

# TBA（総胆汁酸）測定用動物用定量免疫測定試薬 「富士ドライケムIMMUNO AUカートリッジv-TBA」の開発

知久 浩之\*, 中村 和浩\*, 笠置 典之\*, 中村 健太郎\*

## Development of the Quantitative Immunoassay Reagent for Measuring TBA (Total Bile Acid) Levels in Dog and Cat “FUJI DRI-CHEM IMMUNO AU Cartridge v-TBA”

Hiroyuki CHIKU\*, Kazuhiro NAKAMURA\*, Noriyuki KASAGI\*, and Kentaro NAKAMURA\*

### Abstract

We have successfully developed and commercialized the “FUJI DRI-CHEM IMMUNO AU Cartridge v-TBA”, which is a quantitative immunoassay system for measuring total bile acid levels in dog and cat serum and plasma. This reaction system allows the simultaneous measurement of three bile acids and has been successfully used to diagnose hepatobiliary disease with high accuracy in these animals.

### 1. はじめに

近年の獣医学の発達は、ペットの平均寿命を大きく延ばすことに成功した。一方で、ペットの高齢化により発生しやすくなる疾患も存在する。例えば、イヌの肝・胆道系疾患は、人間の肝疾患の場合と同様の傾向が見られ、人間の年齢で30代半ばに相当すると言われる4歳から5歳以降で顕著に増加している。イヌの肝臓や胆嚢の病気は、先天的な奇形や体質、ウイルスや細菌による感染、有害物質の摂取や偏った食事など、さまざまな原因で発症する。肝臓は、人間でも「物言わぬ臓器」と言われているが、犬の場合も同様で、外見からは体調の異常に気づきにくいのが特徴である。そのため、血液検査、レントゲン検査、エコー検査などの健康診断を行うことが重要である<sup>1)</sup>。

肝疾患を疑う場合の血液検査は、一次パネルとしてアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) の4つの肝酵素の上昇をみる場合が多い。ただし、肝酵素は肝機能を反映していないので、血液検査である程度肝機能を評価することのできる二次パネル（肝機能検査）項目を検査する。二次パネル項目としては、総胆汁酸 (Total bile acid 以下、TBA)、ビリルビン、アンモニア、アルブミン、コレステロール、

尿素窒素などがある。その中でTBAは、現状ではイヌやネコで最も感度・特異性に優れた肝機能検査項目である<sup>2)</sup>。

一般的に、抗体を用いた免疫反応を利用してホルモンなどの抗原を測定する免疫測定方法は、2種類ある。分子量が数万Daの抗原（蛋白質など）の場合、二つの抗体で挟みこむことによって測定する「サンドイッチ法」を行い、分子量が1000以下で抗体で挟み込むことができない抗原（胆汁酸などの低分子）の場合には、抗原の標識体と検体中の抗原とで免疫反応を競合させる「競合法」で行う。

弊社ではこれまでにこれら両方の原理で測定可能な動物用免疫反応測定装置「富士ドライケムIMMUNO AU10V」と専用測定試薬「富士ドライケムIMMUNO AUカートリッジv-T4, vc-TSH, v-COR」を開発し、報告した<sup>3) 4)</sup>。本システムでは、標識として用いる蛍光粒子の検出原理として表面プラズモン増強蛍光法 (SPF法) を採用した。従来使用されている落射蛍光法では、上面からのレーザー光が免疫反応で結合していない蛍光粒子も光らせてしまうため、未反応蛍光粒子を除去するために洗浄が必要であった。SPF法の場合、蛍光粒子が結合した金属薄膜に対して、下面から入射角度を調節したレーザー光を照射し、表面プラズモン共鳴 (SPR) による近接場光を発生させることで、金属薄膜表面に結合した蛍光粒子のみが発光する (Fig. 1)。洗浄工程が不要のため測定時間は約10分と短時間であり、洗浄液や排水設備も不要

本誌投稿論文 (受理2016年12月5日)

\*富士フィルム (株) R & D 統括本部

医薬品・ヘルスケア研究所

〒258-8577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577

\*Pharmaceutical & Healthcare Research Laboratories  
Research & Development Management Headquarters  
FUJIFILM Corporation

Ushijima, Kaisei-Machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa  
258-8577, Japan

