

代謝病における CRP 検査の高感度かつ定量域の広い

ラテックス凝集試薬の研究

日大生産工 (研) ○板橋 忠生

日大生産工 小森谷 友絵 神野 英毅

【緒言】

食文化や環境の変化に伴い生活習慣病や感染症の患者は急増加しており、医療現場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、少量の試薬に検体を混和するだけで、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、炎症マーカータンパク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、CRP 抗原濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ 以下でも高感度測定が可能なラテックス凝集試薬および定量域の広いラテックス凝集試薬を作製することを目的とした。

【実験】

1. 物理吸着法によるラテックス試薬の作製

0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 1 mL に懸濁させたラテックス粒子 1 % (粒径 114 nm、カルボキシ基量 0.118 mmol/g-latex) に、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 分間攪拌し物理吸着させた。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、0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 2 mL に分散させ洗浄した。その後、沈殿物は 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 1 mL に分散した後、1 % 変性 BSA 溶液を加えて、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、0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 2 mL に分散して洗浄を行い、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. 化学結合法によるラテックス試薬の作製

0.05 M MES 溶液 1 mL に懸濁させたラテックス粒子 1 % 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、0.05 M MES 溶液 1 mL に分散させ、1 % 変性 BSA 溶液を加えて、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。

Development of High-Sensitive and Wide Range Latex Aggregation
reagent of CRP in the Metabolic Disease.

Tadao ITABASHI, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

3. 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を用いて、専用キュベットに検体希釈液：CRP 抗原溶液：ラテックス試薬を 49：1：10 の割合で加えて反応性を確認した。

【結果および考察】

物理吸着法と化学結合法によって作製したラテックス試薬の反応性を比較したところ、CRP 抗原濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ において、化学結合法の反応性は 35 $\Delta\text{Abs/sec}$ を示し、物理吸着法の反応性 5 $\Delta\text{Abs/sec}$ より 7 倍くらい高い反応性が得られた (Fig. 1)。そこで、抗体添加量による反応性の検討を行ったところ、CRP 抗原濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ のとき、100 $\mu\text{g/mL}$ 抗体を添加すると反応性は 10 $\Delta\text{Abs/sec}$ であり、200 $\mu\text{g/mL}$ 抗体を添加したときは 50 $\Delta\text{Abs/sec}$ と 5 倍近く反応性の向上が見られた (Fig. 2)。これは 114 nm のラテックス粒子に抗体を感作するとき、200 $\mu\text{g/mL}$ 抗体量を加えた方が粒子表面に感作された抗体が多く、反応性に大きく違いが見られたと考えられる。また、抗体 200 $\mu\text{g/mL}$ 添加して作製したラテックス試薬の測定範囲を検討したところ、CRP 抗原濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ から 100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲にて測定が可能であった (Fig. 3)。

したがって、粒径 114 nm ラテックス粒子 1% に、抗体 200 $\mu\text{g/mL}$ を化学結合する方法により CRP 濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ から 100 $\mu\text{g/mL}$ の領域にて測定可能な試薬が作製できると示唆される。

【参考文献】

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

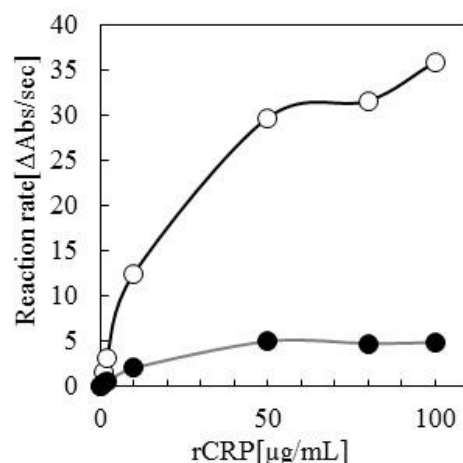


Fig. 1 Comparison of chemical bond with physical adsorption. ○: chemical bond, ●: physical adsorption.

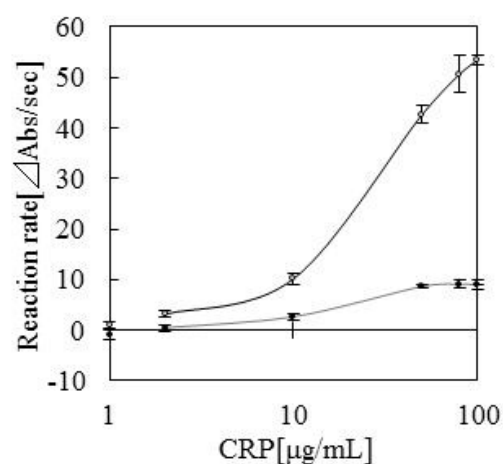


Fig. 2 Examination of latex agglutination reaction. ○: 200 $\mu\text{g/mL}$ antibodies, ●: 100 $\mu\text{g/mL}$ antibodies.

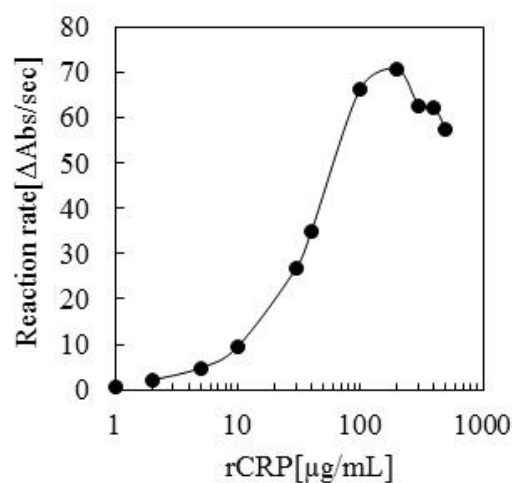


Fig. 3 Verification of measurement range.