

サーファクタントフリー乳化重合法を用いて作製した
アミノ基 Latex 粒子による高感度免疫試薬の研究

日大生産工 (院) ○板橋 忠生
日大生産工 小森谷 友絵 神野 英毅

1. 緒言

近年、感染症や生活習慣病患者が増加している。医療現場では、これらサイトカイン関連マーカータンパクなどの微量濃度で迅速かつ高感度測定が行える臨床検査薬が必要とされている。その臨床検査薬として用いられるのが Latex 凝集試薬である。Latex 凝集試薬の測定限界は抗原濃度 5 ng/ml であり、サイトカイン群などの体内中に微量に存在するタンパク質の測定には高感度化が必要である¹⁾。そこで、5 ng/ml 以下で高感度な測定ができる Latex 凝集試薬を作製することで、疾患などの早期発見・予防に期待できる。

Latex 凝集試薬は抗原抗体反応を原理とする測定法で、高分子微粒子に抗体タンパクを感作し作製する。特徴としては血液中など多成分中に存在する微量の抗原タンパクなどの測定に適していることで、混合するだけで反応するため迅速かつ高感度に測定が行えることである。

このような高感度 Latex 凝集試薬を作製するためには、分散安定性かつ抗体との親和性が高い微粒子担体の選択、抗体感作条件による反応性の違いを解明する必要がある。本研究では検体中に微量に存在するサイトカイン群を測定できる試薬を作製するため、それら関連マーカータンパクである CRP をモデル抗原として、それらが存在する 1 ng/ml 以下の濃度で高感度測定が行える Latex 試薬を作製する。そこで、Latex 凝集試薬の材料として、界面活性剤を使わないサーファクタントフリー乳化重合法にてアミノ基 Latex 粒子を作製し、その粒子に抗体を感作させて、抗原と混合し試薬の反応性を検討した。

2. 実験方法

2-1. サーファクタントフリー乳化重合法によるアミノ基 Latex 粒子の合成

合成装置は、200 ml 四つ口セパラブルフラスコに冷却コンデンサ、窒素供給管、マグネティックスターラ、回転円式ホモジナイザ NS-310E (マイクロテック・ニチオン) を装着して恒温

槽中に設置した。容器内を窒素ガスにて置換し、190 ml の脱気済みイオン交換水、15 ml のスチレンモノマーを加え、60°C に昇温し、ホモジナイザを作動させ、スチレンモノマーを乳化分散した後、重合開始剤として 0.46 g の 2,2'-アゾビス (2-メチルプロピオンアミジン) 2 塩酸塩 (AAPH) を添加した。重合開始から 1 時間経過した時点で、ホモジナイザを取り外し、マグネティックスターラで攪拌して重合を行った。9 時間後、スチレンモノマーの重合がゆっくりであったため、0.46 g の AAPH を加えて引き続き重合した。さらに 9 時間後、反応停止し、作製した Latex 粒子は透析し精製した。

2-2. アミノ基 Latex 粒子の特徴

作製したアミノ基 Latex 粒子の粒径はサブミクロン粒子アナライザ N5 (Beckman Coulter)、ゼータ電位はゼータ電位測定装置 ZEECOM ZC-3000 (マイクロテック・ニチオン)、粒子表面に存在するアミノ基量を T.T. Ngo らの方法²⁾ によって測定した。

2-3. 抗 CRP 抗体感作 Latex 試薬の作製方法

作製した 1.48% アミノ基 Latex 粒子を Britton and Robinson 緩衝液 pH3 から 12 にそれぞれ懸濁させ、これに攪拌しながら調製した抗 CRP 抗体を加えて、37°C で 1 時間攪拌し感作させた。感作後、遠心分離し上澄みと沈殿物に分けた。上澄みは後の操作で Latex 粒子への抗 CRP の感作量の定量に使用した。沈殿は pH8.2、0.1 M Tris-HCl 緩衝液に懸濁し、変性 BSA を 1 ml 加えて 37°C で 1 時間攪拌し、Latex 粒子表面の抗 CRP 抗体未感作部位のブロッキングを行った。ブロッキング後、遠心分離し、沈殿は洗浄のためイオン交換水に懸濁して 2 回遠心分離した。最終的にイオン交換水 2 ml に懸濁したものを抗 CRP 抗体感作 Latex 試薬とした。

2-4. 各抗体感作 Latex 試薬の反応性の評価

Latex 免疫比濁法 (LIA 法) を原理として、CRP の定量を行う。各試薬の反応性は CRP 標準血清を使用し、全自動免疫血清検査システム

High-sensitive Immune Reagent by Amino group-containing Latex Particles
Prepared from Surfactant-free polymerization
Tadao ITABASHI, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

