

Latex 凝集法を用いた脂質抗体の定量とその臨床的意義

神野英毅(応用分子化学科)

小川眞広(日大・医)

荒川泰行(日大・医)

1. はじめに

抗リン脂質抗体は、Wassermannが1906年補体結合反応により梅毒患者血清中にレアギン(抗カルジオリピン抗体)を検出することから発見された¹⁾。梅毒の病原体である*Treponema pallidum* が生体内に感染すると、病原体に対する抗体とともにリン脂質と反応性を持つレアギンが産生される。そのレアギンはカルジオリピン-レシチン抗原に反応する。その反応を利用した梅毒血清反応検査 (Serologic Test for Syphilis : STS、Wassermann反応) の普及に伴い、梅毒の患者血清以外にもしばしば最近やウイルス感染患者、自己免疫疾患の代表である全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus:SLE) 患者などがSTS反応陽性を示すため(生物学的擬陽性)を示すことから血清中に抗カルジオリピン抗体(aCL)が存在することが明らかとなった。また、慢性的に梅毒擬陽性を示す患者血漿中に、*in vitro*のリン脂質依存性凝固反応を抑制する物質の存在が確認され、その原因は、抗リン脂質抗体であることがわかった²⁾。

近年、抗リン脂質抗体は、血栓症や習慣性流産などと密接に関連していることが判明し、これらの自己抗体と特有の病態を示す症例は抗リン脂質抗体症候群 APS と呼ばれている。

この抗リン脂質抗体はそれらの病態に応じて増減することが知られているため、抗リン脂質抗体を高感度に測定することが臨床的に重要となる。

本研究では、 β 2-Glycoprotein I に依存しない抗リン脂質抗体(抗カルジオリピン抗体)を測定するラテックスの作製を行った。現在、市販されている STS のラテックス試

薬はランリーム STS(シスメックス株式会社)、イムノティクルス オート 3 RPR (株式会社エイアンドテイー)、メディエース RPR (積水化学工業株式会社)がある。我々が開発した脂質感作 Latex の反応性と、その検査薬としての新規な臨床的意義を見出すため炎症性疾患の一種である眼科領域における黄斑部変性症について検討した。

2. 実験材料と方法

2-1. 測定原理

Latex 試薬は、ポリスチレン製ラテックス粒子に抗原(リン脂質抗原)を固定化することにより作製されている。その Latex 試薬はリン脂質抗体を含む血清と混合攪拌されることにより、ラテックス粒子上の抗原と血清中の抗体が結合し、その結果ラテックス粒子の凝集が観察される。この凝集の程度を LPIA-200 での濁度測定を行うことにより、あらかじめ RPR 標準血清を用いて作成した検量線から検体中のリン脂質抗体を定量する。

ラテックス凝集塊と透過光の関係は、ラテックス粒子が分散状態にある場合、粒子径よ

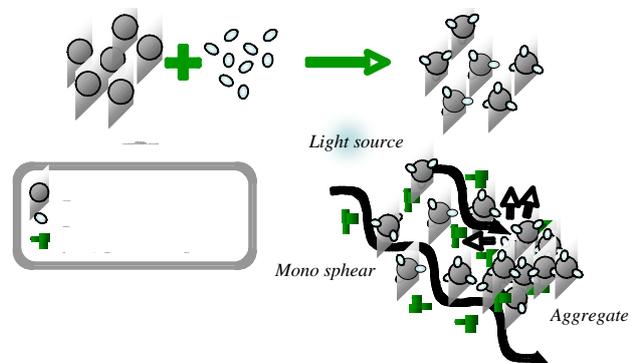


Fig. 1. Principle of latex photometric immunoassay using near infrared nephelometry

り大きい波長の光はラテックス粒子に影響されず透過する。ラテックス粒子が凝集した場合、見かけ上大きな粒子径の粒子を形成し、光の波長に近づくと光は散光となり、その結果透過光が減少し、その減少量を photomalにて分光学的に定量する (Fig. 1)。

2-2. 材料

Latex 粒子は株式会社 JSR 製 Polystylen Latex Particle 粒子径 (0.308~1.120 μ m) を用いた。Cardiolipin は SIGMA、Lecithin は、追記がないかぎりナカライテスクの製品を用いた。

