

〈特集：新しいテクノロジー・イムノアッセイ〉

新しいイムノアッセイ「LOCI™法」を用いた 高感度トロポニンI測定

横山 知子、伊藤 俊幸

A highly sensitive Troponin I assay based on a new immunoassay 'LOCI advanced chemiluminescence'

Tomoko Yokoyama and Toshiyuki Ito

Summary LOCI™ technology represents an important advance in immunoassay testing, enabling unique ultra-integration with unprecedented turnaround times and sensitivity. This innovative chemiluminescence technology provides unlimited potential for developing even the most complex immunoassays such as highly sensitive Troponin I.

The Dimension Vista™ 500 system was designed as a consolidated middle throughput analyzer offering a broad menu and many ease-of-use features to optimize workflow. Multiple independent detection modules enable the processing of both routine and specialty plasma protein assays, and highly sensitive immunoassays together with clinical chemistry assays and electrolytes—all from the same sample tube.

Key words: Dimension Vista™ 500, High sensitivity Troponin I, LOCI™ technology

I. はじめに

医療を取り巻く環境が急激に変化する中、患者様の視点に基づいた、質の高い、かつ効率的な医療の提供が求められている。これらの視点から見ると現状のイムノアッセイ法には以下の課題が挙げられる。

- 1) 患者様の視点、医療の質から見た課題
◆ 生化学、血液学検査と比較して反応時間が長

く、T.A.T (Turn Around Time) が遅速となるため、患者様の待ち時間が延長し、また、臨床からの至急検査、診療前検査の要求に対応できない。

- ◆ 誰でも簡単に測定できる分析装置、試薬がなく、測定のための専任者が必要になるため、精度の高い夜間検査、緊急検査が実施できない。
◆ 多量の検体が必要なため、患者様の負担が大きく、また、新生児では測定が不可能な項目

シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社 マーケティング部
〒141-8673 東京都品川区東五反田3-20-14 高輪パークタワー

Siemens Healthcare Diagnostics K.K.,
Takanawa Park Tower 3-20-14, Higashi-Gotanda,
Shinagawa-ku, Tokyo 141-8673, Japan

がある。免疫血清学検査向けの専用装置を使用するために、検体の小分けが必要になり、多くの採血量が必要となる。

2) 医療効率、経営効率改善から見た課題

◆免疫血清学検査向けの専用装置を使用するため、装置の初期投資、消耗品費、保守・メンテナンス費用と時間、オペレーションのための人件費、トレーニング時間、設置スペース等が必要となる。

これらの課題を克服するため、機器のモジュール化や生化学検査との統合といった、機器の集約化が進められているが、実際は複数の装置を結合、または一体化しただけといった見せかけの統合が散見される。これらは、検体小分け作業の削減は期待できるものの、検体が各モジュールにて順次測定されるため、報告時間の短縮は期待できず、モジュール毎に消耗品コスト、メンテナンスコスト等が必要であり、コスト、ワークロード、時間、スペースの削減にも限界があると考えられる。

シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社が開発し、パテントを持つLOCI™法(Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay)は、BF分離を必要としないホモニアスな測定原理であり、甲状腺ホルモン、心筋マーカー、腫瘍マーカー、貧血関連マーカー、各種ホルモンの測定が可能である。

今回はLOCI™法をはじめとした4つの測定原

理を一台の機器に集約した「ディメンション ビスタ 500」の基本性能とLOCI™法の測定原理、LOCI™法を用いた各測定項目のうち、高感度心筋トロポニンI 測定の概要について紹介する。

Ⅱ. ディメンション ビスタ 500の概要

シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社では2008年に4つの原理であるフォトメトリー法、V-LYTE™電極センサー法、ネフェロメトリー法、LOCI™法を集約し、生化学から高感度イムノアッセイまで測定できる同時多項目自動分析装置「ディメンションビスタ 1500」を発売している。今回発売される「ディメンションビスタ 500」はディメンションビスタ 1500の統合機としてのコンセプトをそのまま継承し、中小規模施設向けの処理能力を搭載した免疫生化学測定機である(図1)。