LPIA-S500 (ダイヤトロン) を用いて、吸光度変化から求めた。

3. 結果および考察

作製したアミノ基 latex 粒子は、359.9 nm, 多分散指数 0.089, C.V.値 13.4%と単分散性な粒子が得られた。また、この粒子表面に存在するアミノ基の量は2.36 nmol/mg-Latex であった。アミノ基 Latex 粒子のゼータ電位を Fig. 1 に示した。アミノ基 Latex 粒子のゼータ電位がゼロになる pH は、5.6 であり、等電点を 5.6 と決定した。カルボキシル基 Latex 粒子はゼータ電位がゼロになる pH は 0.45 であり、作製した粒子は、アミノ基量と等電点から Latex 粒子表面にアミノ基が存在すると考えられる。

次に、作製した Latex 試薬の反応性を Fig. 2 に示した。抗原濃度 1000 ng/ml において pH3 および pH7 で抗体感作した Latex 試薬の反応性は高く、塩基性で感作した Latex 試薬は低くなった。また、抗原濃度 0.5 ng/ml では、pH 7 において高い反応が得られた。

さらに、各 pH 条件での Latex 粒子表面の抗体の感作量を Fig. 3 に示した。抗体感作量は抗体感作 pH が 3 のときが最も多く、塩基性側では少なくなった。

このことから、抗体の等電点 (pH6 付近) と Latex 粒子の等電点 (pH5.6) が近いとき、抗体感作量が多くなり、抗体の感作量が多いとき、試薬の反応性が高くなる傾向が見られ、抗体の感作量と試薬の反応性に関係があると考えられる。また、pH7 から 10 では抗体の吸着量にほとんど差がないにもかかわらず、反応性に大きな違いが見られる。これは抗体が抗原と反応しやすい状態に Latex 粒子に吸着したためであると考えられる。

以上のことから、本法にて表面にアミノ基を持った Latex 粒子を作製することができ、抗体感作 pH を変えることで、粒子の表面電荷を制御できたといえる。アミノ基 Latex 粒子では、pH7 で抗体を感作することで、目的である抗原濃度 1 ng/ml 以下の領域で測定することができた。したがって、作製したアミノ基 Latex 粒子を用いて、抗体感作 pH を制御することで、抗体の感作量をコントロールすることができた。その結果、感作条件 pH7 では、高感度な Latex 試薬を作製できたと考えられる。

4. 参考文献

- 1) Tomoe KOMORIYA, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**(2), 292-297(2010)
- 2) T.T. Ngo, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **12**, 349-254 (1986)

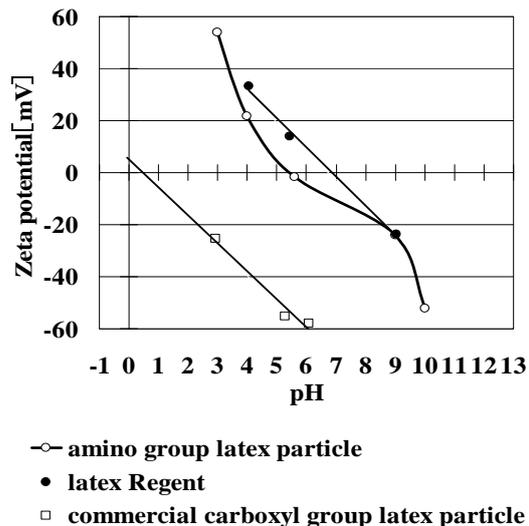


Fig. 1 Isoelectric point of Latex particles

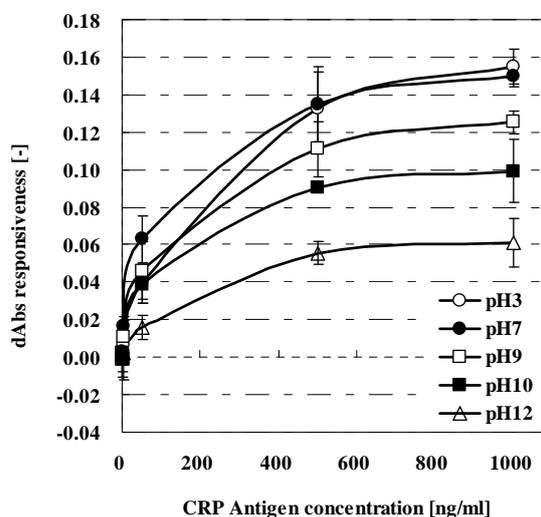


Fig. 2 The reactivity of latex reagent in various pH condition sensitized antibody

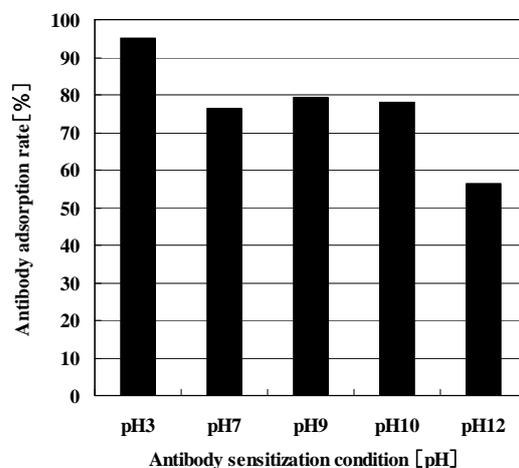


Fig. 3 The amount of absorption antibody on particle (by BCA method)