

D-dimerの測定による肝疾患の臨床診断薬の開発

日大生産工 (院) ○岡安 由季
日大生産工 神野 英毅

1 緒言

血液は、体外への放出時や負傷時に凝固する（血液凝固作用）。血液の凝固作用は血管の損傷により開始し、これにより血液中の凝固因子が連続する。これによりカスケード反応が起こり、最終的にトロンビンの作用によりFibrinogen (Fg) がFibrin (Fb) へ転換する。このFbが重合してCross-linked Fb とする。血管内においてCross-linked Fb の発現は、血栓の形成を来す。血栓の増大に伴い血栓溶解因子であるPlasminが産出される。このPlasminにより過剰な血栓は分解される（線溶機構）。Fbが分解されるとD-dimer (Fig. 1) を主とするFb分解産物 (Fibrin Degradation Products : FDP) が生成される。

健康状態では、線溶機構が正常に機能するが循環器系疾患を含む血液疾患の伴う場合において、凝固作用と専用機工との均衡が崩れる。これにより、十分な血栓分解が行われずに心筋梗塞、脳梗塞、血栓症静脈炎などの血栓症を引き起こす^{1), 2)}。血栓症の治療目的として、臨床診断におけるLatex凝集反応を用いたD-dimerの精密かつ高感度測定が必要とされている。そして、これらの疾患の迅速な診断を行うことにより早期治療が可能となる。

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。本研究室で扱う化学結合を用いたLatex試薬の特徴として、Latex粒子の表面上に直接抗体を結合させたものよりもSpacer分子を間に導入したものが感度の面からみて安定である事が挙げられる。

また、このSpacer分子をアミノ酸に置き換えLatex粒子の表面と抗体分子との距離をあげることにより、さらに高感度測定が可能となる事が判明した³⁾。そこで本研究では、アミノ酸付加Latex粒子に抗D-dimer抗体を感作させることで高感度

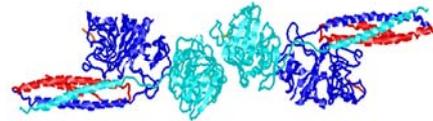


Fig.1 Solid Structure and of D-dimer.

なLatex試薬の開発を行い、さらにD-dimerの精密かつ高感度測定の臨床的意義についても検討する。

2 実験方法および測定方法

【試薬作製法の検討】

○ 物理吸着法

1%のカルボキシル基付加Latex濁液に抗D-dimer抗体 (マウスモノクローナルIgG₁) を加え、カルボキシル基と抗体との結合を行う (27°C, 30min)。さらに、変性BSA溶液を加え、Latex粒子上の抗体未結合部位のブロッキングを行う (27°C, 30min)。遠心分離操作 (160,000rpm, 20min) を行い、沈殿物をbuffer solution (Tris-HCl, pH8.2) で懸濁させて物理吸着Latex試薬とする。

○ 化学結合法 (Arginine Spacerあり)

1%のカルボキシル基付加Latex濁液にWater Soluble Carbodiimide (WSC) 及び N-Hydroxy Succinimidetethyl (NHS) を加えLatex粒子上のカルボキシル基の活性化を行う (27°C, 30min)。さらに、変性BSA溶液を加え、Latex粒子上の抗体未結合部位のブロッキングを行う (27度, 30min)。遠心分離操作 (160,000rpm, 20min) を行い、沈殿物をbuffer solution (Tris-HCl, pH8.2) で懸濁させて化学結合Latex試薬とする。健常者の血漿を用いて、各試薬を用いて数日後とのD-dimer値を測定する。また、各試薬を用いて標準品のD-dimerを測定する事でその反応性について検討する。

【抗D-dimer抗体のpepsin消化】

抗D-dimer抗体溶液 (9.6mg/ml) を酢酸ナトリウム溶液で透析する (0.1M, pH7.0, over night)。

Development of sensitive and simple D-dimer latex reagent and its clinical study in hepatic disease.