であるため、測定装置の小型化が実現できた。また、検体、カートリッジ、消耗品を装置にセットし、スタートボタンを押すだけの簡単操作も特長である (Fig 2)。

今回、新たに胆汁酸の迅速・簡便な測定を可能にした競合法を用いた試薬「富士ドライケム IMMUNO AU カートリッジ v-TBA」(以下、FDC v-TBA)を開発した。本報告では、FDC v-TBAの技術概要および臨床性能について述べる。

## 2. 競合法を使用した FDC v-TBA の開発

### 2.1 血中 TBA 測定 の意義

胆汁酸は、肝臓でコレステロールから生合成されるステロイド誘導体で、コラン酸骨格を持つ化合物の総称である。そのため胆汁酸は、その合計量を TBA 濃度として測定される。生理的な役割としては、脂肪の消化吸収および脂溶性ビタミンの吸収に関与している。

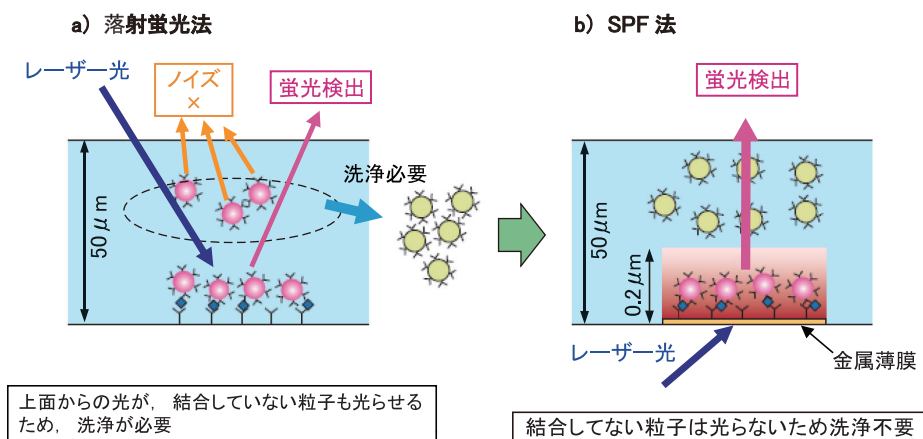


Fig. 1 Schematic representation of a) the epifluorescence method and b) the SPF method

動物用免疫反応測定装置  
富士ドライケム  
IMMUNO AU10V



TBA(総胆汁酸)測定用  
富士ドライケム IMMUNO AU  
カートリッジ v-TBA



### [測定方法]



Fig. 2 Quantitative immunoassay system for measuring TBA levels in dog and cat serum and plasma

肝臓で合成された胆汁酸は、胆汁として胆嚢で濃縮され、十二指腸内に放出される。その後、腸管から門脈に効率よく吸収され、肝臓に取り込まれて再分泌される。このように胆汁酸は、極めて閉鎖的な腸肝循環を行っている (Fig. 3)。このため正常では、血中の胆汁酸濃度は低値を示す<sup>5)</sup>。一方、胆汁中への分泌、肝臓に戻る門脈循環経路の障害、肝細胞への取り込み障害がある場合は、胆汁酸が全身循環系に流入するため、血中の胆汁酸濃度は高値を示す<sup>6)</sup>。

門脈循環経路の障害として、門脈体循環シャント (Portosystemic shunt 以下, PSS) がある。PSSでは、門脈

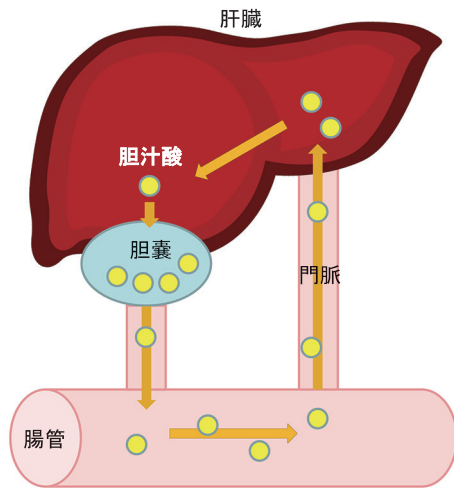


Fig. 3 Enterohepatic circulation of bile acids

から体循環へのシャント血管の存在により、門脈血が全身循環系に流入してしまう。この時、腸管から吸収された神経毒性物質が肝臓での解毒を介さずに末梢循環や脳循環に直接流入し、意識障害などが生じることもあり、問題である。また、腸管から再吸収した胆汁酸も直接全身循環系に流入するため、血中胆汁酸はかなりの高値を示す<sup>5)</sup>。以上のことから、血中TBA測定は肝・胆道系疾患の診断に有用である。

