

# HISCL 試薬の概要

シスメックス株式会社 診断薬開発本部 上野 哲男

## はじめに

感染症マーカー、腫瘍マーカー、ホルモン等の免疫測定検査は、近年、検出系に化学発光を用いた高感度測定が主流となり、また、検査の効率化のために測定時間の短縮が進んでいる。

今回、シスメックスでは、微量検体を短時間で高感度に測定する試薬と装置のシステム（HISCL）を発売した。ここでは、HISCL 試薬の概要について測定原理と特徴を主として紹介する。

## 開発コンセプト

HISCL とは、High-sensitivity Chemiluminescence Enzyme-immunoassay より作られたシスメックスの新規免疫測定システムの名称で、高感度な化学発光系を用いた酵素免疫測定法であることを表している。

この名が示すように HISCL 試薬は、HBsAg や TSH などの高感度測定が要望されている項目で世界トップレベルの感度を達成することを目標に開発され、HBsAg で 0.03 IU/mL、TSH で 0.002  $\mu$  IU/mL の検出感度を実現した。

また、この感度を微量（10 ~ 30  $\mu$  L）の検体量で達成して患者さんへの負担を軽減すること、検査の迅

速化に対応するために短時間（約 17 分）で各項目を測定することを目標に開発した。

## 技術

### 1. 測定原理（共通）

HISCL 試薬では反応に用いる固相として磁性粒子を採用している。これは、磁性粒子を反応液中に分散させることで反応を液相に近い状態で短時間に行わせること、および磁石で集積させて B/F 分離（抗原抗体反応したものと未反応のものを洗浄分離することにより、バックグラウンドを低減させて高感度を実現させるために重要な技術である。

また、標識酵素に ALP（Alkaline phosphatase：アルカリホスファターゼ）を用い、高感度な化学発光基質である CDP-Star と組み合わせることにより、高感度測定を実現した。CDP-Star は図 1 に示す構造を持つジオキセタン誘導体で、ALP 存在下で図 2 に示す反応により発光する。CDP-Star は他の検出基質に比べ、より高感度であり（図 3）、HISCL 試薬の高感度測定に大きく貢献している。

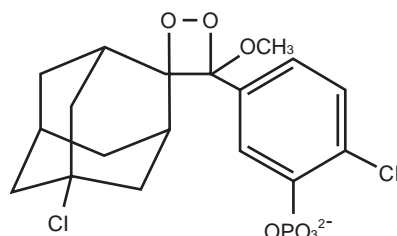


図 1 . CDP-Star® の構造式

CDP-Star® is protected under one or more of U.S. Patents

5, 582, 980; 5, 851, 771; 5, 538, 847; 5, 326, 882; 5, 145, 772; 4, 978, 614; and 4, 931, 569.

