

Readout

HORIBA Technical Reports

特集 量から質へ臨床検査

March 1996 ■ No.12

全自動化学発光酵素免疫測定装置 ルミノマスター™LEIA-2000 —試薬と検出系—

Charastaristics of Fully Automated Chemiluminescent
Enzyme Immunoassay Equipment Luminomaster
—Reagents and Detection Systems—

池上卓志・佐藤義弘

Takuji IKEGAMI, Yoshihiro SATOU

(Pages43-49)

株式会社 堀場製作所

全自動化学発光酵素免疫測定装置 ルミノマスター™ LEIA-2000

—試薬と検出系—

Characteristics of Fully Automated Chemiluminescent Enzyme Immunoassay Equipment Luminomaster —Reagents and Detection Systems—

池上 卓志*・佐藤 義弘*

Takuji IKEGAMI*, Yoshihiro SATOU*

【要旨】

免疫化学検査の自動化は急速に進展し、各種の自動分析装置が開発、発売されている。三共(株)は、non-RIA化に対応ができる高感度免疫測定装置として、全自動化学発光酵素免疫測定装置 ルミノマスター™を(株)堀場制作所と共同開発した。本システムは、全自動測定装置と専用試薬から構成されている。本システムの検出系は、化学発光反応を用いることにより、高感度検出による測定時間の短縮と広いダイナミックレンジによる低濃度域から高濃度域までの広範囲測定が可能となった。本稿では、ルミノマスターの試薬系および検出系について報告する。

Abstract

The automation of immunoassay is proceeding at a rapid pace, and various automatic analysis equipment is being developed and put on the market. Sankyo Co., Ltd. has developed jointly with HORIBA the fully automated chemiluminescent enzyme immunoassay equipment Luminomaster™ as highly sensitive immunity measuring equipment compatible with the trend towards non-RIA. This system comprises fully automated measuring equipment and special reagents. The chemiluminescent reaction is utilized in the detection system. As a result, highly sensitive detection allows the measurement time to be reduced and a wide dynamic range allows a wide range from low- to high-concentration areas to be measured.

1. はじめに

1956年Berson & Yalow¹⁾によって、ラジオアイソトープ(RI)を標識物質とするラジオイムノアッセイ(RIA)が開発され、生体成分の高感度微量分析が可能となり、ホルモン、腫瘍マーカーなどの測定に広く用いられてきた。RIAは、RIの管理および廃棄、バイオハザードなどの問題があり、酵素を標識物質とする酵素イムノアッセイ(EIA)²⁾が開発され、RIAに代わる測定法として注目され日常検査に用いられるようになってきた。EIAは、RIAに比べ、感度及び操作手順の煩雑さなどが問題として残されており、日常検査への応用には自動化が望まれていた。

* 三共株式会社

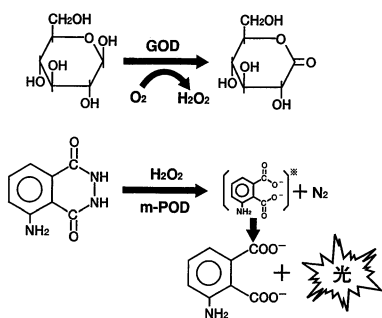


図1 GOD活性の化学発光検出原理
Principle of chemiluminescent
detection of GOD activity

我々は、EIAの感度不足を補うため、酵素活性の検出に化学発光法を組み合わせた化学発光酵素免疫測定法を選択し、また、測定操作を自動化することで煩雑さを解消することを目的に、全自動化学発光測定装置『ルミノマスター』を開発した。

化学発光酵素免疫測定法は、昭和大学薬学部辻名誉教授、前田教授らとの共同研究により、標識酵素としてグルコースオキシダーゼ (GOD) を、発光物質にルミノールを用いた、化学発光酵素活性測定法の開発を行った⁹⁾。

