〔シンポジウム：生化学検査の標準化と測定の高感度化〕

化学発光による高感度検出系の開発

芦原 義弘・磯村 光男

SUMMARY

Chemiluminescent immunoassays have commonly been used in clinical laboratories because of their high sensitivity and wide dynamic range. We employed highly sensitive and stable 1,2-dioxetane substrates, AMPPD^{TM} and CSPD^{TM} for alkaline phosphatase (ALP) and applied chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) for the detection of tumor markers and antibodies to infectious viruses. Chemiluminescent enzyme immunoassay using AMPPD as ALP substrate showed S/N values of more than 80 times those of CLEIA using fluorescent or colorimetric substrate. The chemiluminescent reaction using CSPD reached a plateau at 5 minutes. We observed a higher chemiluminescent signal by energy transfer using several fluorescent reagents in the presence of AMPPD and the enhancer BDMQ. Gelatin-coated ferrite particles as a solid phase showed a high dispersion floating property and very low background noise. We established an extremely sensitive CLEIA for IL-6 in which the detection limit was 0.1 pg/ml (zero+2 SD). We also applied gelatin solid phase to establish a sensitive CLEIA by reducing background noise through the release of an immune complex consisting of solid antibody, antigen and labeled antibody from ferrite particles using gelatinase. In this method, 7.5 times higher S/N than conventional CLEIA was obtained.

Key words: CLEIA, AMPPD, CSPD, gelatin-coated ferrite particle.

はじめに

ラジオアイソトープを用いる免疫測定法¹⁾ (RIA) が臨床検査に使用されるようになって 40 年以上経ち、当初の non-RIA 化の過程で酵素標識免疫測定法や蛍光標識免疫測定法が 80 年代には一般的に用いられるようになった。1990 年代に入ると免疫測定法の高感度化が盛んになり、なかでも化学発光をシグナルに用いる技術が急速に一般化した。さらに化学発酵法は従来の比色法と異なりホトマルのダイナミックレンジが 10^7 と極めて広いため測定領域を拡大させることが可能となった。それに伴い、 $\mu\text{g}\sim\text{ng/ml}$ の検出項目からカルシトニンや IL-6 のようなサブ pg/ml の検査項

目をカバーできるようになった。現在では直接発光体をラベルした系と酵素を介した系に大別されている。後者の酵素を用いる系は増幅反応であるため、より高感度となる可能性を持っている。現在、一般的に使用される酵素はパーオキシダーゼ (POD) とアルカリホスファターゼ (ALP) である。我々も ALP の基質として米国 Tropix 社の開発した安定かつ増幅可能なジオキセタン誘導体、AMPPD およびその誘導体である CSPD^{2,3)} を用いることにより高感度かつ迅速な化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) を開発し、生体の微量成分の測定システムを臨床検査に供している。本報告では発光免疫測定法による高感度検出を免疫の要素に分けて説明する。具体的には AMPPD による

Development of sensitive detection methods using chemiluminescent enzyme immunoassays.

Yoshihiro Ashihara, Mitsuo Isomura; 富士レビオ株式会社検査薬研究所

Correspondence address: Yoshihiro Ashihara, Diagnostics Research Laboratories, Fuji Rebio, 51, Komiya-cho, Hachioji 192-0031, Japan.

第 48 回日本電気泳動学会春季大会・シンポジウム

図1. 1,2-ジオキセタン基質の発光メカニズム.

R=H, AMPPD; R=Cl, CSPD.

高感度シグナル発生系の適用, その誘導体による高感度化, さらにエネルギー転送を応用した高シグナル化を, また免疫反応の最適化として固相の改良による短時間化, さらに固相のノイズを消去することによる高感度化等, いくつかの測定項目を例にして報告する.

高感度シグナル発生系の適用

1. 化学発光基質 AMPPD

化学発光免疫測定法では直接ラベル体としてはアクリジニウムエステルが使用されており, その標識量と発光量子収率に応じた感度が得られている. 一方, 酵素をラベルにする系で早くから使用されていた系がパーオキシダーゼ H_2O_2 /ルミノールであり, ルミノールの酸化により発光する. これに対し, 我々が使用している基質 AMPPD は図1に示すように, その構造にジオキセタン骨格を有する. 芳香環のリン酸エステル部分が酵素の作用部位であり, 反対側のアダマンチル基はジオキセタンの構造を安定化する機能を有する. リン酸が ALP により切断されることにより比較的不安定なフェノキサイドイオンとなる. これが CIEEL メカニズムによりジオキセタンが分解し, 励起型のメタヒドロキシ安息香酸メチルエステルを生じる. 基底状態に戻る時に発光する. 各発光物質の量子収率を比較するとエンハンサーの存在下で AMPPD は 10^{-3} 程度で他の直接ラベル体に比較して1オーダー低いが ALP のターンオーバーによる増幅のため実際には2

図2. 発光基質, 蛍光基質, 比色基質での感度比較.

