

生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

医工連携による免疫診断薬の開発(肝疾患における CRP の測定)

神野英毅 (応用分子化学科) 小川真広 (日大・医)

天木秀一(日大・医) 荒川泰行 (日大・医)

1. はじめに

臨床検査に用いられている C-反応性タンパク (CRP) は、通常正常ヒト血清中でも微量(平均 580ng/ml)に存在し、炎症性疾患や組織の変性・壊死が生じると急激に CRP 血中濃度が上昇し、病状の回復に伴い速やかに減少する特徴をもつ。そのため、急性期タンパクの代表的な検査の一つであり、細菌感染、組織損傷などが原因で上昇する炎症マーカーとしてその測定は広く臨床的に利用されている¹⁾。従来法の CRP 測定は、急性炎症時における通常時から的大幅な濃度上昇を測定していたため、感度に優れた測定法はあまり必要とされなかった。しかし、近年ラテックス凝集法などの高感度 CRP 測定法の開発により、CRP 濃度を低濃度域で精密に測定することが、心筋梗塞や新生児感染症の予知マーカーなどのさまざまな疾患との関係性も注目されはじめた²⁾。したがって、高感度ラテックス試薬に対する需要が今後増すことが予想され、また、さらなる高感度化を行うことにより新規な臨床的意義の発見が期待できる。

2. 目的

CRP の測定は、操作が簡便で迅速性に優れた Latex Photometric Immunoassay (LIPA 法) を用いて行った。この方法は、試薬と検体を混合するのみである Homogeneous immunoassay である。ラテックス試薬と血清を混合することにより抗原抗体反応が生じ、ラテックス試薬が凝集する。

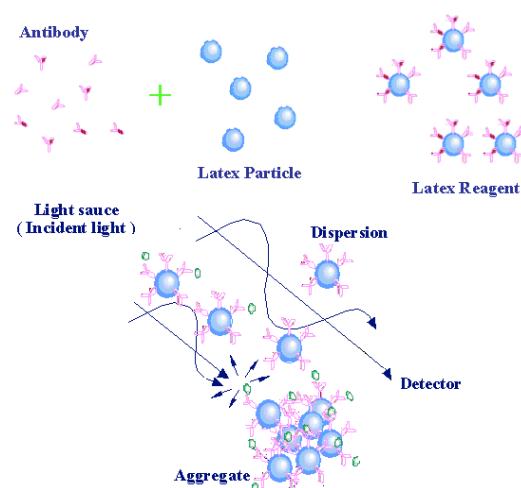


Fig. 1. Principle of latex photometric immunoassay using near infrared nephelometry

その凝集の度合いを光学装置にて濁度測定することにより、血中の濃度の測定が可能となる。

本研究はラテックス試薬の製法、主にアミノ酸をスペーサーとして修飾したラテックスを用いてラテックス試薬を作製して比較検討し高感度化した。さらにその中のグリシンをスペーサーとしたラテックス試薬で正常者、患者血清(加齢黄斑変性症・肝炎)で実際測定し比較検討した。

3. 実験方法

3-1. 実験材料

ラテックス試薬の用いたラテックス粒子は、Carboxyethylene-Modified polystyrene G1225 粒子径 $0.252\mu\text{m}$ (JSR 株式会社)、抗 CRP 抗体はイムノプローブ社製 抗 CRP ウサギポリクローナル抗体を使用した。また、ラテックス試薬の反応性の検討・検量線には、CRP 抗原は Dako Cytomation の Human Serum C-reactive Protein High Control を用いた。Fig. 2 に本研究に用いた抗 CRP 抗体と

CRP (Dako) のウエスタンブロットを示した。

臨床試験で用いた健常者の血清は、ボランティア 50 名、肝疾患患者血清は、2005 年 4 月から駿河台日本大学病院において治療中の患者 450 名を対象とした。眼科領域における加齢性黄斑変性症患者の血清は、慈恵大学にて治療中の患者 32 名を対象とした。

