

高感度フロービーズアレイ法によるアディポサイトカインの 全自動迅速測定に関する研究

日大生産工（院）○藤田木綿子 日大生産工（PD） 根本浩史
日大生産工 小森谷友絵 神野英毅

1、緒言

近年、生活習慣の欧米化により、高血圧、肥満、高脂血症、糖尿病、メタボリックシンドローム（代謝症候群）などの生活習慣病は増加する傾向にあり、特に肥満はこのような生活習慣病をはじめとして、数多くの疾患のリスクファクターとなる。そこで疾患の早期発見、リスク管理のために臨床診断の迅速化、簡便化が求められている。

脂肪細胞が分泌するホルモンのアディポサイトカインの1種であるレプチン、及び BMI との相関が報告されている C-Reactive protein (CRP) をマーカータンパク質として高感度かつ特異的に測定することで肥満や成人病のリスク管理が可能である。

これら疾患マーカータンパク質などの測定にはイムノアッセイ（免疫測定法）による定量が行われている。しかし一般的に用いられる LPIA 法や CLEIA 法は、いずれも一試薬一項目の測定しかできない。そこで多項目同時検出と、高精度な迅速測定が達成できる、フローサイトメーターによるフロービーズアレイ法を用いた測定系の構築を検討した。また、測定に用いる担体粒子として磁性粒子を用いることにより、抗体、プローブ等の粒子への反応の際の分離、洗浄作業の大幅な時間短縮が望め、将来的に測定系の全自動化が可能である。

2、目的

レプチンおよびCRPを高感度で迅速に測定するために、磁性粒子を用いたフロービーズアレイ法による全自動同時測定系を構築することを目的とし、最適条件の検討を行う。

3、実験方法

PS-Fe₃O₄ 粒子 (Estapor) に抗 CRP および抗レプチン抗体を感作し、ラテックス試薬を調製した。各ラテックス試薬に抗原を反応させた後、対応する二次抗体を反応させ、更に蛍光標識三次抗体を結合し、サンプルとした。また、各段階での粒子の洗浄・分離は磁性による B/F 分離を行った。各濃度の抗原と反応させたサンプルをフローサイトメーター (Cytomics FC-500, Beckman Coulter) により測定を行い、最適条件の検討を行った。

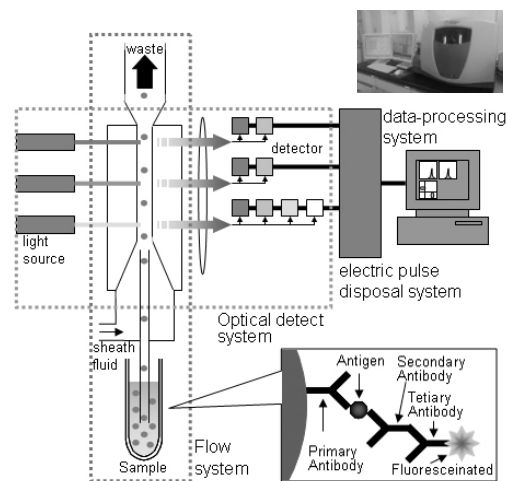


Fig.1 フロービーズアレイ法の原理図

Study on measurement of Adipocytokines by use of High-Throughput Flow-Bead Array method

Yuko FUJITA, Hiroshi NEMOTO, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

4、結果および考察

前回の報告で、フローサイトメーターによるビーズアレイ法を用いた測定系で、定量性および多項目同時測定が可能であることを報告した。しかしながら、感度や操作の煩雑さという点で課題の残る結果となった。今回、磁性 (PS-Fe₃O₄) 粒子を用いることによって、抗体や抗原の粒子への反応の際の分離・洗浄作業を磁性により行うことで、従来の遠心分離にと比較して、2 時間程度短縮することに成功した。

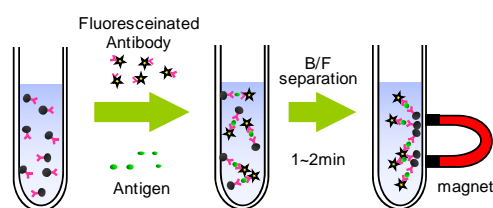


Fig.2 磁性による分離

次に、磁性粒子をフロービーズアレイ法に適用できるか確認を行い、条件検討を行った。

粒子径による反応性の比較では、0.50 μ m～2.37 μ mの 5 種類の大きさの粒子を用いて測定を行った。その結果、粒子一個に対する抗体の数が多くなるため、粒子径が大きい方が蛍光強度が高くなる傾向にあることが判明した (Fig.3)。ここで、反応性の良い 2.37 μ m、1.98 μ m の粒子を用いて試薬濃度を変化させて測定を行った結果、試薬濃度が 0.13(w/v)% 付近が高感度で、検量線の直線性にも優れることが判明した (Fig. 4)。

フローサイトメーターは粒子一個一個の蛍光強度を測定するため、高感度化には個々の粒子が分散して存在する必要性があり、粒子径や濃度が重要なファクターとなり、粒子 1 個 1 個の状態が寄与することが観察された。試薬の調整操作の各段階における最適条件の検討を行った結果、いずれの条件検討においても、従来の粒子と同様の傾向が見られ、測定が可能であることが判明した。

5、結論

従来の粒子を用いたフロービーズアレイ測定と比較して、磁性粒子を用いることによって、高感度化および迅速化に成功した。

本報告では磁性粒子を用い試薬調整を行ったが、これをさらに発展させることで、試薬調整から臨床診断までを全自動化し多項目を網羅的に測定し、診断する必要があるメタボリックシンドロームなどの予防医療に貢献できる。

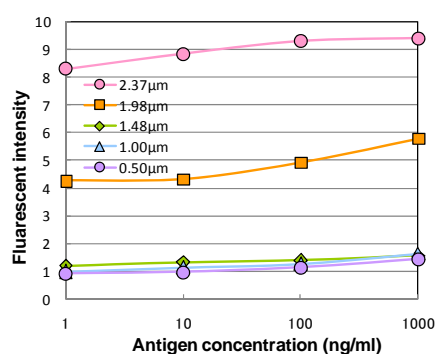


Fig.3 粒子径による反応性比較

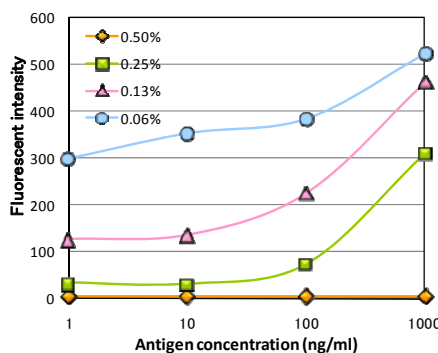


Fig.4 試薬濃度による反応性比較

「参考文献」

- 1)Xiaomei Yan et al. “Microsphere-based duplexed immunoassay for influenza virus typing by flow cytometry” JIM 284 (2004) 27-38
- 2)M.T.Syrjala et al. “Determination of anti-IgA antibodies with a flow cytometer-based microbead immunoassay (MIA)” JIM 139 (1991) 265-270
- 3)Ivan V. Surovtsev et al. “Kinetics of the initial stage of immunoagglutination studied with the scanning flow cytometer”