

Adipocytokines 定量における化学発光酵素免疫測定法に関する研究

日大生産工 (院) ○関口 敏史

日大生産工 神野 英毅

1 緒言

現在、医療機器ならびに医療技術の向上により、早期発見することで多くの疾患を治療できるようになって来ている。それに伴い、今まで以上に臨床や定期的な健康診断における診断結果の迅速な提示が必要とされている。その検査対象として、生体を循環し多くの情報(タンパク質)を有している血液は、最も有効な診断材料である。その為、全血または血清を対象とした迅速かつ簡便な診断薬が多種多用に製品化されている。

2 背景

近年、生活習慣の欧米化により生活習慣病と呼ばれる糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化症といった病態を呈する人口が増加している。その背景には過剰な脂肪組織の蓄積が原因であると考えられるようになってきている。脂肪組織は、摂取した余剰エネルギーを蓄えるエネルギー備蓄装置として働いているだけでなく、糖脂質代謝や血圧調整、血栓形成など様々な生理活性を持つ Adipocytokines を分泌する生体内で最大の分泌内臓器として再認識されるようになってきている。Adipocytokines の1つである Leptin は、食欲抑制やエネルギー消費亢進作用のほかに、交感神経系の活性化を介した血圧上昇作用や糖脂質代謝改善作用、神経内分泌調整作用など、生理機能の調整に広く関与していることが明らかになっている。血中 Leptin 濃度は肥満動物やヒト肥満者において著しい上昇が認められ、ヒトにおける体格指数(BMI)や体脂肪率と良好な正の相関関係を示す。従って血中 Leptin 濃度は体脂肪量や全身エネルギー

一状態の優れた指標になると考えられる。

3 目的

現在、leptin の測定はプレートに抗 leptin 抗体を固定化した ELISA 法が主流である。しかし、この測定法は迅速かつ多量の検体を処理することができないという欠点があり、臨床現場で簡便に行えるものとは言えない。これまで本研究室では LPIA 法を用い迅速・高感度試薬の検討を行ってきた。しかし現在注目されている Adipocytokines (leptin)は従来法(LPIA 法)の約 1000 倍の感度が必要である。そこで本研究では迅速かつ簡便な LPIA 法と高感度測定可能な ELISA 法の両方の特徴をもつ CLEIA 法に注目し迅速・簡便・高感度をキーワードに研究を行い今後、糖尿病や高脂血漿、脂肪肝など幅広い代謝疾患を対象に leptin の臨床応用が展開していく上で重要な指標となるような試薬の検討を行なった。

4 実験方法

1)抗体の精製 レプチンを免疫したウサギ血清 10ml に硫酸アンモニウム飽和溶液を 10分おきに 1ml、計 8ml 加え 1 時間、4°C で攪拌した。その後、遠心にて沈殿物を回収し少量の 10mM の PBS にて溶解透析し、フィルターろ過、ProteinA カラムにて抗体の精製、さらにゲルろ過により再度精製をおこなった。さらにペプシンにより抗体の消化を行った。

2) ALP 標識抗体の作製 抗体の ALP 標識には Alkaline-Phosphatase Labeling Kit-SH (Dojin) をもちい作製した。

3) 抗体感作磁性粒子の作製 遠心管 (Centrifuge ware PC, NALGENE) に MES

Study on chemiluminescent enzyme immunoassay
for the measurement of adipocytokines