上記に記した以外の試薬は、和光純薬工業株式会社の特級試薬もしくはそれと同等の試薬を用いた。

3-2. amino acid spacer によるラテックス試薬の作製

1%カルボキシル基修飾ラテックス懸濁液にWSC(Water soluble carbodiimide) 溶液と NHS (N-Hydroxysuccinimide) 溶液を攪拌しながら順に加え、25℃で 30 分攪拌しラテックス表面のカルボキシル基を活性化させた。活性化後 pH6.5, 0.05 M MES 緩衝液で洗浄し、その後に MES 緩衝液で 1.33×10^{-4} mol/ml に調製した各スペーサー分子グリシンを加え 37℃で 1 時間攪拌し結合させた。再び、WSC 溶液と NHS 溶液を順に加え攪拌し、スペーサー分子のカルボキシル基を活性化させた。攪拌後遠心分離し、上澄みと沈殿に分けた。沈殿は MES 緩衝液で洗浄した。これに濃度調整した抗 CRP 抗体溶液を加え、310 K で 30 分攪拌し結合させた。結合後遠心分離し、上澄みと沈殿に分けた。上澄みは後の操作でラテックスへの抗 CRP 抗体結合量の定量に使用した。沈殿は同じ MES 緩衝液 2 ml に懸濁し、粒子洗浄のため一回結合後遠心分離した。遠心分離後同じ MES 緩衝液 1ml に懸濁し、変性 BSA を 1ml 加え 298K で 30 分攪拌し、ラテックス粒子表面の抗 CRP 抗体未結合部位のブロックを行った。ブロック後、pH 8.2, 0.1 M Tris-HCl 緩衝液に懸濁し未反応活性化カルボキシル基を加水分解した。加水分解後粒子洗浄のため同じ Tris-HCl 緩衝液に懸濁

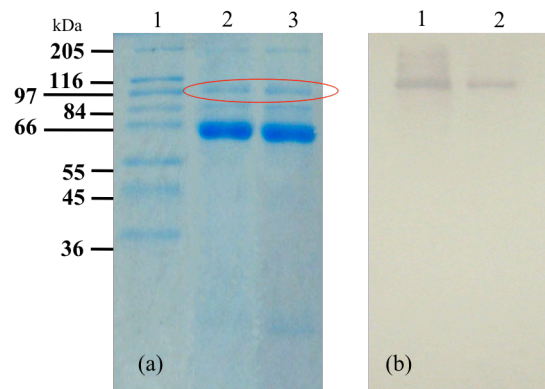


Fig. 2. SDS-PAGE analysis and its Western immunoblotting of human serum and CRP(high control CRP, Dako, Denmark).

(a) Human serum proteins were electrophoresed in a 12.5% gel under reducing condition. Protein bands were visualized with brilliant blue. Lane 1; molecular weight, lane 2; CRP(Dako, 5ng/ml), lane 3; Human serum (60-fold). The numbers to the left indicate molecular weight of size markers.

(b) Human serum and CRP was subjected to SDS-PAGE in under 12.5%gel reducing conditions and then transferred to nylon membranes. Lane 1; CRP (Dako), lane 2; Human serum. CRP was stained with goat IgG which was conjugated with alkali

して二回遠心分離した。最終的に Tris-HCl 緩衝液 2 ml に懸濁したものを抗 CRP 抗体化学結合ラテックス試薬とした。

3-3. ラテックス試薬の評価

作製したラテックス試薬を CRP と反応させ、近赤外比濁法 (LPIA 法) でその凝集反応速度を測定した。測定には全自動免疫血清検査システム LPIA-200 を用いた。測定キュベット内に、抗原 CRP 標準液 $30 \mu\text{l}$ 、反応緩衝液 $230 \mu\text{l}$ 、ラテックス試薬 $40 \mu\text{l}$ を分注し、12 秒毎に 10 分間波長 950 nm の吸光度変化を測定し、スペーサーの異なる感作ラテックス試薬の平均反応速度から検量線を作

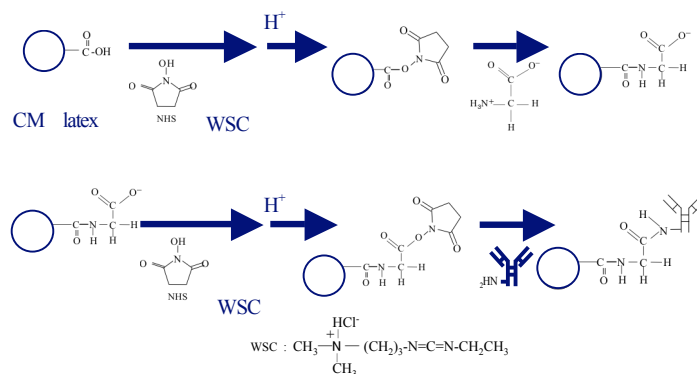


Fig. 3. Conjugation of an antibody to Carboxyl Modified (CM) latex by carbodiimide

