

抗体カップリング法を用いたラテックス凝集試薬による超高感度 CRP 測定の研究

日大生産工 (院) ○板橋 忠生

日大生産工

小森谷 友絵, 吉宗 一晃, 神野 英毅

【緒言】

今日は患者サービスを向上させる一方で、医療費の削減を図り、効率化、経済性も追求しなければならない厳しい時代を迎えている。従来中央化された検査室で効率よく大量に行われている臨床検査においても、検査を取り巻く環境に変化が起こりつつある。臨床検査は診断、治療に役立つ有益な検査情報を正確精密かつ迅速に臨床医に提供することが使命であるが、臨床検査の基本である「いつでも、どこでも、速く」は現在にいたり、ようやく実現に向けて真剣に取り組まれるようになった。リアルタイム検査による検査データは早期治療の方向づけをするうえで臨床医にとっては症状や現病歴、身体的所見とともに重要な情報であり、これらの機器やキットを用いて医療現場で行うリアルタイムの検査システム（仕組み）が POCT (point of care testing) である¹⁾。

このように、感染症や生活習慣病の患者の増加しており、医療検査では迅速かつ高感度な測定が要求されている。それを解決する方法として、抗原抗体反応を原理とした測定法、ELISA 法やラテックス凝集法がある。ELISA 法は、高感度かつ特異性が高く、血液中など多成分中に微量に存在する抗原タンパクの測定に適している。一方、操作が煩雑であることから、操作性に欠ける。そこで、本研究では、少量の試薬と検体を混ぜるだけで、高感度な測定が行えるラテックス凝集試薬に注目した。

本方法は、炎症マーカーであるサイトカイン

関連マーカータンパクなどを迅速かつ高感度に測定することが可能である。そこで、エルマ販売株式会社との共同研究では、免疫血清学的検査装置の開発および血液中の CRP およびヘモグロビンを定量できるラテックス凝集試薬を作製する。本実験では、ラテックス粒子の表面上の官能基である-COOH 基に、CRP ポリクローナル抗体をカップリング反応して導入し、免疫血清学的検査装置にて CRP 抗原を定量した。

【実験】

1. 化学結合法によるラテックス試薬の作製

ラテックス粒子 1% に、0.05 M MES 緩衝液 1 mL に懸濁させ、これに 20 mg/mL WSC 溶液 2 mL と 50 mg/mL NHS 溶液 0.230 mL を加えて、25°C で 30 分間インキュベートし、カルボキシル基を活性化した。その後、濃度調整した抗 CRP ポリクローナル抗体を加えて、25°C で 30 分間攪拌し化学結合した。反応後、遠心分離し、上澄み液は抗体吸着量の測定に使用した。沈殿物は洗浄し、MES 緩衝液 1 mL に分散させ、dnBSA を加えて、25°C、30 分間攪拌し、ブロッキングを行った。その後、遠心分離し、沈殿物は洗浄して、ラテックス試薬濃度が 1% になるようイオン交換水 1 mL を加えて、ラテックス試薬とした。

2. ラテックス凝集試薬の反応性の評価

免疫血清学的測定装（エルマ販売株式会社）を用いて、専用キュベットに反応緩衝液として検体希釈液 490 μ L と CRP 抗原溶液を 10 μ L を

Study on Ultra High-Sensitive Latex Reagent Prepared from Antibody Coupling Method

Tadao ITABASHI, Tomoe KOMORIYA, Kazuaki YOSHIMUNE and Hideki KOHNO

加えて、濃度調製したラテックス試薬 100 μ L を加えて反応性を確認した。

【結果および考察】

S0198 ラテックス粒子では、粒径 95 nm、カルボキシル基の量は 0.129 mmol/g であり、S0196 ラテックス粒子は、粒径 115 nm、カルボキシル基の量は 0.118 mmol/g、F0191 ラテックス粒子は 157 nm、カルボキシル基の量は 0.200 mmol/g であった。

