

医工連携による免疫診断薬の開発 (高感度なD-dimer検査薬の開発と肝および糖尿病性疾患に関する研究)

神野 英毅 (応用分子化学科)、小川 眞広 (日大・医)
天木 秀一 (日大・医)、荒川 泰行 (日大・医)

1. 緒言

血液は正常状態において適度な粘性を示し、体内の微小血管を流れて、出血時や血管病変時に凝固を伴う。凝固作用は血管の損傷により開始し、Fig. 1のように連続的なCascade反応が起こり、最終的にThrombinの作用によりFibrinogen(Fg)がFibrin(Fb)へ転換し、Fbが重合してCross-linked Fbとなる。この現象は、血管内における血栓の形成の過程である。また、血栓の増大に伴い、この凝集塊を正常化するため血栓溶解因子であるPlasminが血液中に産出され、血栓は分解される。この線溶機構において、Cross-linked FbによりD-dimer (Fig. 2)を主とするFb分解産物(FDP : Fibrin Degradation Products)が生成される¹⁾²⁾。

血管病変時において、凝固作用と線溶機構との均衡は崩れ、十分な血栓分解が亢進せずに心筋梗塞、脳梗塞、血栓症静脈炎などを引き起こし、血液病変障害となる。

近年、血栓症の治療を目的としてD-dimerの精密測定が注目され、Latex凝集反応による臨床診断が行われている。これにより、早期治療が可能となり、より迅速な診断法の確立が必要とされている。

本研究室では抗原抗体反応を用いたLatex凝集反応による臨床診断薬に関する免疫学的な研究を行ってきた。これらの研究の中での新規知見として、Latex粒子の表面上に直接抗体を結合させたものよりも化学結合を用いてSpacer分子を導入したものが性能の面からみて高感度で安定である事が確認された。そして、このSpacer分子をAmino acidに置き換えLatex粒子の表面と抗体分子との距離をあけ、分子間における自由度をもたらしことにより、さらに高感度測定が可能となる事が確認された³⁾。また、同じ抗原と反応する抗体であっても、各Monoclonal CloneによりEpitope部位が微妙に異なる。これを利用し、数種の抗体群を組み合わせる事により作製したLatex試薬の反応性は、著しい向上がみられ、その

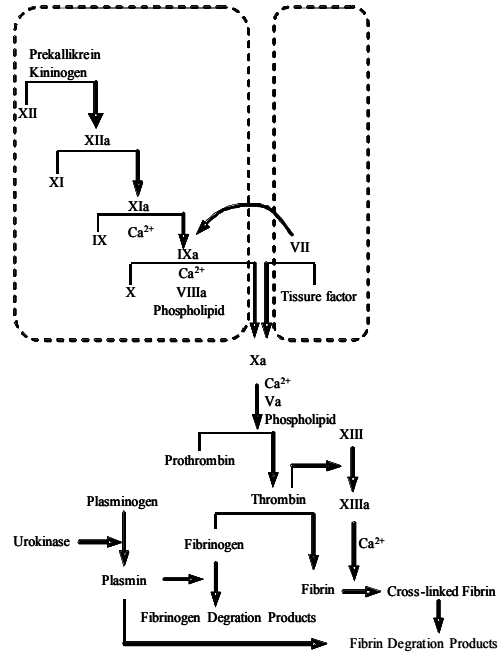


Fig. 1 生体内における凝固・線溶機構

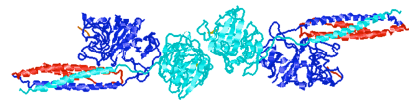


Fig. 2 D-dimerの立体構造

有用性が確認できた⁴⁾。

そこで本研究では、Amino acid付加Latex粒子に抗D-dimer抗体を感作させることで高感度なLatex試薬の開発を目的とし、D-dimerの精密測定の臨床的意義についても検討した。

2. 実験方法及び測定方法

高力価な抗体の選択

これまで抗D-dimer抗体は、MABCO社(AU)で作製されたもの(DD-3B6/22)を細胞培養し、1つのCloneの抗体が使用されてきた。本研究では、新たなCloneにより生産・樹立された8種の抗D-dimer抗体を使用した。この8

種の新規抗体を用いてEnzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA法)を行い、反応性の良い抗体を選択した。本方法では抗原にHuman D-dimer、抗体として新規抗D-dimer Monoclonal 抗体(Clone No.DD09, DD15, DD17, DD20, DD26, DD01, DD03, DD06)を用いた。また、二次抗体にはAnti-Mouse Goat IgG (Whole Molecule) Horse Radish Peroxydase conjugate (SIGMA)、基質剤にはO-Phenylene Diamine錠剤(SIGMA)を用いた。

