

医工連携による免疫診断薬の開発(肝疾患と糖尿病における 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

CRP (C-reactive protein) は1930年に Tilet & Francisによって肺炎双球菌の細胞壁から抽出されたC多糖体と沈降反応を生じる血清タンパクとして報告された。通常、正常ヒト血清中においてCRPは、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、急性期タンパクと呼ばれ、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⁾。CRP測定は、従来は急性炎症時における通常時からの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ていなかった。しかし、近年、動脈硬化症が血管の炎症である可能性が指摘され、CRP濃度は血管内皮の機能障害の程度と相関していることが示された。また、狭心症発作や心筋梗塞発作などの危険因子として新たな臨床的意義が報告されるなど、あらためてCRP高感度測定の意義が注目されている^{2)~8)}。そのため、より精度良く、高感度なCRPの測定法が求められている。

我々は、検体と試薬を混合するのみで定量可能なラテックス凝集法を利用したCRPの高感度定量を行った。ラテックス凝集法は、抗体または抗原をつけたポリスチレンラテックスの免疫反応による凝集を特定波長の透過光強度を測定し、rate法またはend-point法で抗原または抗体を定量する方法である。感度は 10^{-10} ~ 10^{-11} mol/l程度で、RIA (radio immunoassay) やEIA (enzyme immunoassay) に比べ、やや劣るものの、迅速かつ簡便に抗原や抗体の定量ができる点で、RIA やEIAには無い特性を持っている⁹⁾。

本研究では、高感度CRPを測定するため、アミノ酸のスペーサーを用いたラテックス試薬の検討を行い、さらに、本試薬を

用いて健常者、肝疾患患者、糖尿病患者血清中のCRPを測定し、試薬の有用性そして新規臨床的意義について検討を行った。

2. 実験方法

2-1. 抗CRP抗体感作ラテックス試薬の作製方法

抗CRP抗体感作ラテックス試薬は、カルボジイミド法を用いて抗体をラテックス粒子に化学結合させ作製される (Fig.1)。

まず、アミノ酸スペーサーラテックスの作製を行った。10 (w/v)% カルボキシル化ポリスチレンラテックス (G1225、粒径 $0.25\mu\text{m}$ 、JSR株式会社)を容量10 mlの遠沈管に0.10 ml分取し、0.05M MES緩衝液 (pH5.6) を1.9 ml加え、遠心分離 ($22,600\times g$, 4°C , 20 min) にて粒子の洗浄を行った。洗浄後、粒子を20 mg/ml WSC (MES緩衝液で調整) 2.0mlで懸濁し、さらに50 mg/ml NHS (MES緩衝液で調製) を0.23 ml加え、 25°C で30分間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MES緩衝液で洗浄し、同緩衝液1.0 mlに懸濁した。懸濁液にアミノ酸溶液 (0.133 mmol/ml) 2.0 mlを加え 37°C で30分攪拌し結合させた。その後、遠心分離 ($22,600\times g$, 4°C , 20 min) し、上清と沈殿に分けた。沈殿はMES緩衝液2.0 mlに懸濁し、遠心分離 ($22,600\times g$, 4°C , 20 min) にて粒子洗浄を行った。さらに、アミノ酸を結合させる時と

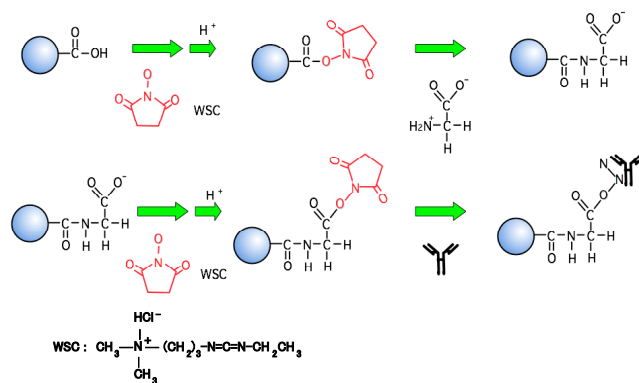


Fig. 1 Conjugation of an antibody to Carboxyl Modified (CM) latex by carbodiimide.