RPR 標準血清 (極東製薬工業株式会社)

ヒト血清成分をベースとした標準血清である。1 R.U.~8 R.U.までの 5 濃度あり、作製したリン脂質感作 Latex 試薬の反応性の検討に用いた。

臨床試験で用いた健常者の血清は、ボランティア 50 名、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。

2-3. LPIA-200 での測定

LPIA-200 での測定は、抗原 CRP 溶液 30 μ l に緩衝液 230 μ l を加え攪拌後、リン脂質感作ラテックス試薬が 40 μ l 添加される。攪拌後、波長 960 nm の吸光度変化を 12 秒毎に測定し、計 50 点が測定される。吸光度変化量および各抗原濃度での平均の反応速度から試薬の反応性の検討を行った。

2-4. 脂質感作 Latex 試薬の作製方法

Latex 粒子と脂質抗原エタノール溶液 (カルジオリピン、レシチン) を素早く混合し、アスピレーターを用いて溶媒を乾燥除去した。乾燥したラテックス粒子に BSA 溶液 (Tris-HCl Buffer, pH8.0) を加え、超音波を用いて Latex の再懸濁をした。その後、マグネチックスターラーで 30 分間攪拌をし、脂質抗原を Latex 粒子に吸着させた。遠心分

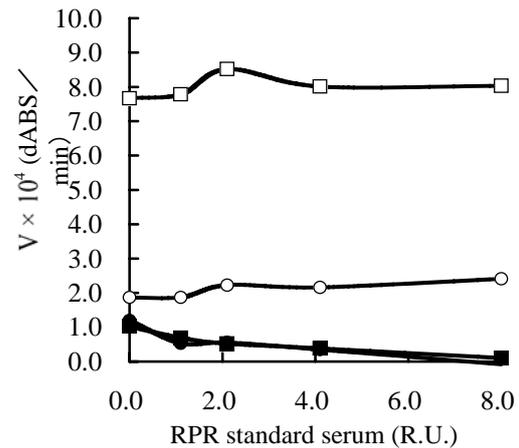


Fig. 2. Reaction of lecithin without cardiolipin

● Lecithin 0.0mg/ml ○ Lecithin 0.5mg/ml
■ Lecithin 1.0mg/ml □ Lecithin 1.5mg/ml

離器を用いて Latex 試薬を 10mM Phosphate Buffer (pH8.0) で 2 回洗浄し、同じ Buffer にて濃度の調製を行い、試薬を完成させた。

3. 結果と考察

3-1. 脂質抗原溶液中の Lecithin の至適濃度の検討

まず、Lecithin のみを感じさせた Latex 試薬を作製し、Lecithin の抗原性を検討した。脂質抗原溶液を Lecithin のみで 0.0~1.5mg/ml に調整し上記で述べた作製方法にしたがい Latex 試薬を作製した。作製した試薬を RPR 標準溶液と反応させ、その凝集速度を LPIA-200 にて測定した。その結果を Fig. 2. に示した。RPR 標準血清との反応性は Lecithin のみでは見られなく、また、高濃度の Lecithin の感作では、RPR のどの濃度においても高い反応速度が確認されたため、非特異的凝集が起こっていると考えられた。

次に、脂質抗原溶液に Cardiolipin を一定量 (0.2 mg/ml)、Lecithin を 0.0~1.5 mg/ml で変化させて調整し、Latex 試薬を作製した。作製した試薬の反応性を Fig. 3. に示した。Lecithin の濃度が高くなるに伴い、試薬の反応性の向上が見られた。最も反応性が高い Lecithin 濃度は 1.0~1.5mg/ml であったが、Fig. 2. の Lecithin 濃度が 1.5 mg/ml におい

て非特異凝集が確認されたことより、Lecithin は 1.0 mg/ml が至適濃度であるとわかった。また、Lecithin が 0.0mg/ml においてこの試薬に反応性が確認できなかったことから、Cardiolipin のみでの抗原性はないことが確認された。本測定目的の抗 Cardiolipin 抗体は、Cardiolipin と Lecithin の混合脂質（レアギン）に反応することがわかった。