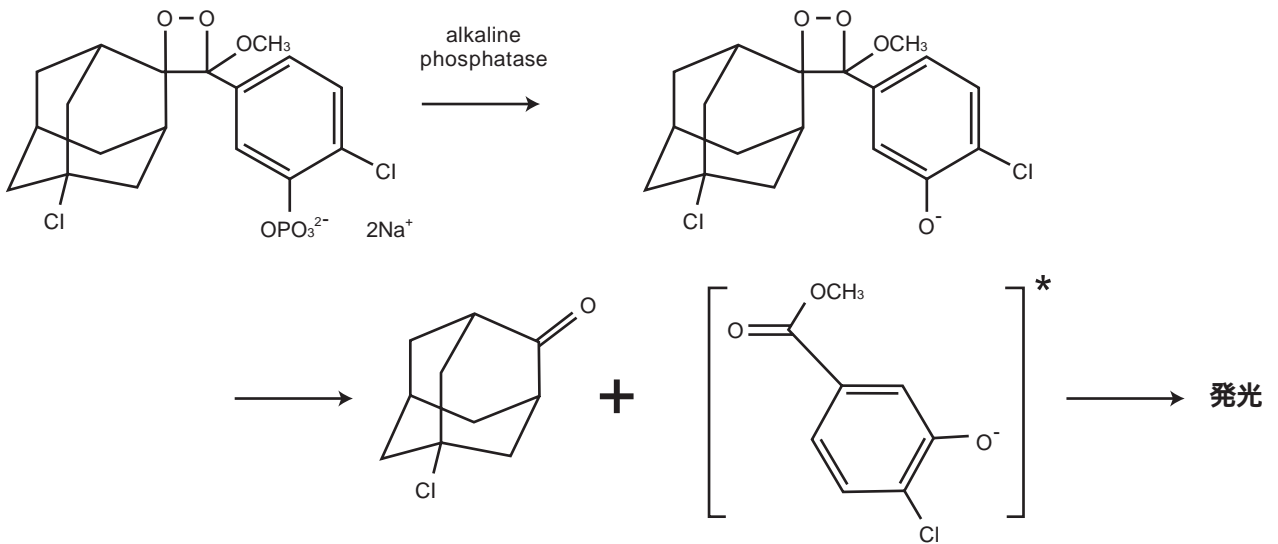


図2 . CDP-Star<sup>®</sup>による化学発光の反応式

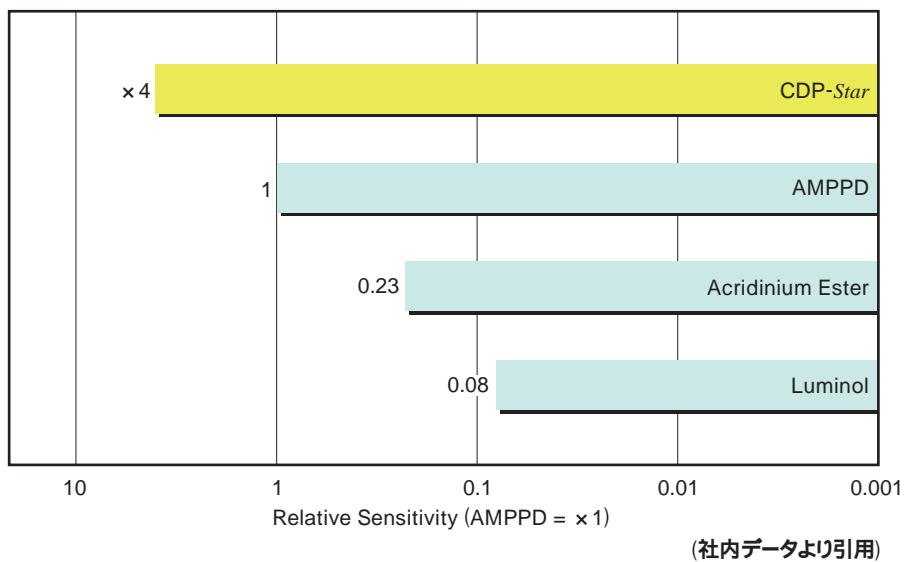


図3 . 検出試薬の感度比較

## 2. 試薬構成

各項目の試薬構成は、項目毎に異なるキャリアブレード、R1～R3試薬とすべての項目に共通のR4/R5試薬（発光基質セット）および洗浄液より構成されている。

各項目のR1～R3試薬の内容は表1に示したとおりであり、項目毎に異なっている。

## 3. 測定原理

各試薬の反応原理は、それぞれの反応を最適化したことにより項目毎に異なっている。ここでは代表的な項目であるHBsAg試薬とHCV Ab試薬の測定原理を示す(図4)。

