁾増強させることに成功した。抗CS抗体scFvについては、厄介なプレドニゾロンとの交差反応(前述)を18%から3.3%まで低下させた⁴⁷⁾。scFvを発光酵素NanoLucルシフェラーゼと一体化させることで、ALPを標識するCL-EIA(CDP-starを基質とする)より高感度な総T₄測定系を構築することができた⁵¹⁾。こうした抗体工学的なアプローチも免疫測定法の発展を加速するだろう。短時間でのdelay-1-stepや2-stepの競合法(図1A)で高感度な測定を達成するには、結合速度定数k_aが大きく、解離速度定数k_dが小さすぎない抗体が適するものと考えられる。今後はウサギ抗体またはヒツジ抗体の「育種」研究に取り組みたい。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

■文献

- 1) Berson SA, Yalow RS: Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody, *J Clin Invest*, **38**: 1996-2016, 1959.
- 2) 小林典裕: 1 測定原理と分類, 「免疫測定法 基礎から先端まで」, p. 1-21, 講談社, 東京, 2014.
- 3) 小林典裕: 3.1 抗体調製総論, 「免疫測定法 基礎から先端まで」, p. 47-61, 講談社, 東京, 2014.
- 4) 伊藤道雄, 笠原靖, 芦原義弘, 伊藤俊幸: 8.2 自動化, 「免疫測定法 基礎から先端まで」, p. 234-249, 講談社, 東京, 2014.
- 5) 荒川秀俊, 佐野佳弘: 4.2 免疫測定法における発光検出, 「免疫測定法 基礎から先端まで」, p. 101-108, 講談社, 東京, 2014.
- 6) 丹羽俊文: 8.4 臨床検査における非特異反応, 「免疫測定法 基礎から先端まで」, p. 256-259, 講談社, 東京, 2014.
- 7) 岸野好純, 上裕俊法: 免疫測定法による血中微量成分の検査: 感染症, 腫瘍マーカー, ホルモンの検査について, *近畿大医誌*, **34**: 75-82, 2009.
- 8) 石橋みどり: 非特異反応とは, *検査と技術*, **38**: 778-782, 2010.
- 9) 青木和雄: 非特異反応回避のための工夫, *検査と技術*, **38**: 791-794, 2010.
- 10) 阿部正樹: 免疫化学検査の異常データの解釈と対応, 第16回科学技術委員会技術セミナー「免疫化学検査の異常データの解釈と対応の仕方」要旨集, 日本臨床検査自動化学会 科学技術委員会, 横浜, 2015.
- 11) 齊藤 翠: 日常業務で遭遇しやすい非特異反応とその確認方法, *生物試料分析*, **40**: 156-161, 2017.
- 12) Selby C: Interference in immunoassay, *Ann Clin Biochem*, **36**: 704-721, 1999.
- 13) Ward G, Simpson A, Boscato L, Hickman PE: The investigation of interference in immunoassay, *Clin Biochem*, **50**: 1306-1311, 2017.
- 14) Ghazal K, Brabant S, Prie D, Piketty ML: Hormone immunoassay interference: A 2021 update, *Ann Lab Med*, **42**: 3-23, 2022.
- 15) Wauthier L, Plebani M, Favresse J: Interference in immunoassays: review and practical algorithm, *Clin Chem Lab Med*, **60**: 808-820, 2022.
- 16) Griffin J, Odell WD: Ultrasensitive immunoradiometric assay for chorionic gonadotropin which does not cross-react with luteinizing hormone nor free β chain of hCG and which detects hCG in blood of non-pregnant humans, *J Immunol Methods*, **103**: 275-283, 1987.
- 17) Krasowski MD, Drees D, Morris CS, Maakestad J, Blau JL, Ekins S: Cross-reactivity of steroid hormone immunoassays: clinical significance and two-dimensional molecular similarity prediction, *BMC Clin Pathol*, **14**: 33, 2014.
- 18) Owen LJ, Monaghan PJ, Armstrong A, Keevil BG, Higham C, Salih Z, et al.: Oestradiol measurement during fulvestrant treatment for breast cancer, *Br J Cancer*, **120**: 404-406, 2019.
- 19) 小林典裕, 後藤順一, 島田和武, 松木容彦, 加藤芳徳: ハプテンに対する高親和力特異モノクローナル抗体の創製とトレースキャラクターゼーションへの応用, *臨床化学*, **34**: 125-145, 2005.