成した。それをもとに CRP 定量と検出限界を測定し高感度化を検討した

3-4. 臨床的意義の評価

臨床的意義については、日本大学医学部駿河台病院との共同研究により供与された正常者・肝疾患患者から採血した血清を用い、上記と同様の方法で測定をした。また、CRP が高濃度の患者血清は BSA (1%) を含んだリン酸緩衝生理食塩水にて適宜希釈を行った。この測定結果から正常者と疾患患者の CRP 値を臨床データも含め検討し、微量定量の臨床的意義を検討した。

4. 結果・考察

4-1. ラテックス試薬作製における抗体結合法の検討

Fig. 4 に従来から方法である carbodiimide 法により抗体の結合したラテックス試薬 (スぺーサーなし)、抗体の結合に Protein A を用いたラテックス試薬 (Protein A スぺーサー)、ラテックス粒子と抗体の間にアミノ酸を結合させた Amino acid spacer による新規 CRP 抗体固定化方法により作製したラテックス試薬の反応性を示した。低濃度領域では従来の方法と比較して 5 倍高感度なものとなった。アミノ酸の様なスぺーサー分子を介して抗体を結合させることにより、抗体抗体間にゆとりが生まれるため CRP との反応性が向上したと考えられる。

4-2. Amino acid spacer の検討

アミノ酸 20 種と合成したペプチド(グリシンを 5 つ結合 : Gly5) をスぺーサー分子としてそれぞれ作製した試薬の反応性の結果を Fig. 5 に示す。反応性が良い順に Gly5、Arg、Gln、Met、Thr、His、Cys、Trp、Glu、Ile、Lys、Gly、Asp、Asn、Phe、Pro、Tyr、Ala、Leu、Ser、Val となった。ほとんどアミノ酸で緩やかなカーブの反応になったが、Gly5 と Arg だけ直線的な反応線が示された。また再現性により、安定した測定が可能な最低 CRP 濃度は 10 ng/ml であった。

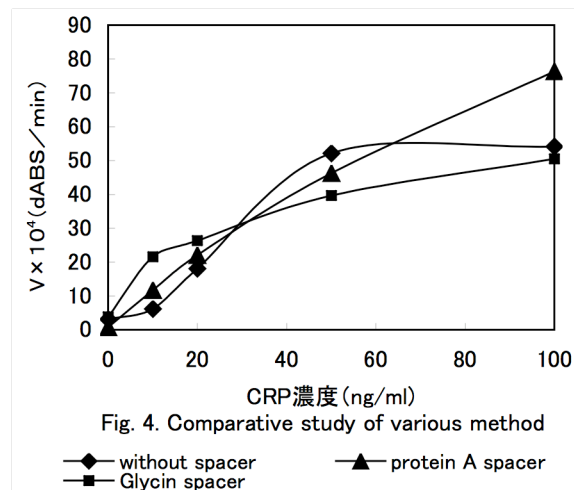


Fig. 4. Comparative study of various method

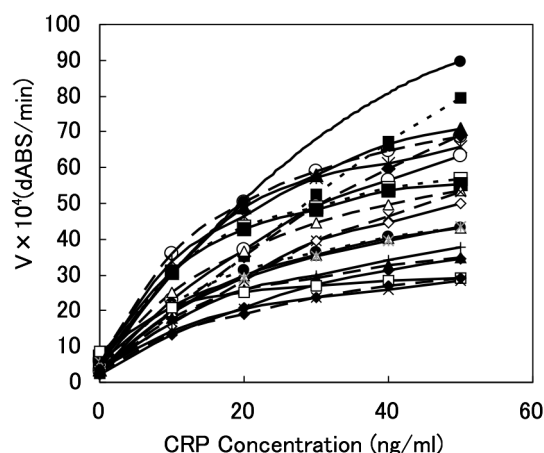


Fig. 5. Comparative study of various amino acid spacers

本研究で使用したアミノ酸はすべて α -アミノ酸であり、ペプチド結合形成に必要なアミノ基とカルボキシル基の位置はすべて同じである。よって、スぺーサーの長さ(ラテックス粒子と抗体間の距離)はアミノ酸の種類に関係なくすべて同じになる。しかし、Gly5 は、他のアミノ酸と比較し、5 倍の長さのスぺーサーの長さがある。また、Arg に関しても Gly5 と同様に、他のアミノ酸よりもラテックス粒子と抗体の間に距離生じる。これより、スぺーサーの長さ(ラテックス粒子と抗体の間)にはある一定の距離があるほうがより高感度な測定が出来ることが示唆された。また、アミノ酸の側鎖が直鎖状に近く、構造がシンプルなアミノ酸の方がより直線に近い反応が得られた。さらに同じ

