

生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

高感度フロービーズアレイ法によるアディポサイトカインの迅速測定に関する研究

日大生産工 神野 英毅

日大医 小川 真広 天木 秀一 荒川 泰行

1. 緒言

現在臨床検査は広く日常的に行われており、中でも Latex 凝集反応をはじめとするイムノアッセイの占める割合は日毎に増加している。臨床検査の特性上、測定系には簡便さと共に迅速性が望まれる。しかしこれらの前提として、測定の正確性、精密性が必須であり、この精度を重視した技術が最も求められている。本研究は、第一グループの生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループの1.4. 抗原抗体免疫反応による生体情報の分析に関する研究を行い新規臨床検査薬法の開発を行った。平成 17,18 年度は、炎症マーカーである CRP の血清中の微量定量を目的とし、新規 Latex 試薬の開発を行い、肝疾患患者、糖尿病患者における測定の臨床的意義の研究を検討した。また、平成 19 年度はその方法を応用し D-Dimer の血漿中の微量定量を行った。さらに平成 20 年度は、CRP の Epitope 解析を行い特異的な CRP 測定試薬の作製を行った。本年度は、新たに多項目同時測定を目的としフロービーズアレイ法を用いてアディポサイトカインの迅速測定を試みたので報告をする。

肥満は高血圧、高脂血症、糖尿病、メタボリックシンドロームなどの生活習慣病等、数多くの疾患のリスクファクターとなる。近年、生活習慣の欧米化により肥満者は増加する傾向にあり、その早期発見・リスク管理を行うことが求められている。アディポサイトカインは脂肪細胞から分泌され生理活性物質である。中でもレプチンは食欲抑制やエネルギー消費亢進作用の他に、交感神経系の活性化を介した血圧上昇や脂質代謝改善作用など生理活性の調整に関与していることが明らかとなり、肥満動物やヒト肥満者において血中濃度が著しく上昇することが報告されている。また、Body Mass Index (BMI) との相関が報告されている C-reactive protein (CRP)

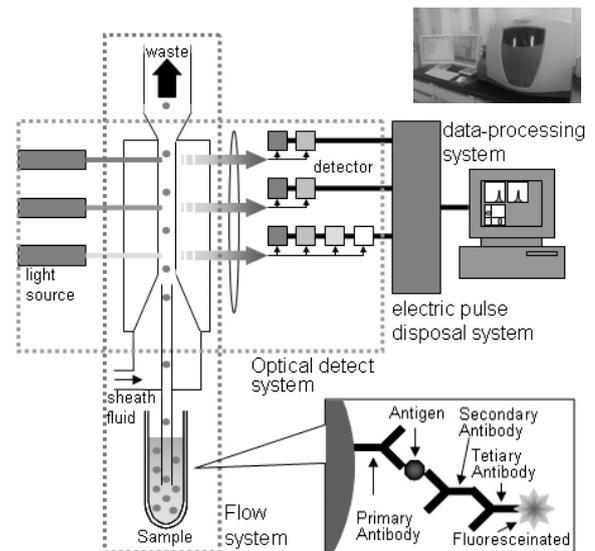


Fig. 1 The principle of flow beads array

は、炎症性疾患や組織の変性・壊死など、複数の要因によって過敏に上昇することが知られている。そのため、レプチンと CRP を共に測定することにより肥満の指標とし、生活習慣病の早期発見・リスク管理を行うことが可能となる。

これら疾患マーカータンパクの測定はイムノアッセイ（免疫測定法）による定量が行われている。しかし、一般的に用いられる LPIA 法や CLEIA 法は、いずれも一試薬一項目の測定しかできない。そこで多項目同時検出と、高精度な迅速測定が達成できるフローサイトメーターによるフロービーズアレイ法を用いた測定系の構築を検討した (Fig.1)。