表1に示したとおり、ディメンションビスタ

表1 ディメンションビスタ 500とビスタ 1500の比較

		Vista® 500	Vista® 1500
Reagent Flex/QC/Cal スロット数		144	166
サンプル分注プローブ数		3	5
試薬分注プローブ数		3	6
キュベット洗浄ステーション数		5	9
処理能力	IMT + Photometry (test/hour)	1,000	2,000
	LOCI法 (test/hour)	180	180
	Nephelometry (test/hour)	150	200



図1 ディメンションビスタ 500外観

500とビスタ 1500の主な違いは処理能力であり、フォトメトリー法では大きく処理能力が異なる。しかし、LOCI™法の処理能力は共通であり、ネフェロメトリー法でも大きな減少はない。このことは、施設での測定項目に応じた機種選択の幅が広がり、お客様のニーズに応じた提案が可能になると考えられる。

ディメンション ビスタ 500はワークセル方式を採用しており、複数の分析装置をただ単に結合した従来のモジュラー方式とは異なり、全ての項目を1台の分析装置で同時に測定可能である。1本の採血管が分析装置を移動して測定がスタートするモジュラー方式とは異なり、1台の分析装置、それも1本の検体から、全ての項目を同時に測定することにより、生化学から高感度免疫アッセイまで全ての測定結果をほぼ同時にタイムリーに報告可能である。また、分析装置の台数を大幅に削減することにより、メンテナンス、キャリブレーション、試薬補充と

いった業務を大幅に効率化でき、さらに、スペース、消耗品、初期投資といったコストも削減が期待できる。

ディメンション ビスタ 500は同時に144本の試薬カートリッジ、またはQC/キャリブレーションバイアルラックの搭載が可能である（図2）。また、測定可能項目に関しても図3に示したとおり、100項目以上の試薬が既に発売済みである（図3）。

Ⅲ. LOCI™法の測定原理

LOCI™（Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay）法は、一重項酸素をトリガーとしたBF分離の必要のないホモジニアスな免疫アッセイである。

LOCI™法には2種類のポリスチレン粒子、センシビーズとケミビーズを使用する。センシビーズは直径200 nmのポリスチレン粒子であり、

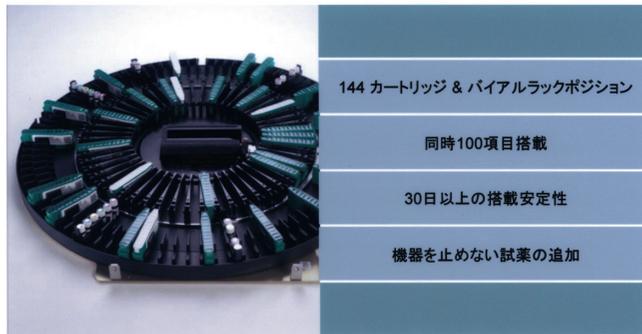


図2 試薬カートリッジ/バイアルラック装填ポジション

フォトメトリー	一般生化学	酵素	血中薬物	免疫抑制剤	その他 CO2 エタノール アンモニア HbA1c
ネフェロメトリー	血漿蛋白 高感度CRP/シスタチンC/栄養指標蛋白				
LOCI™	心疾患 マーカー	甲状腺 ホルモン	腫瘍 マーカー	貧血 マーカー	感染症 その他 インスリン Cペプチド など
電解質センサー	Na/K/CL				

図3 測定項目

フタロシアニンという青色の色素を含んでいる(図4)。フタロシアニンは、680 nmの光を吸収し、励起状態から基底状態に戻る際に一重項酸素を発生する。一重項酸素には電子が空の軌道が存在し、強力な酸化作用をもつ(図5)。一重項酸素の半減期は4 μ秒であり、一瞬にして通常の酸素の電子配列に戻る。従って、接近している物質に対してのみ一重項酸素の酸化作用