GOD活性の化学発光検出原理は図1に示すごとく、GODの基質であるグルコースとの酵素反応により生成した過酸化水素 (H_2O_2) を、発光試薬であるルミノール/マイクロパーオキシダーゼ (m-POD) で発光させ、この発光量から酵素活性を測定する。一方、本化学発光酵素活性測定法を全自動測定装置に適応させるための条件として、第一に化学発光検出の高感度を保ちつつ、多数検体の処理を可能とするため、発光検出時間を短縮し、一測定当たり10秒程度で測定できる発光試薬の開発が求められた。第二に、化学発光の測定精度を向上させるため、新たな化学発光検出系の開発が求められた。第三に、化学発光のダイナミックレンジを十分に生かした測定系の開発が求められた。

このような条件を満たす化学発光酵素活性測定を確立し、『ルミノマスター』専用試薬を完成した。

本稿では、ルミノマスター用試薬と検出系について紹介する。

2. 全自動測定装置に適応する発光条件の検討

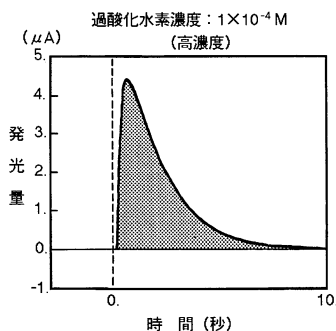


図2 発光パターン例
Example of luminescent pattern

前述した第一条件である化学発光検出の高感度を保ちつつ、発光検出時間10秒を実現させるため、発光試薬の組成を、0.2mM ルミノール・60 μ M m-POD・100mM N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸 (CHES) のpH9.5とした。この発光試薬を用いた H_2O_2 濃度 1×10^{-4} Mにおける発光パターンを図2に示す。

3. 再現性向上の検討

3.1 発光検出部の設計

化学発光反応は、高感度であるが再現性に乏しいと言われていたため、再現性向上について検討を行った。まず第一の着目点は、発光検出に使用するセルとして、市販のガラスチューブやプラスチックチューブを使用した場合、セルの厚みや歪みが方向によって異なり、発光の透過率に差を生ずる。また、発光検出器と発光セルの位置関係もこれに加わり、発光検出における方向性の要因がバラツキの大きな原因であると考えられた。

そこで、発光検出における方向性の影響を受けず、どの位置でも均一な発光検出を行うことのできる、図3のような、積分球を用いた検出機構を考案した。この発光検出機構において、発光セル内で発光した光は、積分球内で反射を繰り返して、均一な光となり、どの位置でも均一な発光を検出することができる。この発光検出機構を採用することにより、化学発光における再現性を向上させた。なお、この積分球を用いた発光検出法を空間積分法と呼んだ。

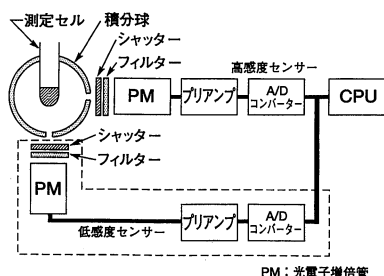


図3 発光検出部の構造
Structure of luminescent detector

3.2 発光量算出法の検討

第二の着目点は、発光量の算出方法であった。一般には、ピーク高さ・ピーク面積・半値幅・自動積分など種々の算出方法が用いられており、方法により、求められる結果もまちまちである。発光時のピーク高さを発光量とする方法(ピーク値)および発光開始から10秒間の積分値を発光量にする方法(積分値)での再現性の比較を図4及び表1に示す。

H ₂ O ₂ 濃度	ピーク高さ		積分値	
	平均	C.V.	平均	C.V.
1×10 ⁻⁸ M	2.70×10 ⁻⁵	9.87%	1.19×10 ⁻⁴	5.07%
1×10 ⁻⁷ M	9.28×10 ⁻⁵	3.68%	4.41×10 ⁻⁴	2.26%
1×10 ⁻⁶ M	1.02×10 ⁻³	1.81%	4.53×10 ⁻²	1.38%

表1 発光量算出法検討成績
Luminescence calculation method evaluation results (n=5)