- 20) Mickelson KE, Pétra PH: Purification and characterization of the sex steroid-binding protein of rabbit serum. Comparison with the human protein, *J Biol Chem*, **253**: 5293-5298, 1978.
- 21) Refetoff S: Thyroid hormone serum transport proteins, NCBI Bookshelf, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285566> [2023.12.5]
- 22) Bouillon R, Schuit F, Antonio L, Rastinejad F: Vitamin D binding protein: A historic overview, *Front Endocrinol*, **10**: 910, 2020.
- 23) Micallef JV, Hayes MM, Latif A, Ahsan R, Sufi SB: Serum binding of steroid tracers and its possible effects on direct steroid immunoassay, *Ann Clin Biochem*, **32**: 566-574, 1995.
- 24) Larsen PR, Dockalova J, Sipula D, Wu FM: Immunoassay of thyroxine in unextracted human serum, *J Clin Endocrinol Metab*, **37**: 177-182, 1973.
- 25) Mitsuma T, Colucci J, Shenkman L, Hollander CS: Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum, *Biochem Biophys Res Commun*, **46**: 2107-2113, 1972.
- 26) Muller Kobold AC, Kema IP, Dijck-Brouwer J, Koerts K, Weening M, Storteboom T, et al.: Pepsin pretreatment corrects underestimation of 25-hydroxyvitamin D measurement by an automated immunoassay in subjects with high vitamin D binding protein levels, *Clin Chem Lab Med*, **60**: e18-e20, 2022.
- 27) Kobayashi N, Ueda K, Tsutsumi M, Tabata Y, Shimada K: Enzyme immunoassay for plasma 25-hydroxyvitamin D3 employing immunoaffinity chromatography as a pretreatment method, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **44**: 93-100, 1993.
- 28) 新井祐司, 臼井尚美, 菅野光一, 及川佳恵, 熊切春男, 望月照次: 免疫学的測定法の干渉作用の検討—ヒト抗マウス抗体 (HAMA) の抗原認識部位の解析—, *医学検査*, **49**: 768-772, 2000.
- 29) 異好抗体・リウマチ因子に特化したブロッキング試薬「TRU Block™ ULTRA」
<https://ivdgenryo.veritastk.co.jp/2022/06/24/tru-block-ultra/> [2023.12.5]
- 30) Kabili P, Weiskirchen R, van Helden J: The biotin interference within interference suppressed immunoassays, *J Clin Lab Anal*, **35**: e23940, 2021.
- 31) 小林典裕: 5 免疫測定法の分析能評価, 「免疫測定法 基礎から先端まで」, p. 124-136, 講談社, 東京, 2014.
- 32) 小林典裕, 加藤芳徳, 大山浩之, 後藤順一: 抗体工学を基盤とする超高感度ハプテンイムノメトリックアッセイへのアプローチ, *YAKUGAKU ZASSHI*, **127**: 55-69, 2007.
- 33) Zettner A, Duly PE: Principles of competitive binding assays (saturation analyses). II. Sequential saturation, *Clin Chem*, **20**: 5-14, 1974.
- 34) Stanczyk FZ, Clarke NJ: Advances and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **121**: 491-495, 2010.
- 35) Soldin SJ, Soldin OP: Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry, *Clin Chem*, **55**: 1061-1066, 2009.
- 36) Handelsman DJ, Wartofsky L: Requirement for mass spectrometry sex steroid assays in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, *J Clin Endocrinol Metab*, **98**: 3971-3973, 2013.