同様に、ラテックス粒子上のアミノ酸のカルボキシル基を活性化させ、抗 CRP ウサギ ポリクローナル抗体 (Lot. 020) を 150 μ g 加え、37°C で 30 分間攪拌し結合させた。その後、遠心分離 (22,600 \times g, 4°C, 20 min) し、上清と沈殿に分けた。沈殿は MES 緩衝液 2.0 ml に懸濁し、遠心分離 (22,600 \times g, 4°C, 20 min) にて粒子の洗浄を行った。洗浄後、MES 緩衝液 1.0 ml に懸濁し、1.5% (w/v) BSA 溶液を 1.0 ml 加え 25°C で 30 分間攪拌し、ラテックス粒子表面のブロッキングを行った。その後、0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.2) 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、粒子を Tris-HCl 緩衝液に懸濁して遠心分離 (22,600 \times g, 4°C, 20 min) にて 2 回洗浄を行い試薬を作製した。試薬は Tris-HCl 緩衝液 4.0 ml に懸濁し 0.25 % (w/v) に調整し保存した。また、本試薬を抗 CRP 抗体感作ラテックス試薬とした (Fig. 2)。

2-2. ラテックス試薬による CRP の測定

1) ラテックス試薬の性能評価とその測定条件
ラテックス免疫比濁法 (LIA 法) を原理として、CRP の定量を行う。試料中の CRP とラテックス粒子に結合させた抗体が抗原抗体反応を起こすことにより、凝集塊が生じる。この凝集反応の濁度を指標に計測し、その反応曲線の微分値をもとに反応速度としてデータ処理を行う。測定には全自動免疫血清検査システム LPIA-200 (三菱化学ヤトロン) を用いた。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。

2) 標準 CRP と臨床検体

臨床試験で用いた血清は、駿河台日本大学病院においてインホームド・コンセントが得られた健常者 62 名、および 2005 年 4 月から同病院において治療中の肝疾患患者 263 名、糖尿病患者 230 名の血清を対象とした。なお糖尿病においては、2 型糖尿病患者のうち、インスリン治療を行っていない患者であり、駿河台病院で測定した CRP 値が 0.2mg/dl 未満、空腹時血糖 180mg/dl 未満の血清サンプルとした。

また、標準 CRP は C-Reactive Protein (CRP) [Human Serum Calibrator] (Dako) を用いた。

3 結果

3-1. アミノ酸スペーサー分子の検討

まず、アミノ酸スペーサーの結合濃度の検討

を行った。グリシン溶液濃度を 1.0 mg/ml から 20 mg/ml に変化させグリシンスペーサーラテックスを作製し、そのラテックスを用いて抗体を結合させ試薬の作製を行った。作製した試薬は、CRP 抗原と反応させ、反応性の検討を行った。その結果を Fig. 2 に示す。グリシンの濃度の増加に伴い、試薬の反応性は向上した。また、最も反応性の良かったグリシン濃度は 1.0 mg/ml であり、それ以上の過剰なグリシンの結合は試薬の反応性を低下させることが確認された。よって、ラテックスに 0.26mmol のアミノ酸を結合させることにより反応性が向上することがわかった。

さらにグリシン (Gly)、アラニン (Ala)、バリン (Val)、ロイシン (Leu) のアミノ酸 4 種と合成ペプチド (グリシンを 5 つ結合 : Gly5) をスペーサー分子として用い、それぞれの試薬を作製した。その反応性の結果を Fig. 3 に示す。反応性が良い順に Gly5、Gly、Ala、Leu、Val となった。どのアミノ酸においても緩やかなカーブの反応が得られたが、Gly5 において良好な反応線が示された。

Gly5 はグリシンが 5 個ペプチド結合をしたオリゴマーである。グリシン単体と Gly5 を比較すると反応性が 40% 上昇することが確認された。本結果により適当な長さのスペーサーを用いることによりラテックス粒子に結合する抗体間に距離が生じ、抗原抗体反応における立体障害が解消され、その結果、反応性が向上すると考えられる。また、スペーサーとして使用するアミノ酸により反応性に違いが生じた。本研究では α -アミノ酸を用いて反応性を検討していることからペプチド結合形成に必要なア

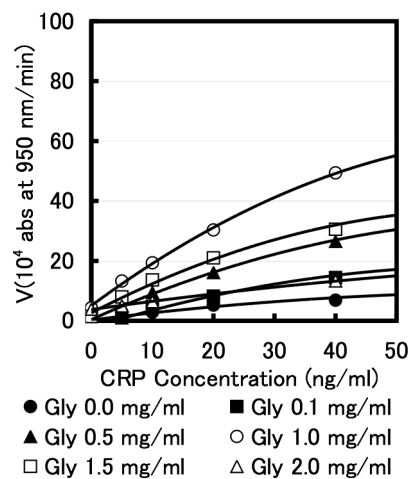


Fig.2 Comparison of reactivity in various concentration of glycine spacer

ミノ基とカルボキシル基の位置関係はすべて同じである。よってラテックス粒子と抗体の長さは一定であり、反応性の差異はアミノ酸の側鎖により生じている。今回用いたアミノ酸は脂肪族をアルキル鎖としているため、アミノ酸の疎水性や分子の体積が主に異なっている。しかし、アミノ酸の結合量を比較するとすべてのアミノ酸において約 70%以上の結合が認められる (Fig. 4)。また、抗体の結合量も有意な差はみられなかった。従って、脂肪族アミノ酸スペーサーによる反応性の影響は、疎水性に依存することが示唆された。