3-2. 脂質抗原溶液中の Cardiolipin の至適濃度の検討

脂質感作溶液中の Cardiolipin の濃度を 0.1 ~ 0.6 mg/ml に調製して試薬を作製した。また、このときの Lecithin は 1.0mg/ml 含まれている。作製したラテックス試薬の反応性を Fig. 4 に示した。

Cardiolipin 濃度が 0.1, 0.15, 0.20mg/ml と高くなるに従い、反応性も向上が見られた。また 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mg/ml と Cardiolipin 濃度の減少にともない反応性は減少することがわかった。

Cardiolipin と Lecithin の至適濃度の検討によりこの脂質抗体との反応性は Cardiolipin が全脂質中に最大約 17%含まれているときに最も反応性が高いことがわかった。生体膜に存在する Cardiolipin 濃度は 10%以下である。高濃度のカルジオリピンの存在は、生体環境と大きく異なるため反応性に低下が見られたと考えられる。

3-3. ラテックス粒子径の検討

JSR 社製の粒径 0.31~1.12 μm の Latex 粒子を用い脂質感作 Latex 試薬を作製し、RPR 標準血清と反応させた。その結果を Fig.5 に示す。0.31 μm の Latex 粒子は RPR 標準血清の R.U.値が低濃度から高濃度まで比例的に反応することが確認できた。また、Latex の粒子が大きくなると高濃度側での反応上昇が見られず、さらに Latex 粒子が大きくなるにしたがい反応がされにくくなることを確認した。RPR 標準血清において陽性陰性のカットオフ値は 1.0 R.U.である。よって 1.0 R.U.が測定可能かどうか重要となる。粒径 0.31 μm の Latex では 1.0 R.U.の測定が不可

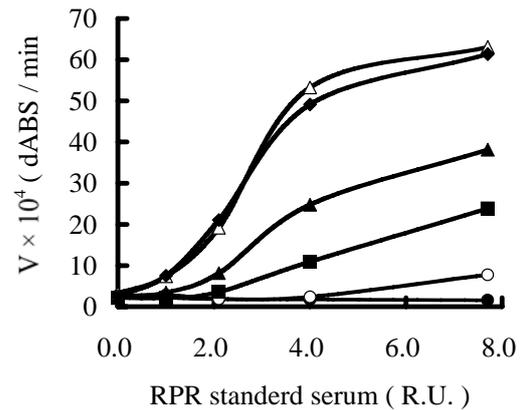


Fig. 3. Comparative study of various lecithin concentration

● 0.0 mg/ml ○ 0.25 mg/ml ■ 0.5 mg/ml
▲ 0.75 mg/ml △ 1.0 mg/ml ◆ 1.5 mg/ml

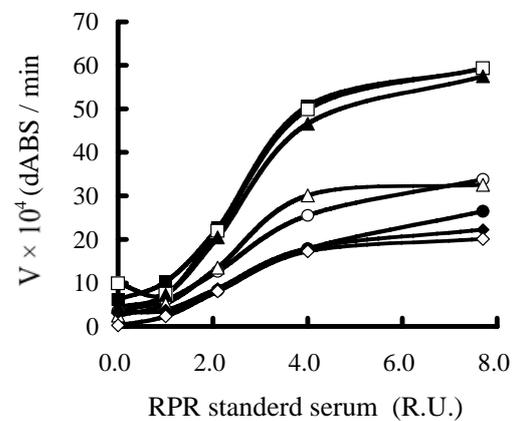


Fig. 4. Comparative study of various cardiolipin concentration

● 0.10 mg/ml ○ 0.15 mg/ml ■ 0.20 mg/ml
□ 0.25 mg/ml ▲ 0.30 mg/ml △ 0.40 mg/ml
◆ 0.50 mg/ml ◇ 0.60 mg/ml

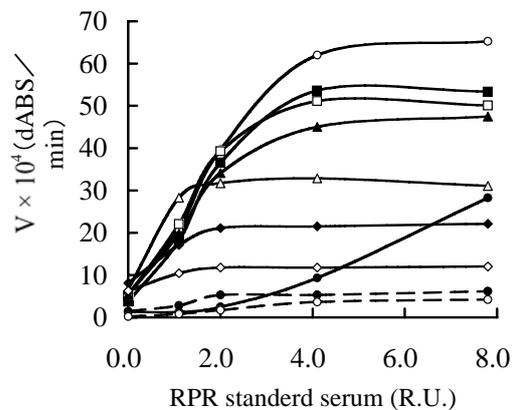


Fig. 5. Comparative study of various latex

● 0.31 μm ○ 0.45 μm ■ 0.46 μm □ 0.50 μm
▲ 0.59 μm △ 0.66 μm ◆ 0.72 μm ◇ 0.88 μm
● 1.09 μm ○ 1.12 μm