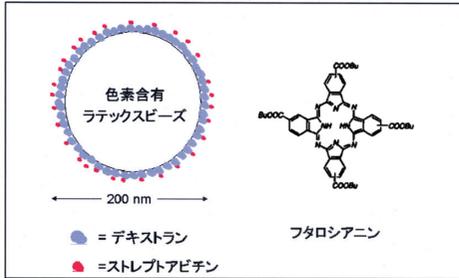


図4 センシビーズ

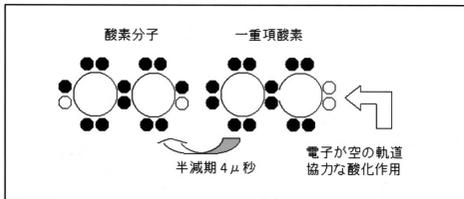


図5 酸素分子と一重項酸素の電子配置

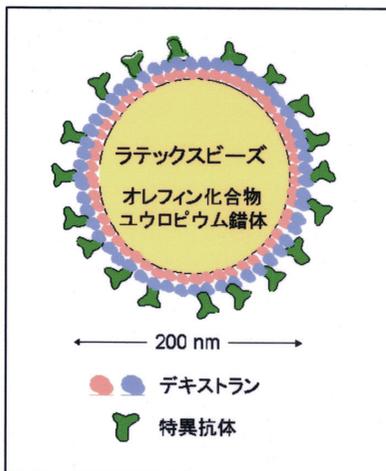


図6 ケミビーズ

が発揮される。センシビーズの表面にはストレプトアビジンが結合しており、ビオチン化抗体と反応する。

ケミビーズは直径200 nmのポリスチレン粒子である。表面には測定物質と反応する特異抗体が結合しており、オレフィン化合物とユウロピウム錯体が含まれている(図6)。オレフィン化合物は一重項酸素により酸化され発光する。また、ユウロピウム錯体はオレフィン化合物の発光エネルギーを吸収し612 nmの光を発光する。

検体中の目的物質はビオチン化抗体と反応し、ケミビーズ上の抗体と反応する。さらに、ストレプトアビジン結合センシビーズと反応し、センシビーズ-目的物質-ケミビーズ複合体を形成し、センシビーズとケミビーズが接近する(図7)。2つのビーズが接近した状態で680 nmの光をセンシビーズに照射すると、一重項酸素が発生し、ケミビーズと反応し612 nmの光を発光する(図8)。一方、検体中に目的物質が存在しない場合、複合体を形成せず、2つのビーズが離れた状態で存在する。2つのビーズが離れた状態で680 nmの光を照射すると一重項酸素は発生するが半減期が4 μ秒と短くケミビーズとは反応しないため発光しない。検体中の目的物質が多いほど、より多くの複合体が形成され、