3-2. ラテックス試薬の相関性

ペプシン消化による F(ab')₂型抗体を用いて上記の方法にてラテックス試薬を作製し、その反応性を従来型試薬と比較した。検量線の作成には、どちらの試薬も標準 CRP を用いて反応を行い、肝疾患患者 263 検体を F(ab')₂型の試薬と従来試薬にて CRP 値を測定した。従来の一般試薬との相関性は、 $r^2=0.746$, $y=0.4879x+1.77$ であった (Fig. 5)。また、CRP 濃度が 0.300 から 20.0 μ g/ml の間において相関性は $r^2=0.829$, $y=0.909x+0.6073$ であり、低濃度側において良好な相関関係が認められた。しかし、高濃度側で乖離が確認できた。

3-3. 健常者、肝疾患患者、糖尿病における CRP 定量の臨床的意義の検討グリシンスペーサーを用いて作製したラテックス試薬にて健常者、糖尿病、肝疾患患者血清中の CRP を測定した (Fig. 6)。健常者 62 検体の平均値 (中央値) は、332 ng/ml、最高値 1153 ng/ml、最低値 126 ng/ml と文献の健常者 CRP 血中濃度と比較し、200 ng/ml 程低いことがわかった。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⁹⁾ 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。本研究においてボランティアの健常者 63 名は 20 代 30 代が多く CRP 値の平均値は低濃度になったと考えられる。B 型および C 型のウイルス性肝疾患患者における血中 CRP 値は、平均値 (中央値) 1374 ng/ml、最高値 26,748 ng/ml、最低値 386ng/ml となった。CRP はウイルス感染症において極めて微量にしか変化しないことが知られている。また、肝臓感染症においても CRP は肝臓で生産されるため、CRP 産生能の低下が示唆さ

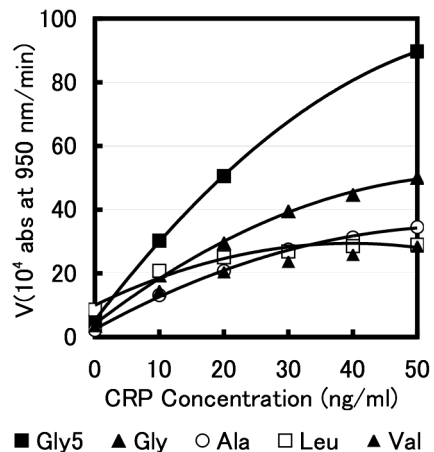


Fig. 3 Comparison of reactivity in various types of amino acid spacers

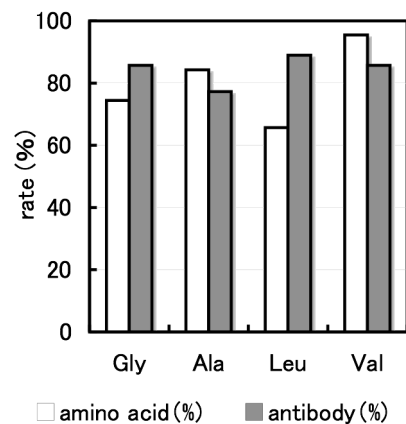


Fig. 4 Amount of conjugated amino acid and antibody

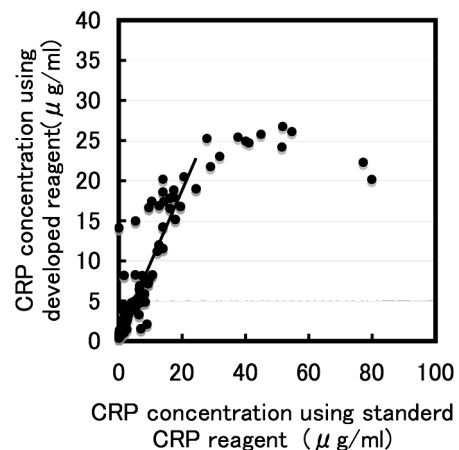


Fig. 5 Comparative study of CRP latex reagent

れている¹⁰⁾。しかし、高感度測定できる本 CRP 濃度測定により、肝疾患によるこのような CRP 値の変化が確認された。これらのデータより、ウイルス性肝疾患患者においても肝機能の炎症から CRP が産生されていると考える。さらに、Fig.8 肝炎、肝硬変、肝ガンと病態が重症化進行するに従い、CRP 値の上昇傾向が観測され、こ