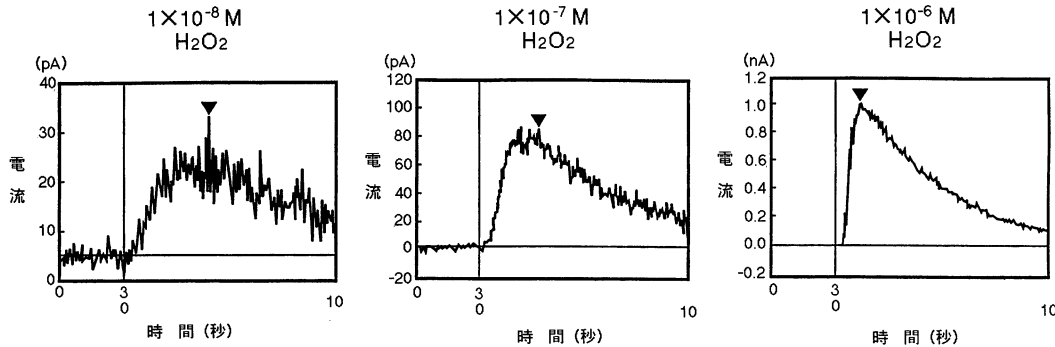


図4 発光量算出法検討時の発光パターン
Luminescent pattern at evaluation of luminescence calculation method

H₂O₂濃度の薄い、1×10⁻⁸Mや1×10⁻⁷Mでは、発光パターンに重畳したノイズによるバラツキがみられ、積分値の再現性がピーク値の再現性に比べて、良いことがわかった。したがって、発光量の算出法として、発光から10秒間の積分値を発光量とする方法を選択した。なお、この算出法を時間積分法と呼んだ。本時間積分法と先の空間積分法とを組み合わせることにより、ルミノマスターは、化学発光における再現性を大幅に向上させることができた。

4. 測定レンジの拡大

4.1 2系統の検出系組み合わせの原理

化学発光のダイナミックレンジは、比色法や蛍光法と比較して、広いことが特長である。したがって、化学発光の広いダイナミックレンジを如何に発光検出系に取り入れるかが重要である。そこで我々は、高感度および低感度の2系統の検出系を組み合わせ、広いダイナミックレンジをカバーする方法を考案した。その原理を図5に示す。化学発光の検出には、検出感度が1000倍異なる高感度と低感度の2本の光電子増倍管(PMT)を用いる。2つのPMTは、各々6桁の測定レンジを持ち、高感度PMTの上位3桁と低感度PMTの下位3桁を重なり部分として組み合わせる。この2系統のPMTは、常に発光を検出している。発光が強くなり、高感度PMTの出力信号が設定したしきい値(黒丸)に達した場合は、低感度PMTからの出力信号を高感度PMTの発光量に換算する方法である。この組み合わせ方法により、ルミノマスターの検出系は、信頼性の高い9桁の測定レンジを確保することが可能となり、化学発光の広いダイナミックレンジを生かした、化学発光検出が可能となった。

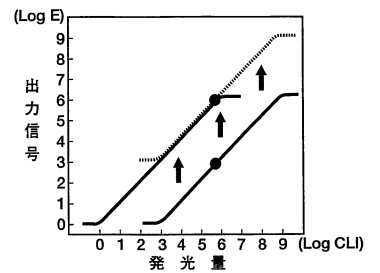
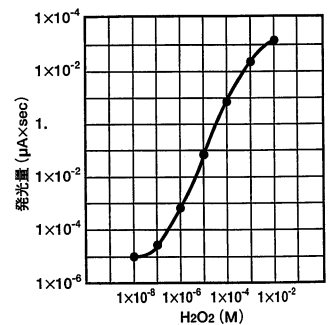


図5 検出系組み合わせ原理
Principle of detection line combinations

4.2 過酸化水素の測定

ルミノマスターを用い、H₂O₂の測定を行った。各種濃度における発光量と発光検出の再現性を図6に示す。H₂O₂濃度1×10⁻⁸~1×10⁻²Mまで、6桁にわたる広い検量域の測定が可能となった。これは、2系統のPMTの組み合わせにより広