- 37) Zhang Z, Liu H, Guan Q, Wang L, Yuan H: Advances in the isolation of specific monoclonal rabbit antibodies, *Front Immunol*, **8**: 494, 2017.
- 38) Chen Z, Wang G: Progress and perspectives of rabbit monoclonal antibodies, *Blood and Genomics*, **7**: 13-21, 2023.
- 39) Li Y, Kong Y, Yu X, Yu W, Wen K, Shen J, et al.: Characteristics of rabbit hapten-specific and germline-based BCR repertoires following repeated immunization, *One Health Adv*, **1**: 17, 2023.
- 40) Kobayashi N, Goto J: Noncompetitive immunoassays for small molecules with high sensitivity and specificity. *Adv Clin Chem*, **36**: 139-170, 2001.
- 41) Voss EW Jr, Miklasz SD, Petrossian A, Dombrink-Kurzman MA: Polyclonal antibodies specific for liganded active site (metatype) of a high affinity anti-hapten monoclonal antibody, *Mol Immunol*, **25**: 751-759, 1988.
- 42) 太田邦史, 瀬尾秀宗: ADLibシステムを用いたモノクローナル抗体の迅速作製, *YAKUGAKU ZASSHI*, **127**: 81-89, 2007.
- 43) Ozeki Y, Tanimura Y, Nagai S, Nomura T, Kinoshita M, Shibuta K, et al.: Development of a new chemiluminescent enzyme immunoassay using a two-step sandwich method for measuring aldosterone concentrations, *Diagnostics*, **11**: 433, 2021.
- 44) Leivo J, Kivimäki L, Juntunen E, Pettersson K, Lamminmäki U: Development of anti-immunocomplex specific antibodies and non-competitive time-resolved fluorescence immunoassay for the detection of estradiol, *Anal Bioanal Chem*, **411**: 5633-5639, 2019.
- 45) Kobayashi N, Oyama H: Antibody engineering toward high-sensitivity high-throughput immunosensing of small molecules, *Analyst*, **136**: 642-651, 2011.
- 46) Kobayashi N, Oyama H, Kato Y, Goto J, Söderlind E, Borrebaeck CA: Two-step in vitro antibody affinity maturation enables estradiol-17 β assays with more than 10-fold higher sensitivity, *Anal Chem*, **82**: 1027-1038, 2010.
- 47) Oyama H, Morita I, Kiguchi Y, Morishita T, Fukushima S, Nishimori Y, et al.: A single-step "breeding" generated adiaagnostic anti-cortisol antibody fragment with over 30-fold enhanced affinity, *Biol Pharm Bull*, **40**: 2191-2198, 2017.
- 48) Kiguchi Y, Oyama H, Morita I, Morikawa M, Nakano A, Fujihara W. et al.: Clonal array profiling of scFv-displaying phages for high-throughput discovery of affinity-matured antibody mutants, *Sci Rep*, **10**: 14103, 2020.
- 49) Kiguchi Y, Morita I, Turuno A, Kobayashi N: Retrieving dissociation-resistant antibody mutants: an efficient strategy for developing immunoassays with improved sensitivities, *Biol Pharm Bull*, **45**: 1432-1437, 2022.
- 50) Morita I, Kiguchi Y, Nakamura S, Yoshida A, Kubo H, Ishida M, et al.: More than 370-fold increase in antibody affinity to estradiol-17 β by exploring substitutions in the V_H-CDR3, *Biol Pharm Bull*, **45**: 851-855, 2022.
- 51) Oyama H, Kiguchi Y, Morita I, Miyashita T, Ichimura A, Miyaoka H, et al.: NanoLuc luciferase as a suitable fusion partner of recombinant antibody fragments for developing sensitive luminescent immunoassays, *Anal Chim Acta*, **1161**: 238180, 2021.
- 52) 小林典裕: 2.2 抗原抗体反応の物理化学, 「免疫測定法基礎から先端まで」, p. 34-41, 講談社, 東京, 2014.

Immunoassays for biomarkers in clinical testing: advances and perspectives

Norihiro Kobayashi, Izumi Morita
Kobe Pharmaceutical University