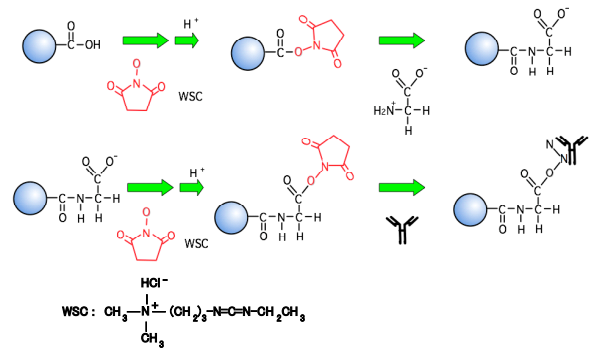


Fig. 3 カルボジイミド法による抗体結合原理

抗D-dimer抗体感作Latex試薬の作製

○物理吸着法

1%のCarboxyl基付加Latexの懸濁液に抗D-dimer抗体(Mouse Monoclonal Antibody IgG₁)を加え、Latex粒子と抗体との結合を行った(27°C, 30min)。この後に遠心分離操作(160,000rpm, 4°C, 20min)を行った。この沈殿物を1.5%変性BSA溶液に加え、Latex粒子上の抗体未結合部位のBlockingを行った(27°C, 30min)。この溶液で遠心分離操作(160,000rpm, 4°C, 20min)を行い、沈殿物をbuffer溶液(Tris-HCl, pH8.2)で懸濁させて物理吸着Latex試薬とした。

○化学結合法(Arginine Spacer付加)

1%のCarboxyl基付加Latexの懸濁液にWater Soluble Carbodiimide (WSC)及びN-Hydroxy Succinimidetethyl(NHS)を加えLatex粒子上のCarboxyl基の活性化を行った(37°C, 30min)。このLatex懸濁液にArginine Spacer溶液(1.33mol/ml)を加えて攪拌した(27°C, 30min)。抗D-dimer抗体(Mouse Monoclonal Antibody IgG₁, Clone No. DD26, DD03, DD06)を加え、Carboxyl基と抗体との結合を行った(27°C, 30min)。さらに、1.5%変性BSA溶液を加えLatex粒子上の抗体未結合部位のBlockingを行った(27°C, 30min)。この後に遠心分離操作(160,000rpm, 20min)を行い、沈殿物をbuffer溶液(Tris-HCl, pH8.2)で懸濁させて化学結合Latex試薬とした。

標準D-dimer及び臨床検体を用いた試薬の性能評価

作製した各試薬を用いて標準品のD-dimerを測定し、その反応性について検討した。また、日本大学医学部駿河台病院より供与されたボランティア正常者と慢性肝炎及び糖尿病性疾患の血漿を用

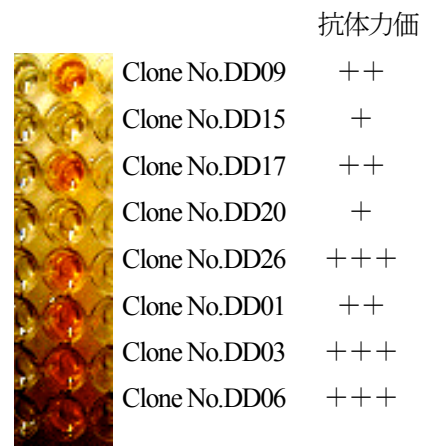


Fig. 4 抗D-dimer抗体の力価測定(ELISA法)

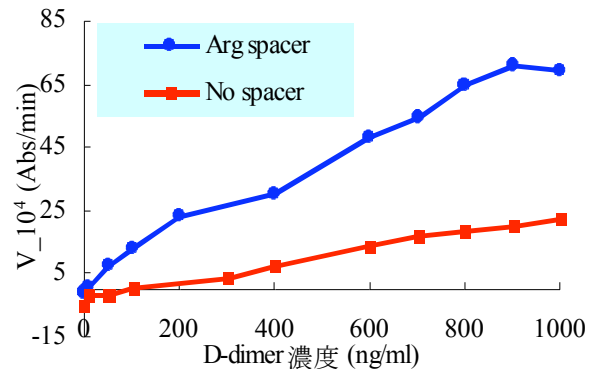


Fig. 5 Spacer分子導入による抗D-dimer抗体感作Latex試薬の反応性への影響

いてD-dimer値を測定し、その臨床的意義を検討した。作製した各試薬は、全自動免疫血清検査システム LPIA-S500(三菱化学メディエンス社)を用いてD-dimer値の測定を行った。このLPIA-S500はLatex近赤外比濁法(LPIA法)の測定原理を用いた、Latex粒子凝集反応速度の測定装置である。

