

Latex 凝集反応による高感度 CRP の測定

日大生産工 ○小森谷 友絵 日大生産工 神野 英毅

1. 緒言

CRP (C-reactive protein) は、細菌感染および組織損傷などが原因で上昇する炎症マーカーとして測定されている。急性炎症では、CRP値は正常の 1000 倍程度上昇してくることから、CRP値の低い領域を感度および精度よく測定する測定法の必要性は低かった。しかし、従来の健常者レベルにもかかわらず CRP値 0.3mg/dL程度の微増が継続的に認められた場合には、何らかの慢性炎症をもち、心筋梗塞が高頻度で起こりやすくなることが明らかとなった¹⁾。さらに、心筋梗塞の発症の予防や冠動脈疾患患者の経過および再発の予測が可能であることが報告されている²⁾。

現在、血液中の CRP の測定はネフェロメトリー法を原理としたラテックス凝集法で行われている。ラテックス粒子表面に抗 CRP 抗体を固定化することによりラテックス試薬は作製される。

本研究では、抗体をラテックス粒子へ 4 つの方法 (物理吸着、化学結合 2 種、プロテイン A 結合) で固定化し、ラテックス試薬を作製し、比較した。

2. ラテックス試薬の作製方法と反応性

2.1. 物理吸着法

pH8.2 の 0.1M Tris-HCl 緩衝液に懸濁したポリスチレン粒子に抗 CRP 抗体を加え 25 で 1 時間撹拌した。遠心分離により粒子の洗浄

した後、BSA でブロッキングをし、さらに洗浄後、粒子濃度 0.5% に調製し、物理吸着ラテックス試薬を作製した。

作製したラテックス試薬を CRP と反応させ、その凝集反応速度を測定した。測定には、全自動免疫血清検査システム LPIA-200 を用いた。測定キュベット内に、抗原 CRP 溶液 30 μ l、反応緩衝液 230 μ l、ラテックス試薬 40 μ l を分注し、12 秒毎に 10 分間波長 950nm の吸光度変化を測定し、平均反応速度から検量線を作製した。

抗体の添加量の増加に依存し、抗体の吸着量、反応性の向上がみられた。しかし、抗体の吸着量は、粒子表面積 1m²あたり 25mg で吸着平衡に達することがわかった。また、反応性は抗体の吸着が 0.65mg/m²のときが最もよく、測定限界は CRP が 10ng/ml であった。

2.2. 化学結合ラテックス

pH6.1 の 0.15M MES 緩衝液に懸濁したカルボキシル化ポリスチレン粒子に EDC と NHS を加え撹拌してカルボキシル基を活性化させた。洗浄後、抗 CRP 抗体を加え 37 で 1 時間撹拌し結合をさせた。その後 BSA でブロッキングを行い、洗浄後、粒子濃度を 0.5% に調製し、カルボキシル基化学結合ラテックス試薬を作製した。

試薬の反応性は、物理吸着ラテックスと同様に行った。

The High Sensitive Quantitation of the Acute Phase Reactant "C-reactive Protein" by Latex

Photometric Immunoassay

Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

カルボキシル基ラテックス試薬の抗原CRPとの反応性の結果こちらの試薬では自己凝集は確認されなかった。検出限界はIgGが 0.30 mg/m²結合したものでおよそ 5 ng/mlであった。

2・3．化学結合ラテックス

pH 7.5 の 0.01M PBS 緩衝液に懸濁した塩化メチル化ラテックス粒子に抗体を加え、25 で 3 時間攪拌をした。遠心分離を用いて洗浄後、BSA を加えブロッピングを行った。洗浄後、粒子濃度を 0.5% に調製し、塩化メチル基化学結合ラテックス試薬を作製した。

作製したラテックス試薬を CRP との反応性を Fig.2 に示した。反応緩衝液に増感剤 (PEG) を加えることにより高感度な反応性を得ることができ、検出限界は 1ng/ml であった。

2・4．プロテイン A 結合ラテックス

2・2．の方法を用いてプロテイン A をカルボキシル化ラテックスに結合させた。その後、抗体を加え 25 で一晩攪拌し、プロテイン A に抗体を吸着させた。洗浄後、ラテックス粒子濃度を 0.5% に調製し、プロテイン A 結合ラテックス試薬を作製した。

ラテックス濃度を 0.2 % および 0.1 % にして抗原 CRP との反応性を検討した。0.2% において見られたプロゾーン現象が、ラテックス濃度 0.1 % にすることにより見られなくなり、また 0.2 % で測定波長を 950 nm にすることにより良好な検量線が作製できた (Fig.3)。検出限界はおおよそ 1 ng/ml であった。

3．参考文献

- 1) 中村 治 雄 他 : 臨 床 検 査 46(9) : 951-958,(2002)
- 2) Liuzzo G, Buffon A : Circulation 98 : 2370-2376,(1998)

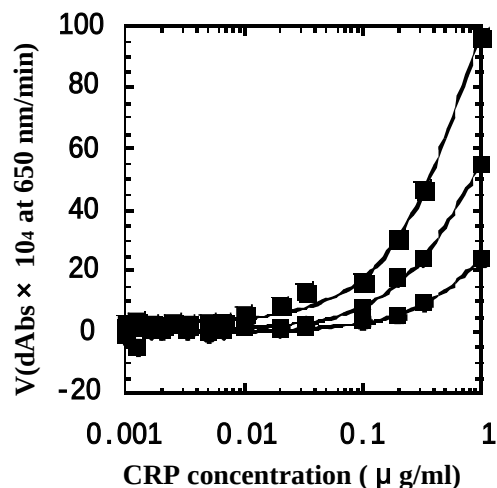


Fig. 1. Immunoresponses of different amount of anti-CRP coupled on CM latex

● : 0.18 (mg/m²) ■ : 0.30 (mg/m²) ■ : 0.62 (mg/m²)

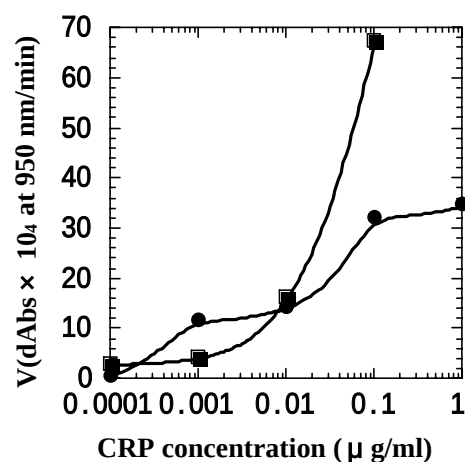


Fig. 2. Immunoresponses of different amount of anti-CRP coupled on -CH₂CL latex

● : PEG 0.5% , ■ : PEG 1.0%

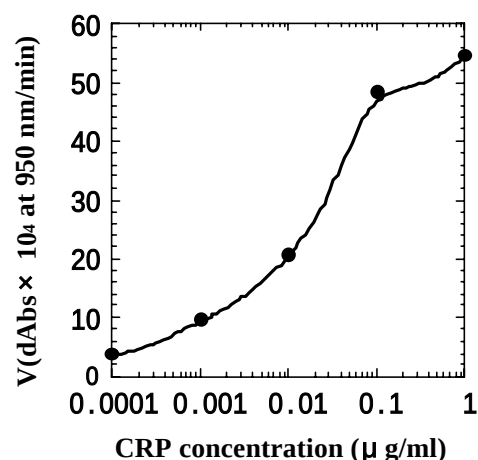


Fig. 3. Immunoresponses of different amount of anti-CRP-Protein A coupled on CM latex