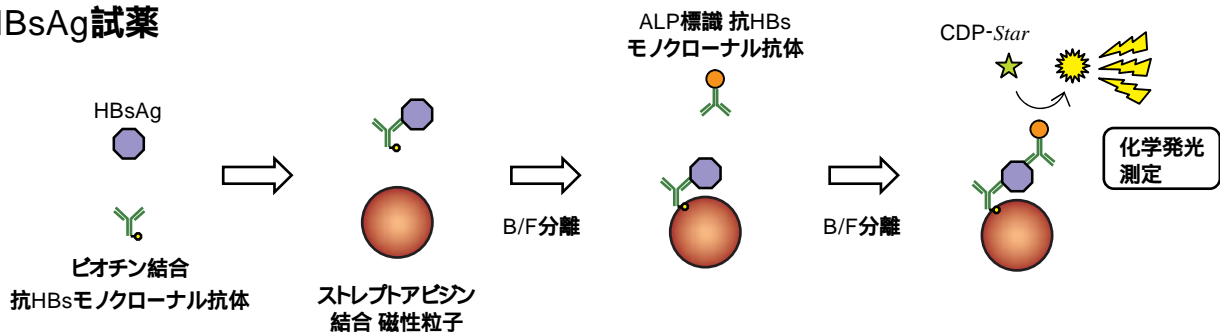
### 1) HBsAg試薬

2ステップサンドイッチ法を測定原理とし、最

表1. 各項目のR1～R3試薬の内容

項目	R1試薬	R2試薬	R3試薬
HBsAg	ビオチン結合 抗HBsモノクローナル抗体	streptavidin結合 磁性粒子	ALP標識抗HBs モノクローナル抗体
HBsAb	ALP標識HBs抗原	HBs抗原結合磁性粒子	-
HCV Ab	ビオチン結合HCV抗原	HCV抗原固定化磁性粒子	ALP標識抗ヒトIgG モノクローナル抗体
TSH	ALP標識 抗TSHモノクローナル抗体	streptavidin結合 磁性粒子	ビオチン結合 抗TSHモノクローナル抗体
FT3	ビオチン結合 抗T <sub>3</sub> モノクローナル抗体	streptavidin結合 磁性粒子	ALP標識T <sub>3</sub>
FT4	ビオチン結合 抗T <sub>4</sub> モノクローナル抗体	streptavidin結合 磁性粒子	ALP標識T <sub>3</sub>

### HBsAg試薬



### HCV Ab試薬

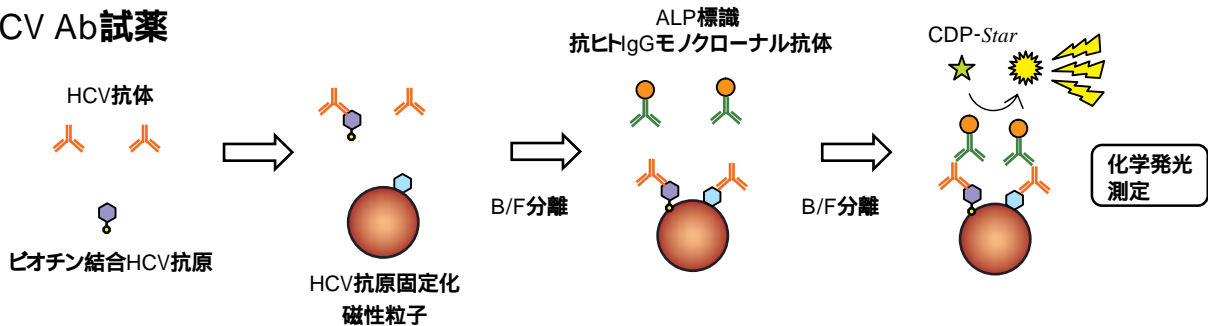


図4. 測定原理

初に血清（または血漿）中のHBs抗原とR1試薬中のビオチン結合抗HBsモノクローナル抗体が反応し、抗原抗体複合体を形成する。次いで、ストレプトアビジン結合磁性粒子を添加することによりビオチンとストレプトアビジンの強固な反応により、磁性粒子上にHBs抗原を捕捉する。

HISCL洗浄液で洗浄後（B/F分離）、ALP標識抗HBsモノクローナル抗体を添加し、磁性粒子上のHBs抗原に抗原抗体反応を介してALPを結合させる。

未反応のALP標識抗体を洗浄後、R4試薬で磁性粒子を分散させ、次いでR5試薬（CDP-Star）を添加し、化学反応により生じた発光の強度を測定する。

キャリアプレートをを用いて作成した検量線よりHBs抗原濃度を求め、0.03 IU/mL以上の結果が得られた場合を陽性、0.03 IU/mL未満の場合を陰性と判定する。また、陽性試料では得られた発光強度をもとにHBsAgの定量が可能である。

## 2) HCV Ab 試薬

HCV抗体の検出は、HCV抗原と抗ヒトIgGモノ

クローナル抗体による2ステップサンドイッチ法を測定原理としている。

第一反応では、R1試薬中のビオチン結合HCV抗原と血清（または血漿）中のHCV抗体が反応する。次いで、HCV抗原固定化磁性粒子を添加し、HCV抗原と未反応のHCV抗体とを反応させると共に磁性粒子上のストレプトアビジンによりビオチン結合HCV抗原を捕捉する。

洗浄後、ALP標識抗ヒトIgGモノクローナル抗体を添加し、磁性粒子上のHCV抗体にALPを結合させる。以降はHBsAg試薬と同様のステップで化学発光の強度を測定する。