のことは微量の CRP 測定の臨床的意義として、肝疾患患者における治療経過や合併症の観察に利用できると考えられる。

次に、代謝疾患として代表的な 2 型糖尿病患者 220 名において CRP 値の測定を行い、平均値（中央値）は 704 ng/ml、最高値は 18,650 ng/ml、最低値は 114 ng/ml となった。糖尿病患者は、血糖値が高度に上昇することより、糖尿病の履歴が長くなるにつれて血管疾患の進行が示唆され、一般に動脈硬化の発症リスクが高いことが知られている。動脈硬化により CRP 値が上昇する知見も得られていることから、2 型糖尿病患者において CRP を測定することにより、病態の把握が出来ると考えられることが示唆される。その結果、2 型糖尿病において CRP の微量な変化が確認できたと考えられる。

4. 結言

①アミノ酸スペーサーを用いた新規な CRP 試薬の作製を行った。グリシンスペーサーを用いてラテックス粒子に抗 CRP 抗体を担持させることにより、抗体に配向性をもたせることができ、低濃度領域において安定で他の方法と比較しても迅速、簡便かつ高感度で CRP 測定を行うことができた。

②臨床検体中の CRP の測定において、健常者は 332 ng/ml、肝疾患患者を 1374 ng/ml、糖尿病患者は 704 ng/ml となった。ウイルスの感染症である B 型や C 型肝炎患者において CRP の測定を行った結果、有意な差がえられた。また、2 型糖尿病においても CRP は健常者に比べて高値を示し、これら 2 つの疾患において微量 CRP 変動を測定することは、臨床的に意義があると言える。

5. 参考文献

- 1) 福岡良男ら：臨床免疫学，医歯薬出版（1997）
- 2) 高橋伯夫. 高感度免疫測定法がもたらす新たな病態診断的有用性 - CRP を中心に - .臨床病理. 2002 ; 50 : 30-39
- 3) 森脇貴美,角谷勇実,宮崎真美,藤田誠一ほか. FAD 認証高感度 CRP 測定法(BN II) と微量 CRP 測定法(LIPA-H 法)の対比.生物試料分析, 2002 ; 25 : 399-405
- 4) 神野英毅, 小川眞広. 超高感度 C-反応性タンパク質測定試薬及び測定法, 特許, 出願番号 2005-345713

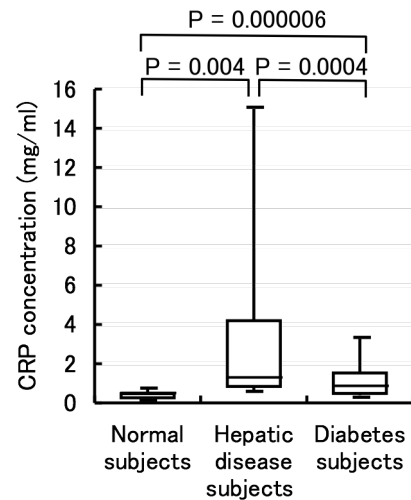


Fig. 6 Box and whisker plots in CRP measurement of normal subjects and patients

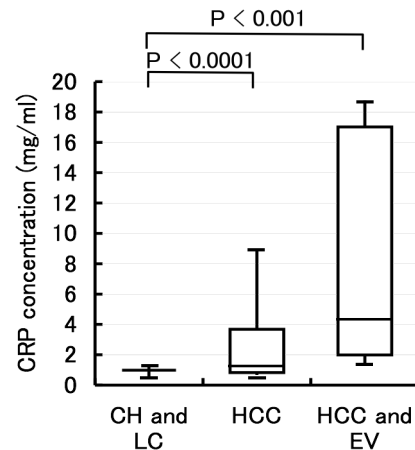


Fig. 7 Box and whisker plots in CRP measurement of various types of hepatic disease

- 5) Paul M Ridker, MD, MPH. Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham risk scores. *Circulation*, 2004 ; 109:1955-1959
- 6) Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. *Circulation*, 1998 ; 97: 425-428
- 7) Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. *Circulation*, 1998 ; 97: 2007-2011
- 8) 飯塚儀明, 澤畑辰男, 高野佐重喜ほか. CRP 定量の問題点と新試薬による測定. 日本臨床検査自動化学会会誌 2001 ; 26 : 82-86
- 9) 福岡良男ら “臨床免疫学” 医歯薬出版 1997
- 10) Wan Beom Park, Ki-Deok Lee, Chang Seop Lee, et al., *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2005; 51:227 – 230