能であるため、この試薬を作製するためには、 $0.47\ \mu\text{m}$ の粒径が有用であることがわかった。

3-4. Lecithin の由来の検討

大豆由来と卵黄由来の Lecithin の比較をした。その結果、大豆由来より卵黄由来の Lecithinの方が反応性が高いことが分かった (Fig. 6)。これは、それぞれに含まれる Lecithinの組成が大豆由来ではホスファチジルセリンが、卵黄由来ではホスファチジルコリンが主成分であるためではないかと考えられる。よって、本試薬に用いる Lecithin は卵黄由来の Lecithin が有効であると言える。

3-5. Lecithin の種類の検討

3-4のLecithinの由来の検討より、Lecithinの種類によって反応性に違いが現れることがわかった。そこで、異なる構造のLecithinを用いて検討を行った。用いたLecithinは化学合成の飽和型の炭素鎖の異なる単一成分のレシチン (C12:0, C14:0, C16:0, C18:0)、不飽和を1つ持つLecithin (C18:1)、2種類のNative lecithinの7種である。その結果をFig. 7に示した。

飽和型と不飽和型を比較すると不飽和型のレシチンの方が良好な反応性を示した。これは、生体内のLecithinは不飽和型が多く存在していたためであり、化学合成LecithinよりNativeのレシチンの方が、高い反応性を示した結果からも考えられる。また、炭素数の違いにより反応性に大きな影響を与えることがわかった。最も反応性の高かった炭素数は14である。

これらより、脂質の抗原性は、細胞膜の外側形成する親水部の違いだけでなく、疎水部にも依存していることが示唆された。

参考文献

- 1) 鍋木 淳一 臨床検査 vol.48, no.3, pp.273-277
- 2) 武谷浩之、鈴木宏治、血液・腫瘍科, vol.37,no.(3),pp.231-239

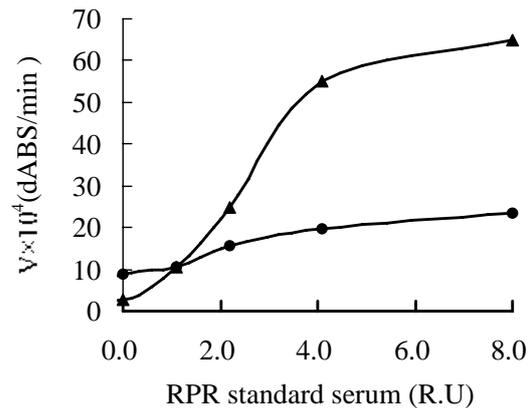


Fig. 6. Comparative study of lecithin sample

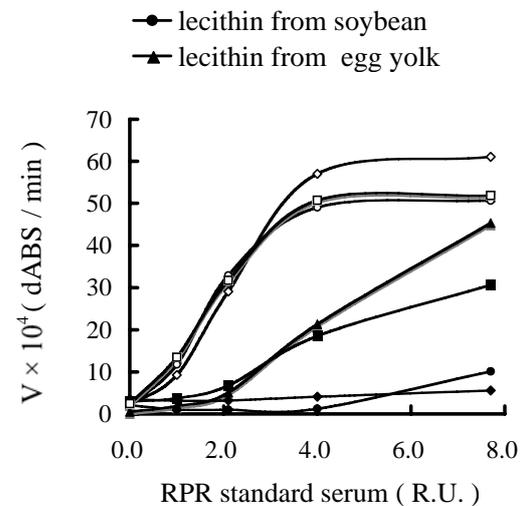


Fig. 7. Comparative study of various lecithin group

- C 12:0 ▲ C 14:0 ■ C 16:0
- ◆ C 18:0 ○ C 18:1 ◇ Native lipid ①
- Native lipid ②