H ₂ O ₂ 濃度 (M)	発光量 (μA×sec)	C.V. (%)
1×10 ⁻⁸	9.15×10 ⁻⁶	3.07
1×10 ⁻⁷	2.37×10 ⁻⁵	1.61
1×10 ⁻⁶	5.35×10 ⁻⁴	1.06
1×10 ⁻⁵	6.50×10 ⁻²	0.63
1×10 ⁻⁴	6.70	1.34
1×10 ⁻³	2.31×10 ²	0.94
1×10 ⁻²	1.19×10 ³	0.40

図6 過酸化水素の検量線と再現性試験
H₂O₂ calibration curve and reproducibility test (n=10)

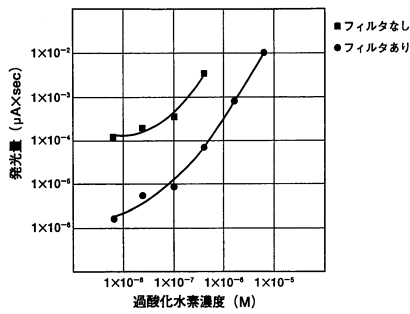


図7 バンドパスフィルタの検討
Evaluation of band-pass filter

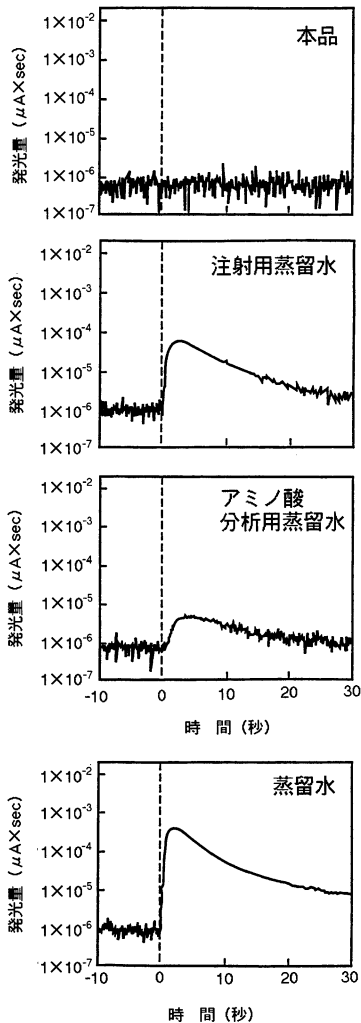


図8 試薬調整に用いる水の比較検討
Comparison evaluation of water used for producing reagents

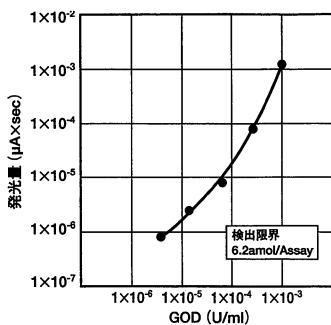


図9 GODの検出限界試験
GOD detection limit test

いダイナミックレンジが確保できたためである。また同時再現性は、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ で3%程度、その他の濃度では、1%程度以下と良好な成績が得られた。この結果、空間積分法と時間積分法を組み合わせた発光検出部の構造及び発光量の算出方法によって再現性が大幅に改善されたものと考えている。

5. ブランク値の低下の検討

化学発光検出をより高感度化する方法として、エンハンサを用いた増発光法が知られている。1986年、Thorpe & Kricka⁴⁾によりHRP/H₂O₂/ルミノールのエンハンサが発見されて以来、種々の化学発光反応におけるエンハンサが試みられている。エンハンサを用いる増発光法は、発光が増強され、長時間にわたり発光が持続することによって高感度な検出が可能となるが、1測定当たりの検出時間が長くなり、多数検体処理の全自動化には不向きである。このため、ルミノマスターにおける化学発光検出の高感度化は、ブランク値を低下させることにより、S/N比を改善する方法を検討した。

