

【緒論】

今回測定の対象としているC-反応性タンパク(CRP)は、通常正常ヒト血清中でも微量(平均580ng/ml)に存在し、炎症性疾患や組織の変性・壊死が生じるとさらにCRP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。急性期タンパクの代表的な検査の一つで細菌感染、組織損傷などが原因で上昇する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⁾が、さらに高感度化必要がある。従来法のCRP測定は、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ので、感度に優れた測定法はあまり必要とされなかった。しかし、近年ラテックス凝集法などの高感度CRP測定法の開発により、CRP濃度を低濃度域で精密に測定することが、心筋梗塞や新生児感染症の予知マーカー、歯周病などのさまざまな疾患との関係性も注目されはじめた²⁾。したがって、高感度ラテックス試薬に対する需要が今後増すことが予想される。

本研究は作製法、主にアミノ酸をリンガーとして修飾したラテックスを用いてスペーサーとしたラテックス試薬を作製して比較検討し高感度化した。さらにその中のグリシンをスペーサーとしたラテックス試薬で正常者、患者血清(肝炎)で測定し比較検討した。

【実験】

1. amino acid spacer法によるラテックス試薬の作製

1%カルボキシル基修飾ラテックス懸濁液にWSC(Water soluble carbodiimide)溶液とNHS(N-Hydroxysuccinimide)溶液を攪拌しながら順

に加え、298Kで30分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pH6.5, 0.05 M MES緩衝液で洗浄し、その後にMES緩衝液で 1.33×10^{-4} mol/mlに調製した各スペーサー分子[Glycine(Gly)・Valine(Val)・Leucine(Leu)・Threonine(Thr)・Serine(Ser)・Cysteine(Cys)・Methionine(Met)・Arginine(Arg)・Lysine(Lys)・Histidine(His)]を加え310Kで1時間攪拌し結合させた。再び、WSC溶液とNHS溶液を順に加え攪拌し、スペーサー分子のカルボキシル基を活性化させた。攪拌後遠心分離(16,000rpm.277K. 20min)し、上澄みと沈殿に分けた。沈殿はMES緩衝液で洗浄した。これに濃度調整した抗CRP抗体溶液を加え、310Kで30分攪拌し結合させた。結合後遠心分離(16,000rpm.277K. 20min)し、上澄みと沈殿に分けた。上澄みは後の操作でラテックスへの抗CRP抗体結合量の定量に使用した。沈殿は同じMES緩衝液2mlに懸濁し、粒子洗浄のため一回結合後遠心分離(16,000rpm.277K. 20min)した。遠心分離後同じMES緩衝液1mlに懸濁し、変性BSAを1ml加え298Kで30分攪拌し、ラテックス粒子表面の抗CRP抗体未結合部位のプロッキングを行った。プロッキング後、pH8.2, 0.1 M Tris-HCl緩衝液に懸濁し未反応活性化カルボキシル基を加水分解した。加水分解後粒子洗浄のため同じTris-HCl緩衝液に懸濁して二回遠心分離(16,000rpm.277K. 20min)した。最終的にTris-HCl緩衝液2mlに懸濁したものを抗CRP抗体化学結合ラテックス試薬とした。

2. ラテックス試薬の評価

作製したラテックス試薬をCRPと反応させ、近赤外比濁法(LPIA法)で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 標準液 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 950 nm の吸光度変化を測定し、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。

3. 臨床的意義の評価

臨床的意義について症例の血清は日本大学医学部駿河台病院よりわけてもらい、同様に測定した。この測定結果から正常値と微量定量の意義を検討した。

【結果・考察】

Amino acid spacer による新規 CRP 抗体固定化方法により低濃度領域では従来の方法と比較して 10 倍高感度なものとなった。

Fig.1 に各スペーサーによる試薬の反応性の結果を示した。今回はタンパク質を構成する主なアミノ酸の中で中性アミノ酸である脂肪族アミノ酸 Gly, Val, Leu とオキシアミノ酸 Ser, Thr, 及び含硫アミノ酸 Cys, Met と塩基性アミノ酸である Lys, His, Arg をスペーサーとした 10 種類で条件検討を行った。反応性が良い順に

Arg>Met>His>Thr>Cys>Lys>Gly>Leu>Val>Ser という結果が得られた。これから各アミノ酸の分類と構造から分けると、塩基性アミノ酸、含硫アミノ酸、オキシアミノ酸、脂肪族アミノ酸の順となりさらに分類の中でも側鎖が長い方が反応性は良いことがわかった。また同じオキシアミノ酸であるのに Thr と Ser で反応性に差が生じた。この 2 種類では、-OH 基の付いている位置が異なる。同じことが含硫アミノ酸の Met と Cys では-S-のジスルフィド結合の位置と側鎖の長さが異なる。今のところスペーサー自身の性質と長さが反応性に影響することがわかった。本研究では他のアミノ酸スペーサーでも同様の実験を行いスペーサーの影響

を検討し、スペーサーの種類の最適化をしてさらなる高感度化を目指したい。

Fig.2 に肝疾患患者で測定を行い、血中 CRP 濃度を示した。これは日本大学医学部駿河台病院との共同研究での例で平均値は 1056 ng/ml、最高値は 6992 ng/ml、最低値は 157 ng/ml でした。肝臓疾患では CRP は肝臓で生産されるため、CRP 産生能の低下が示唆されている。しかし、高感度測定できる本 CRP 濃度測定により、疾患によるこのような高い値の CRP が確認された。このデータから言えることは、肝臓疾患がある人にも肝臓の炎症から CRP が産生されていると考える。このことは新しい CRP 測定の臨床的意義として、肝疾患患者における合併症や治療経過観察に利用できるのではと考えられる。

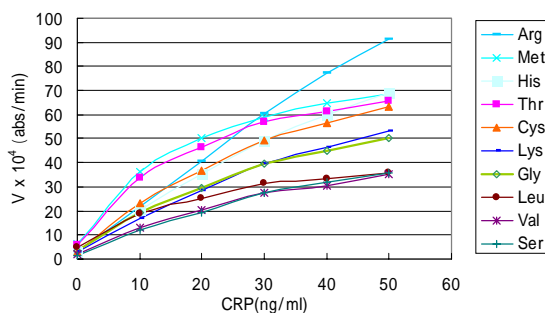


Fig.1 各スペーサーによる試薬の反応性

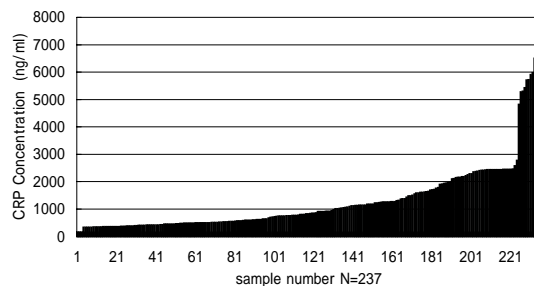


Fig.2 肝疾患患者での CRP 定量測定

【参考文献】

- 1) 福岡良男ら：臨床免疫学，医薬薬出版（1997）
- 2) 高橋伯夫：臨床病理，高感度 CRP 測定法の病態診断的有用性 50，30-39（2002）