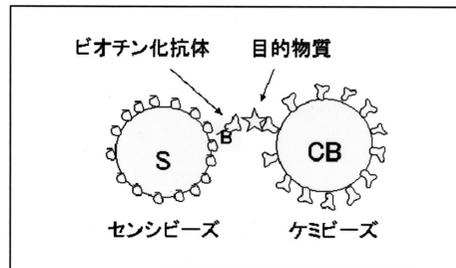


図7 複合体の形成

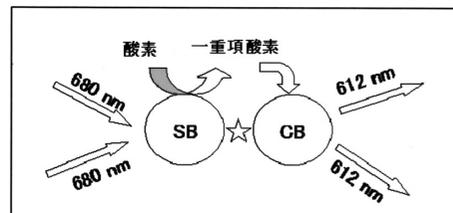


図8 複合体による発光原理

センシビーズとケミビーズが接近することにより発光量が増加する。612 nmの光の強度を、既知濃度の標準液の光の強さと比較し、検体中の目的物質の濃度を算出する。

LOCI™法では、光の照射、発光、測光を繰り返し実施することにより、より大きなシグナルが得られ、偶発的に発生するノイズを吸収することができる。

IV. LOCI法による心筋トロポニンIの測定原理

「フレックスカートリッジ トロポニンI V」(ディメンションビスタ用心筋トロポニンI測定試薬)はホモジニアスサンドイッチ化学発光免疫測定法により血清または血漿中の心筋トロポニンIを測定する試薬である。本試薬には、2つの合成粒子試薬とビオチン化抗心筋トロポニンIマウスモノクローナル抗体フラグメントが含まれる。1つ目の粒子試薬(ストレプトアビジン吸着フタロシアニン含有ポリスチレン粒子。以下、センシビーズ)はストレプトアビジンでコーティングされ、感光色素を含有する。2つ目の粒子試薬(抗心筋トロポニンIマウスモノクローナル抗体吸着オレフィン、ユウロピウム錯体含有ポリスチレン粒子。以下、ケミビーズ)は、別の抗心筋トロポニンIマウスモノクローナル抗体でコーティングされ、化学発光色素を含有する。測定試料は、ケミビーズとビオチン化抗体と共にインキュベーションされ、粒子-心筋トロポニンI-ビオチン化抗体の免疫複合体を形成する。センシビーズが添加されてビオチンと結合し、2つのビーズによる免疫複合体を形成する。複合体に680 nmの光を照射すると、センシビーズから一重項酸素が発生し、ケミビーズ

と拡散し化学発光が生じる。シグナルは612 nmで測定され、測定試料中の発光量から心筋トロポニンI濃度を算出する。

V. LOCI法による心筋トロポニンIの基礎性能

表2に示したとおり、ディメンションビスタ用「フレックスカートリッジ トロポニンI V」は少ない検体量にて、高感度、短時間測定が可能である。

1) 同時再現性

5種類のプール血清を20回測定し再現性を求めた。1.9~9.0%の良好な再現性が確認された(表3)。

2) 実効感度

患者検体を20重測定し平均値とCV%を求めグラフにプロットした。CV%が10%を示す濃度をグラフから求め実効感度とした。実効感度は0.04 ng/mLであった(図9)。

3) 相関性

凍結保存された患者検体50検体をディメンション用「フレックスカートリッジ トロポニンI」ならびにディメンションビスタ用「フレックスカートリッジ トロポニンI V」を用いて測定した。図10に示したとおり、良好な相関性($Y=0.96X-0.12$, $r=0.97$)が確認された(図10)。

4) 基準範囲

健常者199名の血清検体を用いて実施した試験結果より、得られた基準範囲(99パーセントイル値)は、0.045 ng/mLであった(図11)。

表2 フレックスカートリッジ トロポニンI V 基本性能

Assay Time:	10 min
Assay Range:	0.005-50 ng/mL
Analytical Sensitivity:	0.005 ng/mL
Sample Volume:	20 μ L
Specimen Types:	serum heparin plasma

表3 同時再現性

Sample	Mean	Within-Run (%CV)
Pool 1	0.02 ng/mL	9.0
Pool 2	0.06 ng/mL	4.7
Pool 3	0.33 ng/mL	2.6
Pool 4	2.26 ng/mL	1.9
Pool 5	29.7 ng/mL	2.4