本装置の測定セル内で抗原溶液(標準D-dimer及び臨

床検体)30 μ l, 反応緩衝液230 μ l, Latex試薬30 μ lを混合・攪拌した。この反応系における吸光度変化を12秒毎に波長800nmで測定し(10min)、平均反応速度を算出した。これにより、検量線の作製及びD-dimerの定量を行った。

複数の抗体の混合による抗体感作Latex試薬の反応性への影響の検討

化学結合法により作製した3種の抗体感作Latex試薬を用いて、全組み合わせ(DD26/DD03, DD26/DD06, DD03/DD06, DD26/DD03/DD06)で混合し(容積比1:1及び1:1:1), 3種類の2Clone混合試薬及び1種類の3Clone混合試薬を作製した。この混合試薬を用いて、標準D-dimerをLPIA-S500にて測定した。

3. 実験結果及び検討

Fig. 4にELISA法による新規抗体の力価測定の結果を示した。この結果よりClone No. DD26, DD03, DD06の抗D-dimer抗体の力価が高い事が分かった。これにより、本研究ではClone No. DD26, DD03, DD06の抗D-dimer抗体をLatex試薬作製に採用した。

Fig. 5に抗体感作方法の違いによるLatex試薬の反応性への影響を示した。この結果から化学結合法により作製した試薬は著しく反応性が向上している事が分かる。これはSpacer分子の導入により抗体と粒子表面間における立体障害が少なく、感作抗体の運動自由度が向上し、測定時の抗原抗体反応が効率的に行われたためと考えられる。

Fig. 6に同試料における各試薬の作製経過日ごとに測定した反応速度を示した。物理吸着法により作製した試薬において、その反応性は日数の経過とともに著しく低下している。一方、化学結合法により作製した試薬は、日数による反応性の低下は見られない。化学結合法での試薬の抗体とLatex粒子との結合が強固なものであるのに対して、物理吸着法で作製した試薬では結合が弱いため、日数の経過とともに抗体と粒子が解離し、反応性に違いがみられたと考えられる。このことより作製した試薬は、性能の安定性の面からみても、極めて有用である事が示唆された。