α -アミノ酸においても差が生じ、脂肪族アミノ酸より塩基性や含硫のアミノ酸の方が反応性が良好であった。よってグラフの直線性及び反応性の差は、アミノ酸の側鎖における疎水性・親水性・立体構造等の分子構造に起因していると示唆される。

4-3. 正常者、加齢性黄斑変性症疾患患者、肝疾患患者におけるCRP 定量の臨床的意義の検討

我々のラテックス試薬でCRP は、どのように反映するかということで、加齢黄斑変性症といった炎症性を持つ、眼の網膜の疾患検体でCRP を測定した。Fig. 7 から検体数 32 で平均値 867ng/ml、最高値 2694 ng/ml、最低値 327 ng/ml と、正常者CRP 血中濃度 (Fig. 6) と比較し、400ng/ml 程度CRP 濃度が高いことがわかりました。CRP の生物学的活性は十分解明されていないが、T リンパ球に結合し組織を抑制することが報告されていることなどから、CRP が加齢の進むにしたがって増加する傾向がみられるのは免疫能に関与していることを示唆するものである。

Fig. 8 に肝疾患患者で測定を行い、血中CRP 濃度を示した。これは日本大学医学部駿河台病院との共同研究での例で平均値は 1254ng/ml、最高値は 14419 ng/ml、最低値は 324 ng/ml でした。肝臓疾患ではCRP は肝臓で生産されるため、CRP 産生能の低下が示唆されている。しかし、高感度測定できる本CRP 濃度測定により、疾患によるこのような高い値のCRP が確認された。このデータから言えることは、肝臓疾患がある人にも肝臓の炎症からCRP が産生されていると考える。このことは新しいCRP 測定の臨床的意義として、肝疾患患者における合併症や治療経過観察に利用できるのではと考えられる。

【参考文献】

- 1) 福岡良男ら：臨床免疫学，医薬出版（1997）
- 2) 高橋伯夫：臨床病理，高感度CRP 測定法の病態診断的有用性 50，30-39（2002）

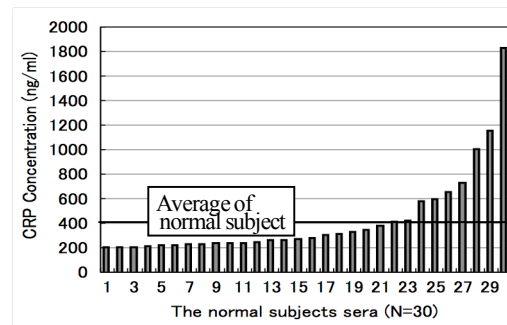


Fig. 6. CRP concentration of normal subjects
The CRP level of the normal subjects showed averaged value of 422ng/ml (max. 1825ng/ml, min. 199ng/ml).

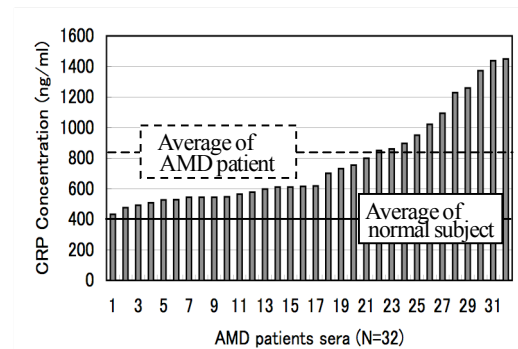


Fig. 7. Patients of Age related Macular Degeneration
The CRP level of AMD patients showed averaged value of 867ng/ml. (max. 2694ng/ml, min. 327ng/ml)

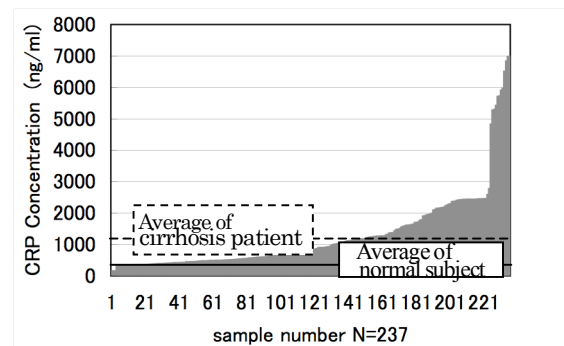


Fig. 8. CRP concentration of liver cirrhosis group
The CRP level of the cirrhotics of the liver patients showed average 1056 ng/ml. (Max. 6992 ng/ml, min. 157ng/ml)