## 2.2 FDC v-TBAの測定原理

競合法のFDC v-TBA測定は次のように行われる (Fig. 4)。

- (1) 検体が反応カップ①に分注される。すると、検体中の胆汁酸結合蛋白質と解離剤が溶解しながら反応し、フリーの胆汁酸が生成される (Step1)。
- (2) 反応カップ①の反応液が反応カップ②に分注され、抗胆汁酸モノクローナル抗体で標識した蛍光粒子 (以下、蛍光粒子標識抗胆汁酸抗体) が検体中の胆汁酸と反応する (Step2)。このとき検体中の胆汁酸濃度に比例して蛍光粒子上の抗体への胆汁酸結合量が増えるため、抗体の結合サイトが減少する。
- (3) 反応液が免疫反応流路内に送液される。免疫反応流路内に設けられた金薄膜上には胆汁酸標識ウシ血清アルブミン (以下、胆汁酸-BSA) が固定化されており、胆汁酸結合量に反比例して金薄膜に蛍光粒子標識抗胆汁酸抗体が捕捉される (Step3)。SPF法により得られた蛍光量をもとに、装置が自動的に胆汁酸濃度に変換し、測定結果が得られる。

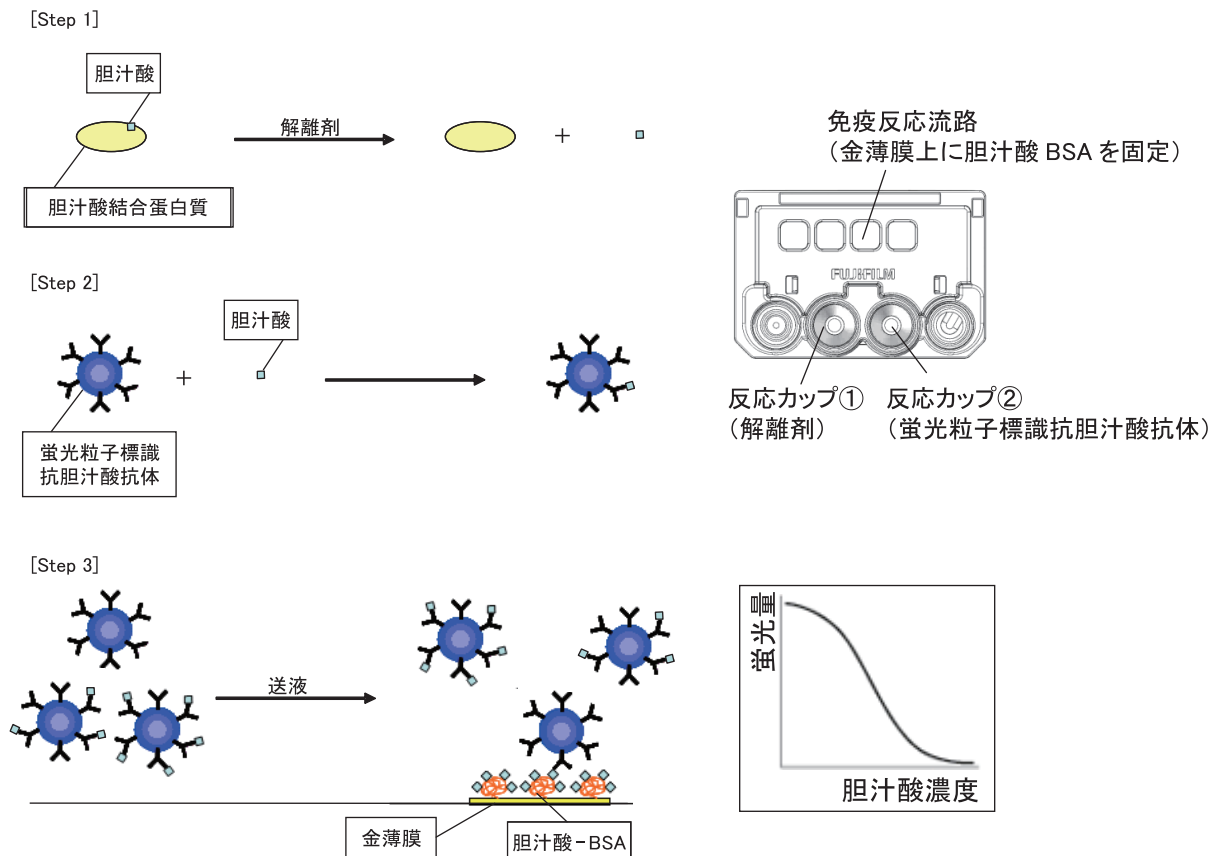


Fig. 4 Principles underlying the measurement of TBA levels in dog and cat serum and plasma using FDC v-TBA

### 2.3 反応系開発のポイント：3種類の胆汁酸の測定

イヌ、ネコの主な胆汁酸は、コール酸 (CA)、ケノデオキシコール酸 (CDCA)、デオキシコール酸 (DCA) のタウリン抱合体 (TCA, TCDCA, TDCA) であることが知られている<sup>7)</sup>。よって、本試薬ではこの3種類の胆汁酸を同時に測定し、その合計量を算出する必要がある。

1種類の抗胆汁酸抗体と1種類の胆汁酸-BSAを用いる場合、胆汁酸の種類によって抗体との反応性が変わってしまうため、動物専門検査センターで使用されている酵素サイクリ

ング法に対して、測定値の乖離が見られた。

今回、3種類の胆汁酸TCA, TCDCA, TDCA に反応する3種類の抗胆汁酸抗体 (抗CA抗体, 抗CDCA抗体, 抗DCA抗体) と3種類の胆汁酸-BSA (CA-BSA, CDCA-BSA, DCA-BSA) を用いることで、酵素サイクリング法と同等の検査結果を示すことが確認でき、3種類の胆汁酸の同時測定を実現した (Fig. 5)。