Satoshi SEKIGUCHI, Hideki KOHNO

Buffer(0.05M pH5.6)を2ml 入れさらに磁性粒子 (FERRI SPEHRE 100C, NIPPON PAINT)150 μ l 加えた後、遠心分離を行い粒子を洗浄した。沈殿物に再び同 MES Buffer 1ml、WSC (20mg/ml) 2ml、NHS (50mg/ml) 0.23ml を順に加え 27°Cで 30 分間攪拌、表面のカルボキシル基を活性化させた。活性化後、MES Buffer (0.05M pH5.6) を 2ml で洗浄し、抗体溶液 30 μ l (5mg/ml)を加え、37°Cで 30 分間攪拌、抗体を結合させた。結合後、遠心分離し沈殿物を再び洗浄した。また、その際の上清から抗体の結合量を BCA 法により算出した。上記の沈殿物を同 MES Buffer 1ml に懸濁した後、変性 BSA 溶液(1.5 (w/v)%) 1ml を加え 27°Cで 30 分間攪拌し、粒子表面の Blocking を行なった。Blocking 後、遠心分離し 0.1M Tris-HCl Buffer(pH8.2)に懸濁し未反応の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 Tris-HCl Buffer 2ml に懸濁し洗浄を二回行なった。最終的に同 Tris-HCl Buffer で濃度調整したものを抗体感作磁性とした。今回比較対象に抗 CRP 抗体をもちいた試薬も同様に作成した。作製した試薬の測定は、LUMIPULSE *f*にて発光量を測定、検量線を作成した。

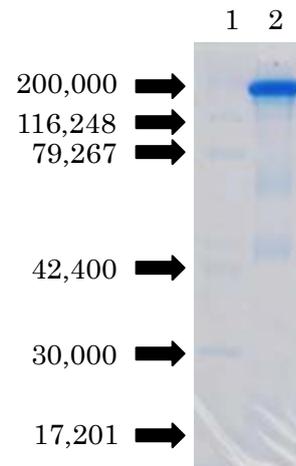
5 結果および考察

1) 抗体の精製および消化 精製した抗レプチン抗体および抗レプチン抗体をペプシンにより消化した生成物の SDS-PAGE の結果を Fig,1 に示した。Fig,1 では分子量約 180kDa に IgG のバンドおよび抗体が消化され分子量約 60kDa に目的の Fab のバンドを確認することができた。ゲルろ過による再精製の結果を Fig,2 に示した。

2) LUMIPULSE *f* による測定結果

作成した試薬での測定結果を Fig,3 に示した。抗レプチン抗体を用いた試薬で検量線を得ることができた。しかし CRP 試薬と比べ検量線の傾きが小さいことがわかった。これを改善するためには、抗体や試薬の調整法など更なる検

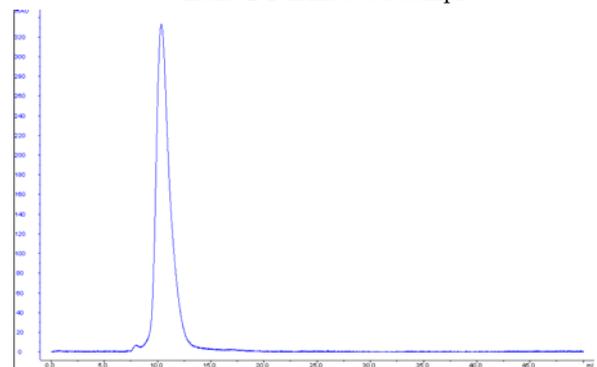
討が必要であると考えられる。



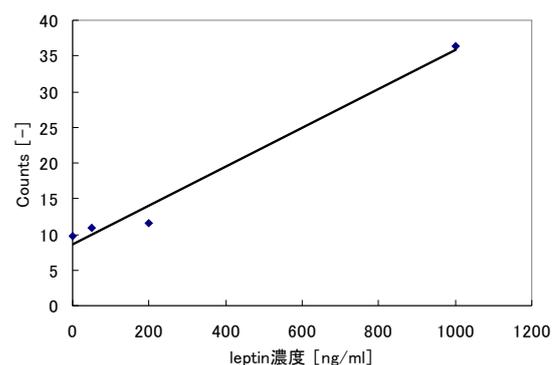
Fig,1 SDS-PAGE of IgG

Lane 1 molecular mass maker

Lane 2 Purificated sample



Fig,2 ゲルろ過による精製の結果



Fig,3 抗レプチン抗体感作試薬を用いた測定結果

【参考文献】

- 1) 浦山 修 臨床検査学講座 第二版 臨床化学検査学 医歯薬出版(株) 86-94