Yuki Okayasu, Hideki Kohno

Pepsin (5.0mg) をアルギン酸ナトリウム溶液 (1mg/ml) に溶解する。このpepsinを塩化カルシウム溶液 (0.05mg/ml) にシリンジを用いて滴下し、pepsinの包括 (pepsinビーズの作製) を行う。透析後の抗D-dimer抗体溶液をpH4.2に調製する。調製した抗体溶液にpepsinビーズを加えて攪拌し、pepsin消化を行う (37°C, 2h)。この後、Protein A による精製を行い、Fc部分を除外した。

【F(ab')₂抗体の活性評価】

96穴wellに消化・精製後の抗D-dimer抗体溶液 (0.1012mg/ml) を100μl投入し固層化を行う (37°C, 1h)。PBS-Tによる洗浄を行う (3回)。6%ブロッッキングbuffer (Skim milk) を洗浄したwellに200μl投入し、静置する (37°C, 1h)。PBS-Tによる洗浄を行う (3回)。4000倍希釈の抗原 (D-dimer) 溶液100μlを洗浄したwellに100μl投入し、静置する (37°C, 1h)。PBS-Tによる洗浄を行う (3回)。5000倍希釈の未消化抗D-dimer抗体溶液100μlを洗浄したwellに100μl投入し、静置する (37°C, 1h)。PBS-Tによる洗浄を行う (3回)。5000倍希釈の二次抗体 (Goat anti-Mouse IgG HRP conjugate) 100μlを洗浄したwellに100μl投入し、静置する (37°C, 1h)。PBS-Tによる洗浄を行う (3回)。基質液 (クエン酸一水和物, リン酸水素二ナトリウム,) 12.5mlにOPDおよび過酸化水素2.5μl加える。100μlを洗浄したwellに100μl投入し、遮光静置する (37°C, 20min)。

3 実験結果および検討

Fig. 2にLatex試薬測定法による反応性の違いを示した。化学結合法により作製した試薬は著しい反応性が向上している事が分かる。これはSpacerにより抗体と粒子間での立体障害が少なくなったためと考えられる。Fig. 3に各試薬の作製経過日ごとのD-dimer値を示した。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。しかし、物理吸着法により作製した試薬では、その反応性は著しく低下している。化学結合法で作製した試薬の抗体と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。そのため、日数がたつごとに抗体と粒子が離れたため反応性に違いが

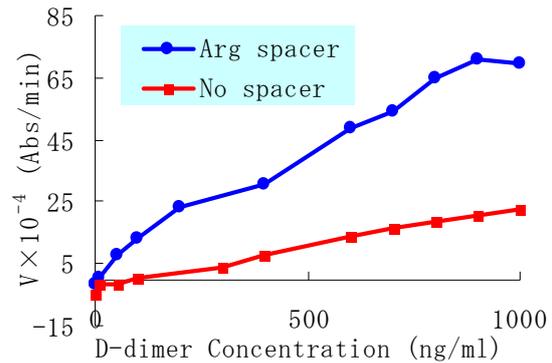


Fig. 2 The effective of spacer conjugated on the surface of latex.

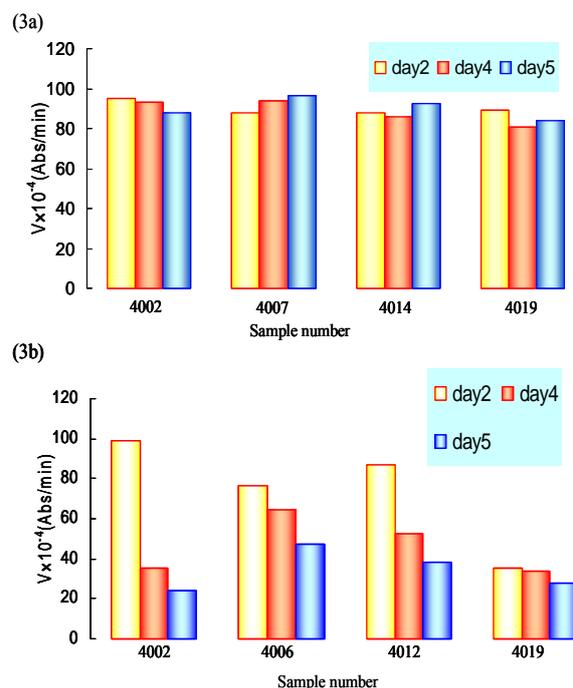


Fig. 3 compression of Stability of latex various reagents .

3a: Amino acid latex reagent

3b: Physical absorption latex reagent

見られたと考えられる。

「参考文献」

- 1) 松田道生, 鈴木宏治, 止血・血栓・線溶, p. 103-177
- 2) 小川哲平, 大島年照, 浅野茂隆, 血液学, p. 41-46
- 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, 日本大学生産工学部応用分子化学科卒業論文発表会, 2006, p. 60