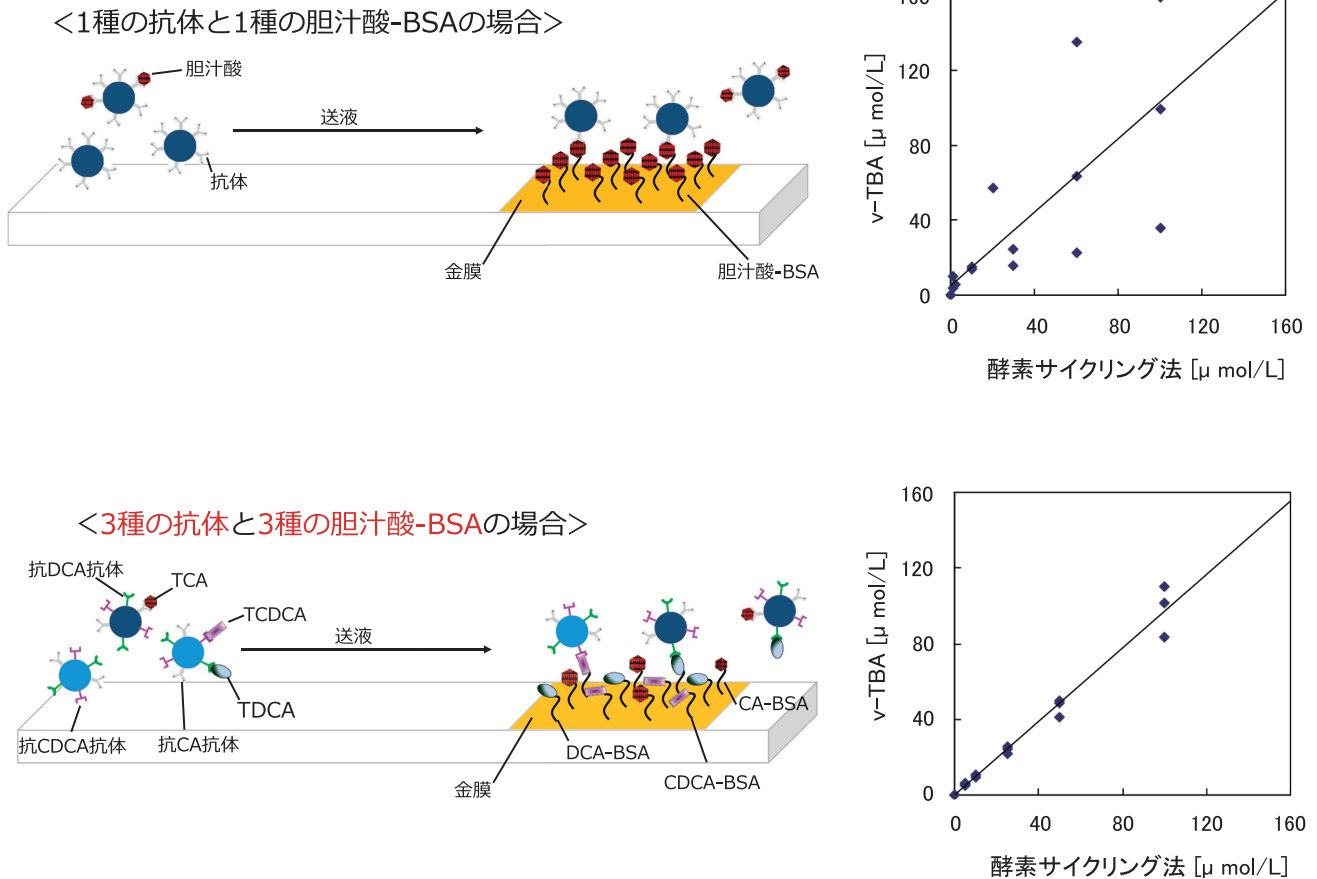


Fig. 5 Effects of three types of anti-bile acid antibodies and bile acid-BSA conjugates

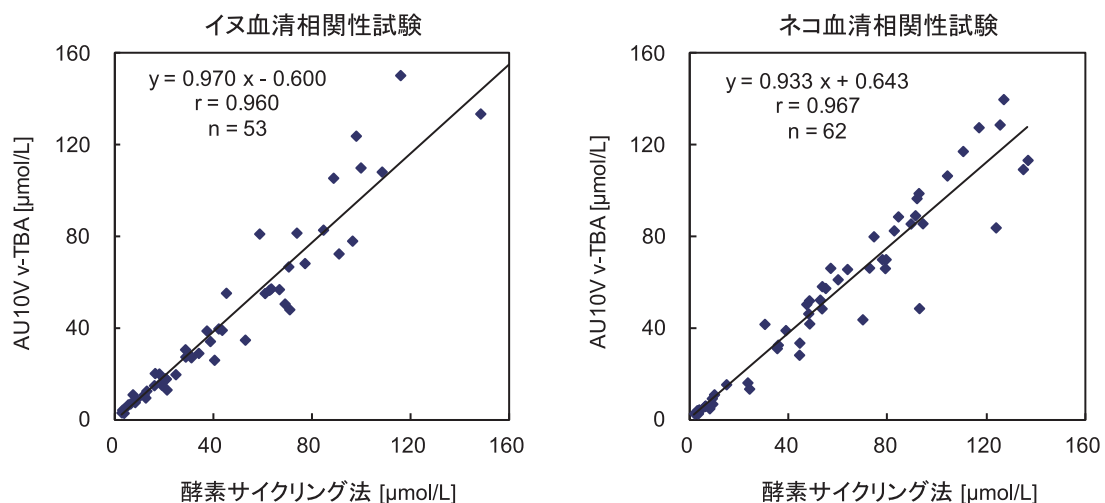


Fig. 6 Correlation between the enzymatic cycling method and FDC v-TBA (left: dog serum; right: cat serum)