5.1 バンドパスフィルタの検討

通常の化学発光検出は、全波長を検出している。ルミノマスターでは、ルミノール/H₂O₂/m-PODの発光波長である425nm付近のみを検出するバンドパスフィルタの有用性を検討した。図7に示すごとく、バンドパスフィルタを透過して発光検出した場合、発光量は減少するが、低濃度域でのS/N比が大幅に改善された。

5.2 試薬調製に用いる水の影響

試薬調製に用いている溶解水のブランク発光に及ぼす影響を見るため、種類の異なる蒸留水について比較検討した。試薬調製の水として、通常の蒸留水、注射用蒸留水、アミノ酸分析用蒸留水を用いた。結果を図8に示す。この結果から、ルミノマスター用精製蒸留水(本品)を用いることにより、ブランクを低下させS/N比を改善することができた。

6. グルコースオキシダーゼの検出感度

ルミノマスターの至適測定条件下、酵素反応時間15分における、GODの検出限界を検討した。図9に示すごとく、ブランクの平均発光量+2SDとGOD検出の平均発光量-2SDが重ならない濃度を検出限界とした時、GOD 6.2μmol/Assayまで検出可能であった。

7. 種々の生体成分の測定

ルミノマスターは、抗体(または抗原)固相化試験管を用いた酵素免疫測定法の原理としている。測定法のブロックダイアグラムを図10に示し、生体成分の測定における免疫反応の原理を図11に示す。高分子生体成分の測定には、2ステップ(または1ステップ)サンドイッチ法を用い、低分子生体成分の測定には、競合法を用いる。

現在、ルミノマスターで測定できる生体成分は、腫瘍マーカーとして、 α フェトプロテイン(AFP)、癌胎児性抗原(CEA)、フェリチン(FER)、 β_2 マイクログロブリン(β_2 MG)、塩基性フェトプロテイン(BFP)、前立腺特異抗原(PSA)及び前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)、甲状腺マーカーとして、サイロキシン結合グロブリン(TBG)、サイロキシン(T₄)、遊離型サイロキシン(FT₄)及び甲状腺刺激ホルモン(TSH)、下垂体ホルモンとして、黄体ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)及びプロラクチン(PRL)、性腺ホルモンとして、絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、心筋梗塞のマーカーとして、心室筋ミオシン軽鎖I(MLCI)、ミオグロビン(Mb)、ステロイドホルモンとして、コルチゾール(CS)、糖尿病のマーカーとして、インスリン(IRI)、アレルギーのマーカーとして、免疫グロブリンE(IgE)、感染症マーカーとして、C型肝炎関連抗体のGOR抗体(GOR)、B型肝炎s抗原(HBsAg)、B型肝炎e抗原(HBeAg)、B型肝炎e抗体(HBeAb)の合計24項目である。