次に作製したラテックス試薬の反応性は、粒径により S0198 を Fig. 1、S0196 を Fig. 2、F0191 を Fig. 3 に示した。測定した結果、3 つの試薬は CRP 抗原濃度 5 μ g/mL 以上で反応性を示す低感度ラテックス試薬であった。粒径 95 nm と 115 nm は 157 nm より感度が高く、高感度なラテックス試薬を作製できると考えられる。免疫比濁法は、試薬中の粒子と抗原が凝集し、その濁り度を観測する。測定サンプル中に抗原濃度が多い条件では、粒径数 100 nm の粒子を用いることで、測定が可能になる。また、作製した試薬の感度を比較すると、感度が高かったのは粒径 115 nm の粒子である。それは粒径 95 nm の粒子は表面のカルボキシル基量が多いため、抗体の吸着量が適しておらず、一方で粒径 115 nm の粒子は抗体の吸着量が適していたと考えられる。

今後、粒径 95 nm と 115 nm のラテックス粒子で、高感度化および CRP 抗原濃度数 ng/mL から数 μ g/mL の範囲において測定できる試薬に向けて検討する。

【参考文献】

- 1) メ谷直人, 医療機器学, 80(4), 317-324(2010)

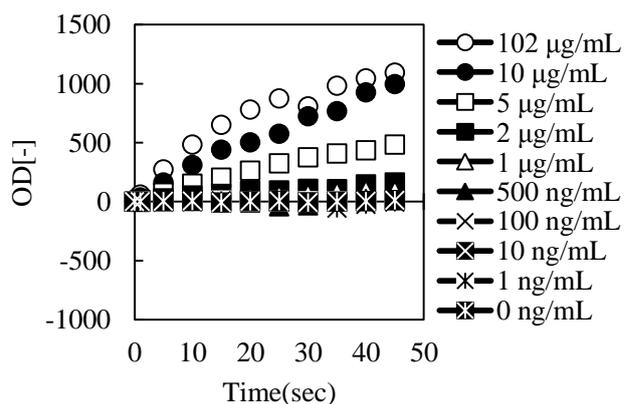


Fig. 1 各 CRP 抗原濃度と 0.4%S0198 ラテックス試薬の反応性

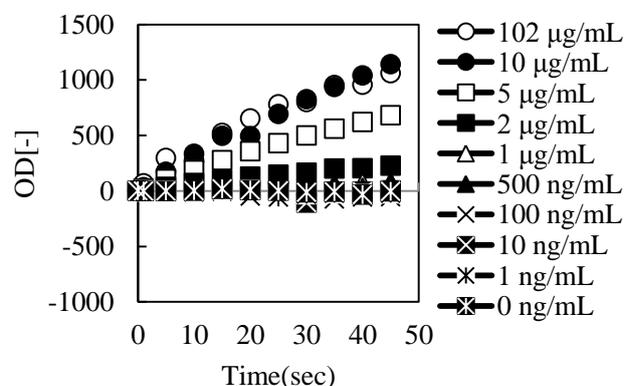


Fig. 2 各 CRP 抗原濃度と 0.3%S0196 ラテックス試薬の反応性

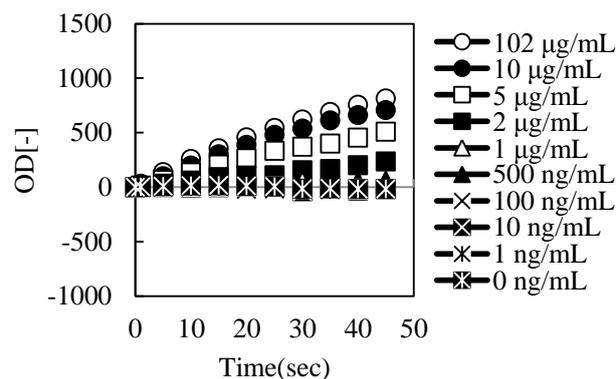


Fig. 3 各 CRP 抗原濃度と 0.2%F0191 ラテックス試薬の反応性