## 2.4 臨床性能

### 2.4.1 相関性の確認

今回開発したFDC v-TBAの有効性を検証する目的で、動物専門検査センターで使用されている酵素サイクリング法を対照法としてイヌ、ネコ血清での相関性を確認した。

FDC v-TBAは酵素サイクリング法に対し相関係数(r)は、イヌ血清では $r=0.960$ 、ネコ血清では $r=0.967$ とイヌ血清・ネコ血清共に良好な相関性を示した。また、回帰直線( $y=ax+b$ ;  $x$ : 酵素サイクリング法,  $y$ : FDC v-TBA)の傾き(a)・切片(b)は、イヌ血清では $a=0.970$ ,  $b=-0.600$ 、ネコ血清では $a=0.933$ ,  $b=0.643$ であり、FDC v-TBAは、イヌ血清・ネコ血清共に酵素サイクリング法と同等のTBA測定値を示すことを確認した (Fig. 6)。この結果は、これまで実施されていた外注検査と同等の精度の検査を院内で実施できることを示している。

### 2.4.2 同時再現性の確認

同一サンプルをFDC v-TBAで繰返し測定した場合の同時再現性の確認を行った。TBA濃度の異なる3つの検査液を用い、それぞれ10回繰返し測定した結果をTable 1に示した。いずれの濃度レベルにおいてもばらつきの尺度である変動係数(CV)は3%以下であり、免疫測定試薬として十分高い再現性(定量性)を有することを確認した。

Table 1 Reproducibility of measurements obtained using FDC v-TBA

(単位:  $\mu\text{mol/L}$ )

TBA level	Low	Middle	High
1	9.7	34.5	95.6
2	10.5	35.9	101.0
3	9.9	34.9	100.0
4	9.8	34.4	96.2
5	10.2	35.2	98.4
6	9.8	35.0	98.7
7	10.4	36.0	98.2
8	10.0	34.4	101.2
9	9.8	34.9	95.7
10	10.3	35.7	97.9
Ave. ( $\mu\text{mol/L}$ )	10.0	35.1	98.3
SD. ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.3	0.6	2.0
CV. (%)	2.9	1.7	2.1

## 3. まとめ

今回、われわれは、動物用定量免疫測定試薬「富士ドライケムIMMUNO AUカートリッジv-TBA」を開発し、胆汁酸の迅速・簡便な診断法を完成させた。

技術面においては、3種類の胆汁酸を同時に測定する反応系を構築した。今後は、さらに測定項目の拡充を行うことで、動物病院施設内での簡単・迅速な検査を実現し、動物医療の質の向上に貢献していきたい。

## 4. 謝辞

本研究開発において、多くのご指導をいただきました。東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医内科学研究室 大野耕一准教授に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) アニコム損害保険株式会社.“5月18日～24日は肝臓週間 愛犬が5歳を過ぎたら肝臓疾患にご用心”. [http://www.anicom-ompo.co.jp/company/news/news\\_090515.html](http://www.anicom-ompo.co.jp/company/news/news_090515.html)(参照 2016年11月4日)
- 2) 大野耕一. FUJIFILM MEDICAL SEMINAR 2016 POC検査を活用した迅速診断と治療セミナー シラバス. 富士フイルムメディカル株式会社, 2016, p.2-17.
- 3) 松野忠宏, 大原智也, 小野田歩, 中村健太郎, 木村俊仁, 小松明広. FUJIFILM Research & Development. 2014, no.59, p.13-18.
- 4) 知久浩之, 片田順一, 大原智也, 笠置典之, 和田淳彦, 中村健太郎. FUJIFILM Research & Development. 2015, no.60, p.33-38.
- 5) Torisu, S. Surgeon: technical magazine for veterinary surgeons. 2011, 15(4), p.20-31.
- 6) スモールアニマル・インターナルメディスン 上巻. Nelson, R. W.; Couto, C. G., eds. 長谷川篤彦, 辻本元監訳. 第4版, インターズー, 2011, p.548-550.
- 7) Washizu, T.; Ikenaga, H.; Washizu, M.; Ishida, T.; Tomoda, I.; Kaneko, J. Bile acid composition of dog and cat gallbladder bile. Japanese Journal of Veterinary Science. 1990, 52(2), p.423-425.

## 商標について

- ・「富士」「ドライケム」「FUJI」「DRI-CHEM」「DRI-CHEM IMMUNO」は、富士フイルム(株)の登録商標です。
- ・その他、本論文中で使われている会社名、システム・製品名は、一般に各社の商標または登録商標です。