フロービーズアレイ法は、サンプル中に存在する粒子や細胞などを光学的に一個ずつ短時間かつ多量に測定して、散乱光や蛍光などから個々の粒子や細胞等を迅速かつ高感度に解析する方法である。フローサイトメーターは通常、細胞の解析や計測に用いられるが、本研究では蛍光標識した粒子を測定することにより解析を行う。

2. 目的

肥満や成人病のリスク管理を行うために、脂肪細胞が分泌するアディポサイトカインを高感度で迅速に測定することを目的とする。さらに、フロービーズアレイ法を利用することにより、レプチンと CRP 同時測定系を構築する。

3. 実験方法

3-1. GMA 粒子の作製

四つ口セパラブルフラスコにホモジナイザ、冷却管を取り付け、恒温槽中に設置し反応器とした。そこに反応器を窒素置換した後、脱気水 170 ml とスチレン 14 ml を加え、ホモジナイザ (23,000 rpm, 5 min) にて攪拌した。次に開始剤 (AAPH) を加えて恒温槽を 60°C に昇温し、GMA 4 ml を滴下しながらホモジナイザ (23000 rpm, 1 hour) で攪拌した。その後、マグネティックスターラ (6 hour) で攪拌し粒子懸濁液を得た。

得られた粒子懸濁液を、メタノールと懸濁液を 1 : 1 で 10 ml 遠沈管に加えて分散させ、10,000 rpm で 15 分間遠心分離し未重合スチレンを取り除いた。その後、上清を捨て、沈殿物 (GMA 粒子) を超純水 10 ml で分散させた。精製した GMA 粒子は適度に希釈して N5 Submicron Particle Size Analyzer (Beckman Coulter) で粒径と分散率の確認、原子間力顕微鏡 (JSPM-5200, JEOL)、FT-IR (Bruker) の赤外吸収スペクトルにて、GMA が表面に修飾されていることを確認した。

3-2. GMA ラテックス試薬の作製

10 ml 遠沈管に GMA 粒子 100 μl とホウ酸緩衝液 (20 mM) 2 ml を加えて、14,000 rpm で 20 分間遠心分離した。上澄み液を捨て、沈殿にホウ酸緩衝液 1 ml を加えて懸濁し、一次抗体を加えて 12 時間 37°C でインキュベートしながら攪拌した。その後、14,000 rpm で 20 分間遠心分離して、上澄み液を捨て、沈殿にホウ酸緩衝液 1 ml と 1% BSA (ウシ血清アルブミン) 1 ml を加えて分散攪拌ブロッキングを 1 時間行った。次に遠心分離 (14,000 rpm, 20 min) を用いて、リン酸緩衝液 1 ml で 2 回洗浄した後、リン酸緩衝液 1 ml に懸濁したものを GMA ラテックス試薬とした。

Table 1 Antibody for detection of CRP

	CRP
Primary Antibody	Anti-CRP mouse monoclonal antibody
Secondary Antibody	Anti-CRP rabbit polyclonal antibody
Tertiary Antibody	Anti-rabbit IgG goat antibody conjugated FITC or PE

Table 2 Antibody for detection of leptin

	Leptin
Primary Antibody	Anti-leptin rabbit polyclonal antibody
Secondary Antibody	Anti-leptin rabbit polyclonal antibody
Tertiary Antibody	Anti-rabbit IgG goat antibody conjugated FITC or PE