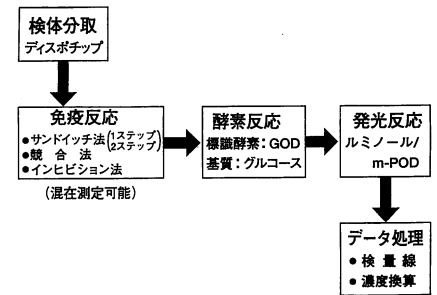


図10 測定ブロックダイアグラム
Measurement block diagram

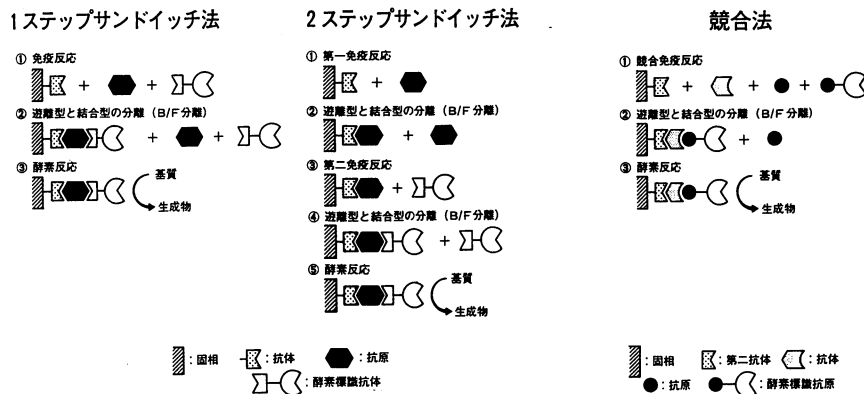


図11 反応系のモデル図
Schemes of immuno reaction

代表的な項目として腫瘍マーカー7項目の測定パラメータを表2に、それらの項目の測定範囲及び検出限界を表3に示す。また、代表例として、CEAの検量線

項目名		AFP	CEA	FER	β_2 MG	BFP	PSA	PAP
分析	方法	2SS	2SS	2SS	2SS	2SS	2SS	2SS
	時間	45分	45分	45分	45分	45分	45分	45分
	検体の種類	血清	血清	血清	血清、尿	血清	血清	血清
	検体量	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l
	希釈倍数	×1	×1	×1	×1000	×1	×1	×1
	希釈チューブ数	0	0	0	2	0	0	0
	イエローチップ数	1	1	1	3	1	1	1
	試薬	抗体種	モノクロ	モノクロ	ポリクロ	ポリクロ	モノクロ	モノクロ
	第1抗体量	—	—	—	—	—	—	—
	標識抗原量	—	—	—	—	—	—	—
	標識抗体量	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l
	基質液量	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l
	発光試薬量	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
校正	検量域	0.5~1000	0.5~1000	0.5~1000	0.05~100	0.5~1000	0.5~1000	0.25~500
	サンプル量	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l
	最大ポイント数	5	5	5	5	5	5	5
データ	単位	ng/ml	ng/ml	ng/ml	μ g/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
	測定範囲	0.5~1000	0.5~1000	0.5~1000	0.05~100	0.5~1000	0.5~1000	0.25~500

表2 測定パラメータ
Measurement parameters

分類	測定項目	測定範囲	検出限界	備考
腫瘍マーカー	AFP	0.5~1000 ng/ml	0.048	
	CEA	0.5~1000 ng/ml	0.050	
	FER	0.5~1000 ng/ml	0.089	
	β_2 MG	0.5~1000 ng/ml	0.016	検体×1000
	BFP	0.5~1000 ng/ml	0.128	
	PSA	0.5~1000 ng/ml	0.016	
	PAP	0.25~500 ng/ml	0.071	

表3 測定可能な生体成分の検量域と検出限界
Calibration area of measurable organic components and detection limit

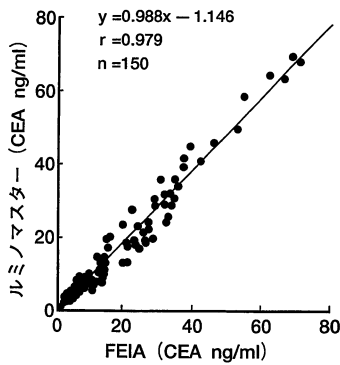


図13 CEAの相関図
CEA correlation diagram

測定項目	n	回帰式	相関係数	対象測定法
AFP	75	$y = 1.01x + 6.10$	0.995	FEIA
CEA	150	$y = 0.99x - 1.15$	0.979	FEIA
FER	75	$y = 0.99x + 0.08$	0.999	FEIA
β_2 MG	血清	$y = 1.14x + 0.42$	0.987	FEIA
	尿	$y = 1.11x - 10.3$	0.994	
BFP	41	$y = 1.03x + 9.50$	0.980	EIA
PSA	88	$y = 0.96x + 0.30$	0.976	FEIA
PAP	78	$y = 1.01x - 0.50$	0.992	RIA