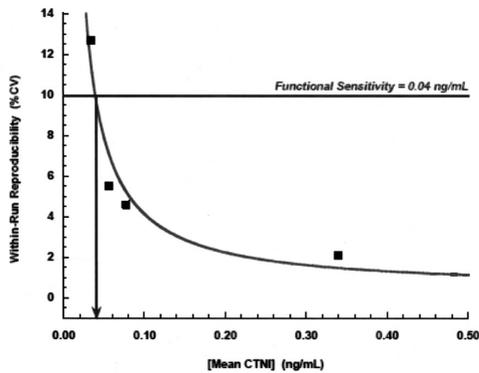


図9 実効感度

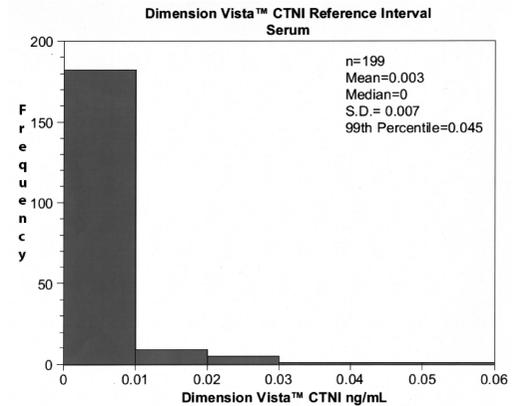


図11 基準範囲

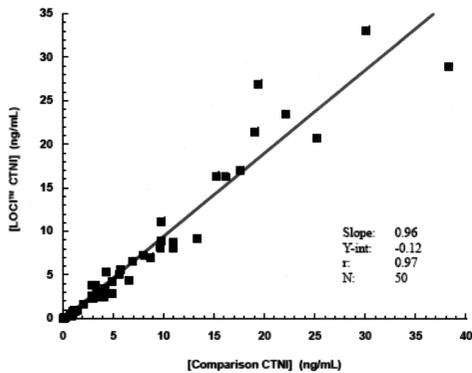


図10 相関

VI. 高感度心筋トロポニン測定 臨床的有用性と今後の展望

血中心筋トロポニン測定系は骨格筋のトロポニンと交差せず、心筋特異的であることより、2000年の「欧州心臓病学会/米国心臓病学会 (ESC/ACC) 急性心筋梗塞診断ガイドラインの改定」から急性心筋梗塞診断における生化学マーカーの第一選択とされるようになった¹⁾。また2007年には「欧州心臓病学会/米国心臓病学会/米国心臓協会/世界心臓連合 (ESC, ACC, AHA, WHF) によるコンセンサスの取れた急性心筋梗塞診断ガイドラインの再改定」が発表され、心筋トロポニンの診断基準値である「健常者の99パーセントイル値における変動係数 (CV) % が10%以下である高感度試薬」が推奨されている^{2),3)}。これを受けて近年ではトロポニン試薬の高感度化が進みつつあるが、現在までのとこ

ろ高感度トロポニン試薬に該当するものはまだ少なく、「フレックスカートリッジトロポニンI V」はこれを満たす高感度心筋トロポニン測定試薬の1つである⁴⁾。

従来法では心筋梗塞発症1、2時間以内の超急性期の検査に心筋トロポニンは不向きとされ、ミオグロビン、H-FABPなどで評価していたが、高感度測定の実現により、心筋トロポニン測定的心筋梗塞超急性期診断、リスク評価における有用性が示唆されている⁵⁾。また、心不全の治療・原因究明・リスク評価についても、高感度心筋トロポニン測定を用いて従来法では困難であった健常者の99パーセントイル値に近い低値領域を精度よく測定することで、今後より詳細な解析が進み、将来は心不全の一般検査となる可能性が高いと考えられている⁶⁾。今後の展望としては、潜在性微小心筋障害の検出を目的に検診をはじめとした一般住民への応用、高血圧患者への応用も期待されている。

【参考文献】

- 1) 佐藤幸人: 血中心筋トロポニン測定. 検査と技術, 36: 754-762, 2008.
- 2) Thygesen K, Alpert JS, White HD, et al.: Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*, 116: 2634-2653, 2007.
- 3) Thygesen K, Alpert JS, White HD, et al.: Universal definition of myocardial infarction. *Euro Heart J* 28: 2525-2538, 2008.
- 4) http://www.ifcc.org/PDF/ScientificActivities/Committees/C-SMCD/cTn_Assay_Table_v091209.pdf