オーダー近く高感度となっている. また TSH を測定する同一の免疫測定系で ALP の基質を変えて比色法 (p-ニトロフェニルリン酸), 蛍光法 (4-メチルウンベリフェリルリン酸), 化学発光法 (AMPPD) を比較すると, S/N でみた場合, 蛍光法や比色法の 80 倍以上の高感度となることがわかる (図2).

2. CSPD

AMPPD の誘導体として図1の R が H から Cl に置換された基質が CSPD であるが, 本基質は発光の

半減期が AMPPD に比べ短く、短時間で発光検出を最大にすることができる。実際にこの基質に増幅率の高いエンハンサーを組み合わせると図 3 に示すように約 5 分で最大に達する。一方、AMPPD では 2 倍の 10 分を要しており、より短時間の測定が可能となった。実際、TSH を測定した系では S/N が AMPPD の 5 分に比べ、2 分程度で最大に達している。得られたシグナルの高さの違いは主に用いたエンハンサーの違いによるものである (図 4)。

3. 蛍光エネルギートランスファーによる増感

AMPPD 自体の発光量子収率は水系では 10^{-5} と非常に低いだがこれが有機溶媒 (DMSO) の環境では 0.2 まで改善されることが知られている。もちろん、酵素反応は水系でなければ起きないので化学的に切断した場合の結果である。これは発光体の蛍光量子収率が水

図 3. AMPPD と CSPD の発光のタイムコース。

図 4. TSH 測定における酵素反応のタイムコース。

フェライト粒子を用いた CLEIA 法による TSH の測定。

図 5. 蛍光剤共存下での AMPPD の発光スペクトル。

表1. 各種蛍光剤共存下での化学発光酵素免疫測定法の発光増感.

Fluorescer	Amplification ratio	
	TSH (5 μ IU/ml)	CEA (5 ng/ml)
Without fluorescer	1.00	1.00
Fluorescein	8.53	9.77
Calcein	5.99	6.45
Umbelliferone	5.39	4.69
4 MU	4.44	4.29

系では極めて低いからであり、エンハンサーを用いることにより 10^{-3} まで改善させている。このエンハンサーは親水性残基と疎水性残基を含む水溶性ポリマーであり、これに蛍光剤を組み合わせることによりさらなる増感が可能である。隣接する蛍光剤が p-ヒドロキシ安息香酸メチルエステルの蛍光により励起され、その蛍光剤の蛍光が発光として得られる。我々はフルオレッセインやカルセインなど7種の蛍光剤によるエネルギートランスファーを調べた。典型的な例を図5に示すが Fluorescein では 470 付近の発光が濃度に応じて消光し新たに蛍光剤の蛍光波長 530 nm に相当する emission を認めた。それによる増幅は Fluorescein では 11.44 倍に達した。この系を TSH および CEA の測定に応用した結果、表1に示すように、シグナル増幅に相応した実際の検出シグナルの増幅が確認された。

免疫反応の最適化

1. 磁性微粒子の適用

免疫の高感度、短時間化にはシグナルの高感度化だけでは不十分であり、抗原抗体反応の最適化が不可欠である。我々も、1980年代に POD を用いた EIA では 6 mm ビーズや ELISA プレートを検討し、製品開発したが平衡に達するための反応時間が非常に長く 16 時間近くを要していた。これは大きく 2 つの理由により免疫反応効率が低下していたためである。すなわち、固相のキャパシティーが十分でないこと、第2に反応効率 (collision efficiency) が低いことである。その点で B/F 分離が容易で、かつ固相の結合面積を高めることができる磁性微粒子は固相用材料として最適である。我々も 0.3 μ m の磁性粒子と従来のビーズ粒子でシグナルと平衡に達する時間を CA 19-9 の系で調べた⁴⁾。その結果、磁性粒子では固相の面積を 5 倍以上に確保でき、反応が 30 分以内に平衡に達した。一方、従来のビーズでは 16 時間を要した。これ

は微粒子の採用で反応効率が大幅に改善されたことによる結果である。また、得られるシグナルも磁性粒子のほうが高く、固相の結合キャパシティーの増大 (表面積で約 2 倍) が性能アップに直接寄与している。

固相のノイズ消去による S/N 改善

免疫測定法の高感度化としてここまでシグナルを上昇させる技術について報告したが、もう一つのアプローチとしてノイズを消去することによる高感度化が上げられる。免疫測定法におけるノイズの多くは標識体の固相への非特異的吸着と考えられる。これを抑制する方法として以下の二つのアプローチを行った。