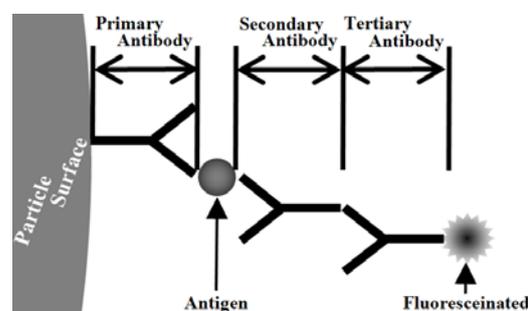


Fig. 2 Sample for Analysis

3-3. 磁性ラテックス試薬の調整

PS-Fe₃O₄ 粒子 (Estapor) を MES 緩衝液 (50 mM, pH 5.6) を用いて磁性により分離・洗浄を行った。次に 20 mg/ml WSC 2.0 ml と 50 mg/ml NHS 0.23 ml を加えて、37°C で 30 分間攪拌した後、MES 緩衝液で分離・洗浄を行った。そこに一次抗体を混合し、37°C で 1 時間インキュベートして、MES 緩衝液にて分離・洗浄を行った。MES 緩衝液 1 ml と 1% BSA 1 ml を加えて攪拌してブロッキングを 1 時間行い、最後に PBS-T で 2 回洗浄を行い、リン酸緩衝液に置換したものを磁性ラテックス試薬とした。

3-4. サンプルの調整

適宜希釈したラテックス試薬 200 ml に各濃度に調整した抗原 (200 ml, 0~1000 ng/ml) を 37°C で 30 分間攪拌して反応させ、リン酸緩衝液 (20 mM) で 2 回洗浄を行った。その後、同様にして対応する二次抗体を 37°C で 30 分間攪拌反応させ、PBS-T で 2 回

洗浄した後、リン酸緩衝液 1 ml に分散させた。更に蛍光標識三次抗体を 37°C で 30 分間攪拌して反応させ、PBS-T で 2 回洗浄した後、リン酸緩衝液 1 ml に分散させたものを測定サンプルとした。抗体と抗原は Table 1、2 のとおりである。

3-5. 測定

各濃度の抗原と反応させたサンプル 10 μl を純水 1 ml に分散させ、フローサイトメーター (Cytomics FC-500, BECKMAN COULTER) により測定を行い、試薬作製条件の検討を行った。

4. 結果および考察

4-1. 定量性・多項目同時測定の確認

まず最初に、フローサイトメーターによるビーズアレイ法を用いた測定系で、定量性および二項目同時測定が可能であるか確認を行った。その結果、レプチン-FITC 標識サンプルは検出器 FL1 に、CRP-PE 標識サンプルは検出器 FL2 に、それぞれ蛍光が観察され、2 つを混合しても試薬同士が阻害することなく、特異的に二項目同時測定が行えた。また、抗原濃度の増加に伴って、蛍光強度が上昇し、抗原の定量が可能であることが確認された。

4-2. GMA ラテックス試薬による条件検討

作製した GMA 粒子 (粒径: 333 nm) を用いて、CRP をモデルケースとして、より高感度に測定できる条件の検討を行った。使用する緩衝液の pH、ブロッキング剤の種類、感作する一次抗体および二次抗体の量、反応させる試薬濃度の検討 (Fig. 5) を行った結果、pH は 8.0、ブロッキング剤は BSA、一次抗体量は 5 μl、二次抗体量は 20 μl において、最も高感度に測定できることが判明した。さらに、レプチンの測定においても同じく検討を行い、同様の結果を得た。また、レプチンにおいては、CRP よりも低濃度領域で測定が可能であることが確認された。しかしながら、GMA 粒子を用いた測定系では、抗体や抗原の粒子への反応時における遠心分離操作が非常に煩雑であり、この点で課題の残る結果となった。

4-3. 磁性ラテックス試薬による条件検討

そこで、磁性粒子を用いることによって、これらの反応における粒子分離操作を磁性分離によって行った。その結果、遠心分離による分離・洗浄作業と比較して操作時間を 2 時間程度短縮することに成功

した。これにより、より迅速な測定が可能であることが確認された。そこで、磁性粒子を用い GMA ラテックス試薬と同様にして、高感度化の条件検討を行った。粒子径による反応性の比較では、0.50 - 2.37