Fig. 7に測定した正常者、糖尿病患者、慢性肝炎患者のD-dimer値を示した。正常者と比較して、糖尿病患者

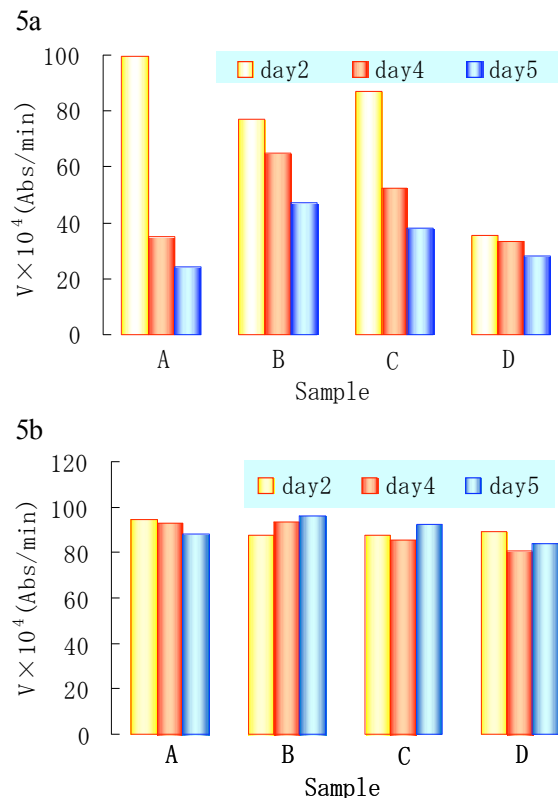


Fig. 6 抗体感作方法によるLatex試薬の安定性の違い

5a: 物理吸着Latex試薬

5b: 化学結合Latex試薬

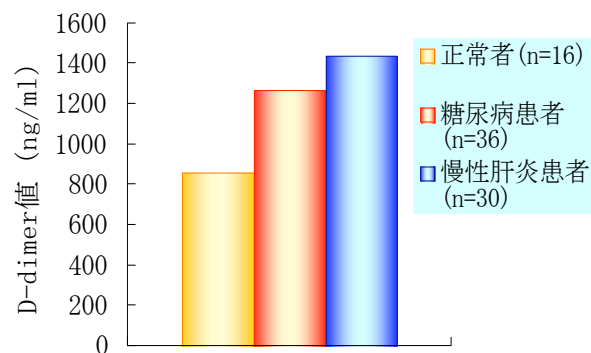


Fig. 7 正常者と各種疾患におけるD-dimer値

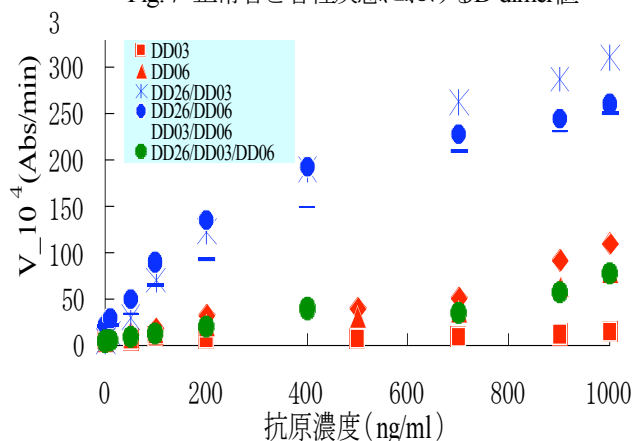


Fig. 8 抗体感作Latex試薬の混合による反応性への影響

と慢性肝炎患者のD-dimer値は上昇している。糖尿病患者の血液は中性脂肪やCholesterolが多く、これが血管の内壁に蓄積し、内壁が粥状に変性し、血栓(Cross-linked Fb)を形成する。これにより線溶機構が活性化し、糖尿病患者の血漿は、D-dimerの高値を示すものと思われる。

また、慢性肝炎患者の肝機能は低下し、生体内における凝固・線溶系機構の制御が正常に行われていない。これにより、血管壁が損傷していないにもかかわらず、Cross-linked Fbの形成及びPlasminの生産が行われ、2次線溶が亢進する。これにより、Cross-linked Fbの分解作用が活性化し、慢性肝炎患者の血漿は、D-dimerの高値を示すものと思われる。

そして、これらの疾患の更に精密な病態把握を行うため、抗体混合試薬によるD-dimerの高感度測定を行った。また、Fig. 8に複数の抗体の混合による、抗体感作Latex試薬の反応性への影響を示した。2種の抗体を混合すると抗体感作Latex試薬の反応性が向上している。この原因は、試薬の混合によりD-dimerの γ 鎖結合と反応性を持つEpitope部位が増加するし、Latex試薬中の抗体がSample中のより多くの抗原と結合可能になったためと考えられる。しかし、3 Clone混合試薬では2 Clone混合試薬ほど高い反応性はみられない。この原因に以下の現象よるものと考えられる。3 Clone混合試薬において1つの混合試薬中の各抗体の濃度は、2 Clone混合試薬に比べ低い。そのため、抗原抗体反応において最も反応性の良い抗体の寄与が低下し、2 Clone混合試薬ほどの反応性の向上がみられなかったと考えられる。

4. まとめ

新規抗D-dimer抗体を用いて化学結合法によりAmino acid導入抗体感作Latex試薬の開発をした。この試薬において化学結合法による性能の安定性及びSpacer分子による高感度化の有用性が確認できた。

複数の新規抗D-dimer抗体を用いて作製した混合試薬の使用により、Sample中の抗原と反応するEpitope部位が増加し、単一種のものより高感度なD-dimerの測定の可能性が示唆された。

現代医療においてこれらの方法の採用は、迅速・高感度なD-dimerの測定の臨床的応用に役立つと思われる。

また、正常者、糖尿病患者、慢性肝炎患者においてD-dimer値の差が確認できた。糖尿病や肝炎などの血栓症患者では、D-dimer値は高値を示し、同じ血栓症患者においても病態の違いによりD-dimer値は異なった。これにより、D-dimer値の精密な測定は各種の病態把握において重要である事が示唆された。

【参考文献】

- 1) R. Chen and RF. Doolittle., “ γ - γ cross-linking site in human and bovine fibrin”, *Biochemistry*, 10, (1971), pp. 4486-4491.
- 2) PD. Hoeprich, and RF. Doolittle., “Dimeric half-molecules of human and bovine fibrin.”, *Biochemistry*, 22, (1983), pp. 2049-2055.
- 3) 福田梓, Amino acid spacer を用いた感作法による高感度CRP 定量に関する研究, 平成18年度 卒業論文要旨集, (2006), pp.60.
- 4) 根本浩史, LPIA(Latex Photometric Immunoassay)法を用いた Influenza A およびB ウィルスの迅速診断に関する研究, 平成16年度修士論文 (2004).