キャリアプレートをを用いてカットオフインデックス（C.O.I.）を求め、1.0以上を陽性、1.0未満を陰性と判定する。

HISCLシステムの測定装置であるHISCL-2000iでの反応フローは図5のとおりであり、検体分注から約17分で結果を得ることができる。

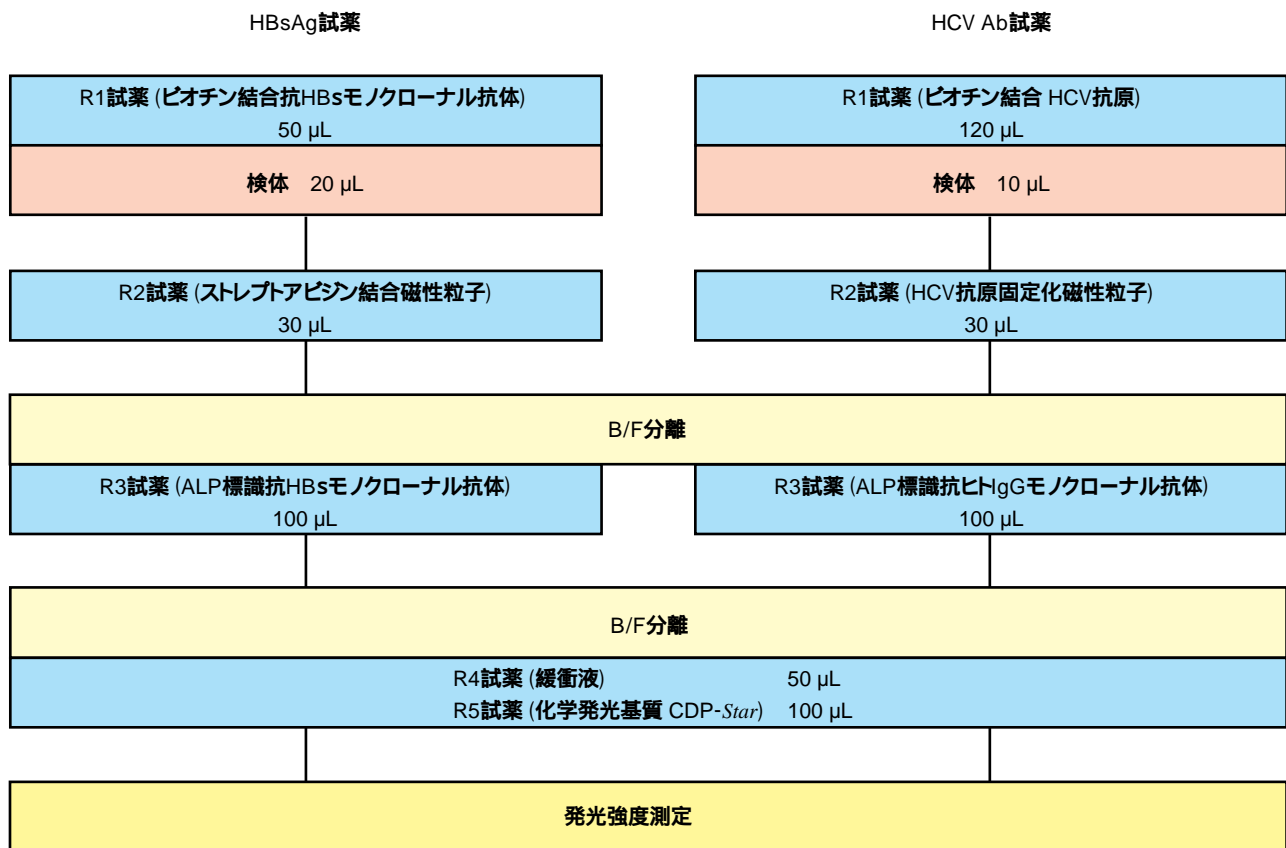


図5 . 反応フロー

## 4. 検体量

HISCL 試薬の特長の一つは使用する検体が微量なことである。

HBsAg 試薬および甲状腺3項目 (TSH, FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub>) で使用する検体量を既存試薬と比較し、表2に示した。