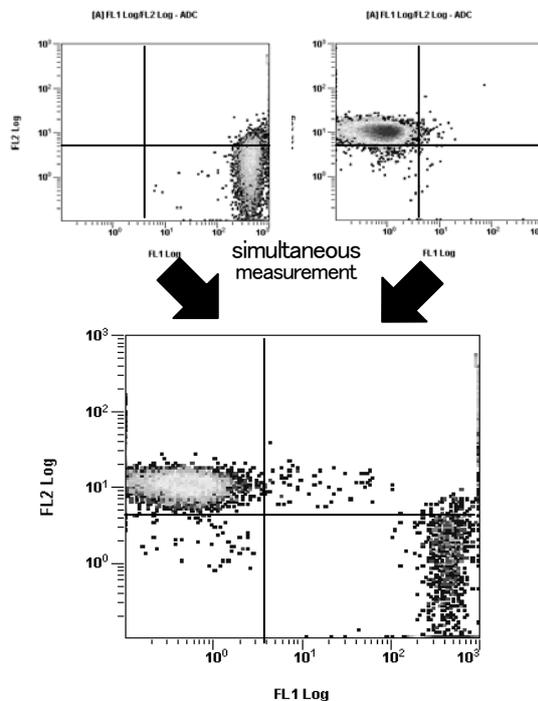


Fig. 3 Analysis data at simultaneous measurement of Leptin (FL1) and CRP (FL2) by flow cytometer

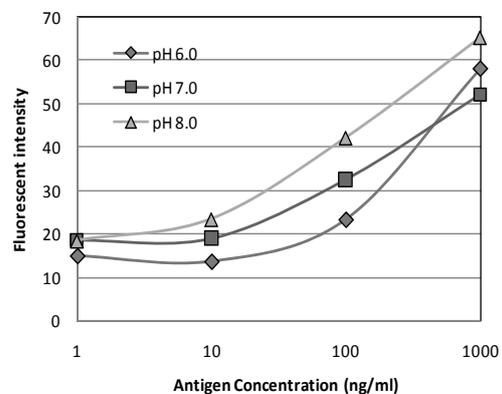


Fig. 4 Effect of pH on immunoassay for CRP detection using GMA latex

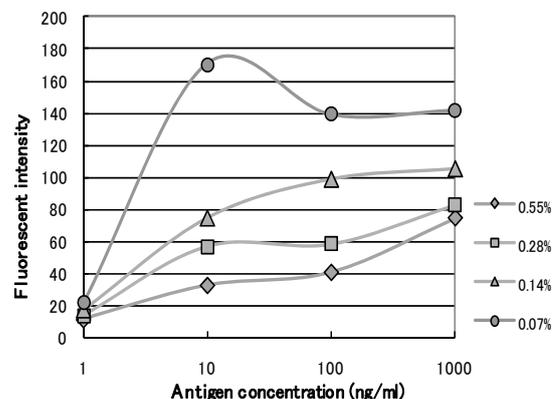


Fig. 5 Effect of reagent concentration on immunoassay for CRP detection using GMA latex

μm の 5 種類の大きさの粒子を用いて測定を行った (Fig.6)。その結果、粒子径が大きい方が蛍光強度が高くなる傾向にあることが判明し、これは粒子一個に対する抗体の数が増えるためであると考えられる。これにより、粒径の小さい GMA 粒子よりも高感度な測定が可能であった。

次に、より反応性が良好であった 2.37 μm と 1.98 μm の粒子を用いて、抗原と反応させる試薬濃度を变化させて測定を行った結果、試薬濃度が低い方が蛍光強度が上がり、検量線の直線性も優れる傾向にあることが判明した。これは試薬濃度が高い場合、粒子表面積あたりの感作抗体量に対して抗原の割合が少ないと考えられ、複数の抗体が 1 つの抗原に対して反応し凝集が起こると考えられる。このような状態になった抗原は抗原認識部位が無くなり、二次抗体と結合できず蛍光強度が下がる。これに対して、最適な試薬濃度の場合、二次抗体が十分に反応でき、最終的に粒子一個につき蛍光標識三次抗体が多くなり、蛍光強度が上がるということが考えられる。以上の検討から試薬濃度 0.13 (w/v) % 付近が最も高感度で、検量線の直線性にも優れることが判明した。これらの条件を元に、レプチンを測定した結果、同様の傾向がみられている。