表4 測定可能な生体成分の相関性試験
Correlation test of measurable organic components

及び測定手順を図12に示す。管理用血清を用いた同時再現性及び日差再現性は、各生体成分において、すべて7%以内と良好であった。また感染症関連項目を除く、20項目について、市販の測定キットとの相関性を検討した。代表例としてCEAの相関図を図13に示し、腫瘍マーカー7項目についての結果を表4に示す。これらの項目以外でも、相関係数が0.95以上と良好な結果が得られている。

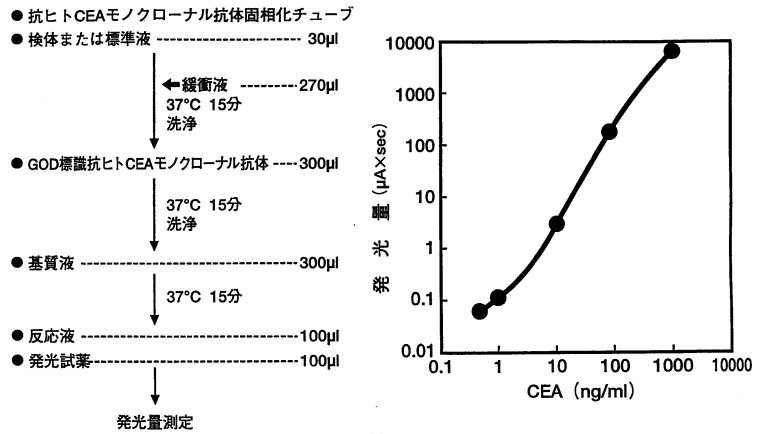


図12 CEAの検量線と操作手順
CEA calibration curve and operation procedure

8. 臨床検体測定における測定域拡大の効果

免疫化学検査の測定項目は、生化学検査と異なり疾患時の変動幅が大きく、腫瘍マーカー、感染症マーカー、炎症マーカーなどは、従来の免疫測定機では、検量域をオーバーし、再測定実施の頻度が高くなるのが難点である。ルミノマスターは、化学発光の広いダイナミックレンジを生かした発光検出により、従来機の検量域をオーバーする高濃度検体まで測定でき、再測定の頻度が大幅に低下している。その成果は、本誌Readout No.12,別報一構成と機能一で詳しく述べており、参照されたい。

9. まとめ

ルミノマスターは、従来のRIAと同等以上の感度を持ち、これまで広く使用されてきたRIAに取って代わる高感度免疫測定装置として開発できた。ルミノマスターの検出感度は、アルモルレベルの検出感度を有し、今後の新しい生体成分の測定に寄与するものと考えられる。

免疫化学検査の完全自動化、短時間測定、化学発光による広いダイナミックレンジの確保は、臨床検査の現場で、検査の省力化および感染の防止、ターンアラウンドタイムの短縮化及び経済的メリットに大きく役立ち、高く評価され、新しい免疫化学検査のさらなる発展に役立つものと考えられる。

今後は測定項目のシリーズ化を図り、一層の品揃えをしてゆきたい。

参考文献

- 1) Berson S. A., Yalow R. S., Bauman A., Rotschild M. A. and Newerby K.; Insulin- I^{131} metabolism in human subjects. J. Clin. Invest. 35, 170-190, (1956)
- 2) Engvall E. and Perlmann P.; Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry, 8, 871-874, (1971)
- 3) Ikegami T, Yamamoto M, Sekiya K, Sato Y, Saito Y, Maeda M and Tsuji A.; The development of Luminomaster™, a fully automated chemiluminescent enzyme immunoassay system. J. Biolumin. Chemilumin. 219-227, 10, 4 (1995)
- 4) Thorpe GHG, Kricka LJ; Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. Method Enzymol. 133, 331-353, (1986)



池上 卓志

Takuji IKEGAMI Phar.Dr.

三共株式会社
医療品部開発課 係長
薬学博士



佐藤 義弘

Yoshihiro SATOU Phar.Dr.

三共株式会社
医療品部開発課 課長
薬学博士