1. 低ノイズ高分散性粒子の適用

磁性粒子の高結合性は時に標識体自身をも結合させてバックグラウンドノイズを上昇させてしまうことがある。この結合を抑えるアプローチとして粒子の表面を蛋白成分で覆う試みを行った。蛋白としてゼラチンを選択しコアセルベーション法により被覆し、分散性、磁気応答性、シグナル、ノイズを従来のものと比較した。項目としては IL-6 を採用した。その結果、磁気応答性は従来とほとんど変わることなく粒子を 30 秒以内にチューブ壁に集磁することができた。一方、分散性は従来以上に改善し 30 分後も 90% 以上の粒子が浮遊していた。また、酵素の基質として CSPD を採用し測定した結果、IL-6 の検出感度は 0.1 ng/ml (zero + 2 SD) と極めて高感度となり、従来は不明であった正常人分布を測定した。n=139 で最低値が 0.5 pg/ml で感度以下の検体はなく、平均正常値は 2.16 pg/ml⁵⁾ となった。

2. リリース免疫測定法の開発

もう一方のアプローチとして固相に結合した特異成分のみを固相から取り出す方法に着目し、リリース免疫測定法を検討した⁶⁾。原理は図6に示すが、固相側の抗体を酵素で切断可能なリンカーを介して粒子に結合させた。通常の免疫反応の後、リンカーを酵素で切断する。非特異的な結合はこの処理によって乖離することはないので粒子状にそのまま残る。特異的に抗原をサンドイッチした標識抗体-抗原-固相抗体のコンプレックスが液層にリリースされる。この反応液と基質を反応させることにより固相のノイズは消去され、その結果、S/N が上昇する。この系の検討にはカルシトニン抗体を用いた。リンカーとしてはゼラチンを用い、分解酵素としてゼラチナーゼを用いた。1 ng/ml のカルシトニンを測定した結果、ゼラチンスペーサーの固相では固相側から発生するブランクは従来の粒子

図6. 免疫複合体リリース法による CLEIA 法の原理。

の1/9まで低下し、S/Nは3000となった。これに対し、従来の固相上のシグナルを測定する系ではS/Nが400であり、7.5倍の高感度化が達成できた。この系ではリンカースペーサーと切断試薬（酵素等）の組み合わせとリンカーと抗体の結合方法の選択が非常に重要で、組み合わせによってはリリース効率が非常に低下する場合もある。

3. その他

このほかにも、HIV p-24抗原検出系を我々のCLEIAシステムに適応させているが検出感度は平均 ± 3 SD法で0.5 pg/mlと極めて高感度な結果が得られた。既にセロコンバージョンパネル検体での測定も検討されているが、他社キットと同等以上の結果が得られた。

これ以外にも、化学発光免疫測定法を応用した例として、デバイス内に試薬を組み込み発光基質液で展開する系をHIV-1抗体/HBs抗体同時測定等にも適用した。その結果、カメラルミノメータにより、おのおのを展開機材上で別々に検出することができた。

終わりに

化学発光免疫測定法は直接シグナルをとるか酵素等で増幅するかは別として、全自動システムに組み込まれることにより極めて高感度に精度よく測定することが可能となった。ここ数年のうちに多くの試薬メーカーが採用してきており、今後はこの高感度という特徴を生かした項目の開発がなされることが期待される。

文 献

- 1) Yalow RA, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological method. *Nature* 1958; 184: 1648-9.
- 2) Bronstein I, Voyta JC, Edward B. 1,2 Dioxetanes, novel chemiluminescent enzyme substrate. Application to immunoassays. *J Biolumin Chemilumin* 1989; 4: 99-111.
- 3) Bronstein I, Voyta JC, Erve YV, Kricka LY. Advances in ultrasensitive detection of proteins and nucleic acids with chemiluminescence: Novel derivatized 1,2-dioxetane enzyme substrate. *Clin Chem* 1991; 37: 1526-7.
- 4) Nishizono I, Iida S, Suzuki N, Kawada H, Murakami H, Ashihara Y, Okada M. Rapid and sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for measuring tumor markers. *Clin Chem* 1991; 37: 1639-44.
- 5) Isomura M, Ueno M, Shimada K, Kogaki H, Ashihara Y. Highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay with gelatin-coated ferrite solid phase. *Clin Chem* 1994; 40: 1930-1.
- 6) 磯村光男, 水畑智恵, 芦原義弘. 免疫複合体リリースアッセイを用いた超高感度カルシトニン測定法. *生化学* 1997; 69: 769.
- 7) Hasegawa A, Andoh A, Kawabata K, Ashihara Y. Simple and sensitive detection of antibody to HIV-1 using chemiluminescent immunochromatography. Tenth International Conference On AIDS (Japan) Abstract 1994.