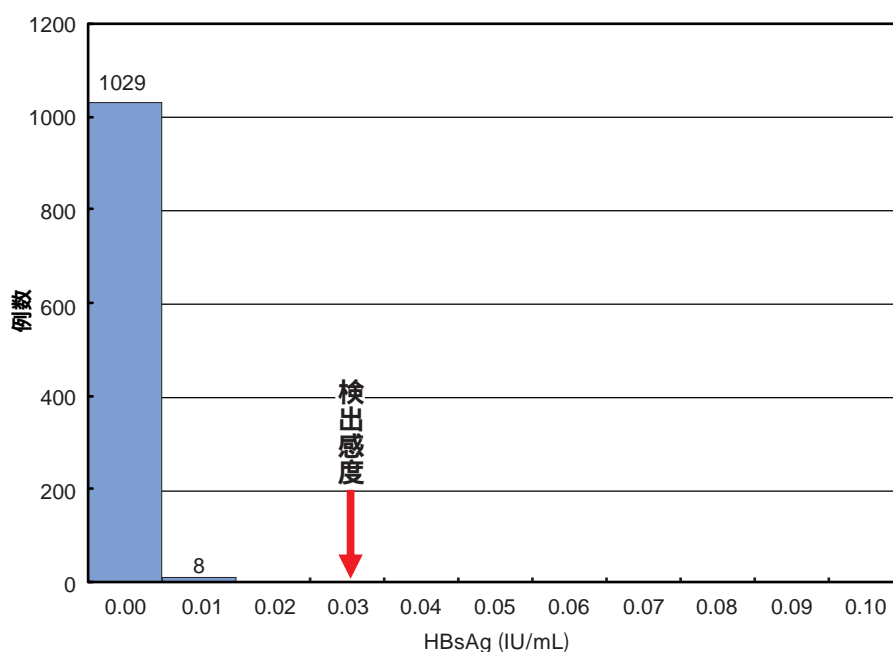
HBsAg では20 μL, 甲状腺3項目では合計で50 μLと既存試薬に比べて微量である。

## 5. 高感度

HBsAg 試薬は図6の陰性分布に見られるように0.03 IU/mLからの検出が可能である。したがって、感染初期においてより早く検出できるものと考えられる(表3)。

表2. 検体量

項目		HISCL	A社	B社	C社
HBsAg		20μL	100μL	70μL	140μL
甲状腺3項目合計		50μL	160μL	170μL	363μL
項目別	TSH	30μL	70μL	100μL	178μL
	FT <sub>3</sub>	10μL	20μL	45μL	55μL
	FT <sub>4</sub>	10μL	70μL	25μL	130μL



(見手倉 他. 日本臨床検査自動化学会誌 2008 ; 33(1), 64<sup>1)</sup>より引用)

図6. HISCL HBsAg 試薬 陰性分布 (n=1,037)

表3 . セロコンバージョンパネル測定結果

No.	検体	Day	HISCL		A社		B社		PCR 判定
			IU/mL	判定	IU/mL	判定	C.O.I.	判定	
1	PHM931-01	0	0.00	-	0.01	-	0.2	-	-
2	PHM931-02	5	0.00	-	0.01	-	0.3	-	-
3	PHM931-03	12	0.02	-	0.03	-	0.5	-	+
4	PHM931-04	14	0.03	+	0.03	-	0.6	-	+
5	PHM931-05	19	0.08	+	0.09	+	1.2	+	+
6	PHM931-06	21	0.15	+	0.36	+	2.0	+	+
7	PHM931-07	26	0.64	+	0.66	+	9.2	+	+
8	PHM931-08	28	1.24	+	1.21	+	18.2	+	+

(川崎医科大学, 自治医科大学附属さいたま医療センター評価データより引用)

注) HISCL 0.03 IU/mL 以上 陽性  
 A社 0.05 IU/mL 以上 陽性  
 B社 1.0 C.O.I. 以上 陽性

## おわりに

免疫反応を利用した検査は、高感度で短時間の測定が要望されており、検出系に化学発光を利用することにより、性能の向上が図られてきた。HISCL 試薬は、微量検体で高感度にしかもすべての項目が約17分という短時間で測定可能であり、日常検査において有用性があるものとする。

## 参考文献

- 1) 見手倉久治 他. 化学発光基質を用いた短時間で高感度な感染症マーカー測定試薬の評価. 日本臨床検査自動化学会会誌. 2008; 33 (1) : 64-68.