以上より、フローサイトメーターは粒子一個一個の蛍光強度を測定するため、高感度化には個々の粒子の状態が重要であり、粒子の分散性、粒子径や濃度などが重要なファクターとなり、それには粒子一個一個の状態が寄与することが推測される。

5、結論

上記試薬の調整操作の各段階における最適条件の検討を行った結果、いずれの条件検討においても、抗原濃度に比例して蛍光強度が上がる傾向が見られ、測定が可能であることが判明した。これらの結果より、二項目同時測定も可能であることが示唆された。GMA 粒子を用いた検討では、抗原濃度 10-1000 ng/ml の範囲でフローサイトメーターを用いたアディポサイトカインの二項目同時測定が可能であった。また、磁性粒子を用いることによって、GMA 粒子を用いた測定系と比較して、高感度化および迅速化に成功した。

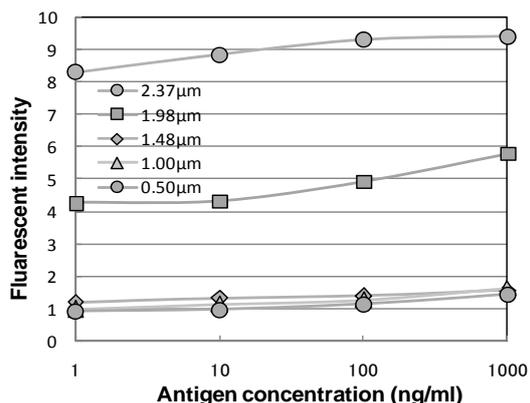


Fig. 6 Effect of particle diameter on immunoassay for CRP detection using magnetic particles

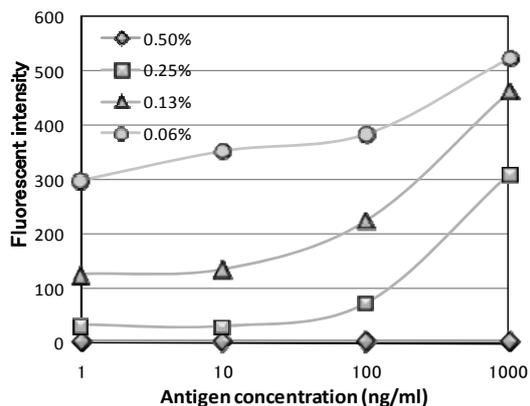


Fig. 7 Effect of particle concentration on immunoassay for CRP detection using magnetic particles

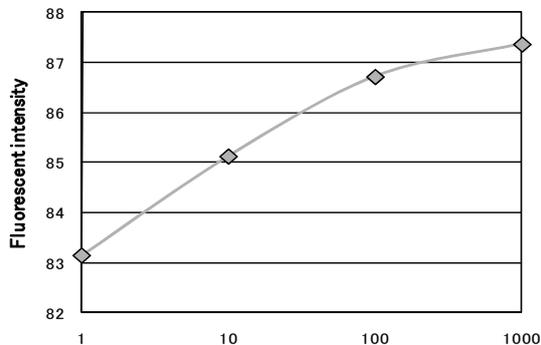


Fig. 8 Detection of leptin using magnetic particles by flow cytometer

また、磁性粒子を用いた測定に成功したことにより、これをさらに発展させることで、試薬調整から臨床検体測定までを全自動化し、多項目を網羅的に測定することで、メタボリックシンドロームをはじめとする各生活習慣病などの予防医療に貢献できると考えられる。

参考文献

- 1) Xiaomei Yan et al. JIM 284 (2004) 27-38
- 2) M.T. Syrjala et al. JIM 139 (1991) 265-270
- 3) Ivan V. Surovtsev et al. Colloids and Surfaces B 32 (2003) 245-255