

肝疾患における高感度 CRP 測定の臨床的意義

日大生産工 ○小森谷友絵

日大・医 小川眞広・森山光彦

日大生産工 神野英毅

1. 緒言

CRP は、急性組織障害や炎症性疾患、感染症などにより血中濃度は正常値(3.0 mg/L 以下)から数 1,000 倍まで増加し、症状の回復に伴い速やかに減少する。この特徴から CRP 測定は代表的な炎症マーカーとして細菌感染症、膠原病などの炎症性疾患、心筋梗塞、悪性腫瘍などの組織破壊などの判断に繁用されている¹⁾。

ラテックス凝集法の開発により高感度領域 CRP (hs-CRP) 測定が可能となり、動脈硬化病変を基礎とする疾患群では血中 CRP は、微量であるが高濃度に存在することが明らかとなった。CRP が血管の動脈硬化を反映し高値を示すことから、現在、高感度 CRP 測定は、冠動脈疾患を有さない健常人および、心血管患者における心臓死、急性心筋梗塞、急性冠症候群、脳卒中などの心血管事故を発症する予知因子として有用とされている。そのため、心血管事故を予測する上で従来の CRP 測定感度を高めた高感度 CRP 測定試薬が必要とされている²⁾。

我々は、アミノ酸スペーサー法や Epitope 解析を用いて高感度なラテックス試薬の作製に成功し、従来と比較し 20 倍の感度を得た。本研究では、開発したラテックス試薬を用いて肝炎疾患における血中 CRP 濃度を測定し、CRP の新規臨床的意義を検討した。

2. 実験方法

2-1. ラテックス試薬の作製方法と CRP 測定

1%カルボキシ基修飾ラテックス懸濁液に WSC (Water soluble carbodiimide) 溶液と NHS (N-Hydroxysuccinimide) 溶液を攪拌しながら順に加え、298K で 30 分攪拌した。その後、pH6.5, 0.05 M MES 緩衝液で調製したグリシンを加え 310K で 1 時間攪拌し結合させた。再び、WSC 溶液と NHS 溶液で活性化させ、MES 緩衝液で懸濁後、濃度調整した抗 CRP 抗体溶液を加え、310K で 30 分攪拌し結合させた。その後、変性 BSA にてブロッキングし、pH8.2, 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 2 ml に懸濁し、抗 CRP 抗体化学結合ラテックス試薬とした。

ラテックス試薬の評価、検体中の CRP 測定には全自動免疫血清検査システム LPIA-200 (Mitsubishi kagaku Iatron, Japan) を用いた。

2-2. 標準 CRP と臨床検体

臨床試験で用いた血清は、駿河台日本大学病院においてインホームド・コンセントが得られた健常者 62 名、および 2005 年 4 月から 2009 年 3 月において同病院で治療中の肝疾患患者 1071 名の血清を対象とした。また、B 型および C 型ウイルス感染由来の疾患であり、肝細胞ガン以外の合併症を有しない血清サンプルを用いた。さらに、肝疾患血清サンプルは、慢性肝炎 (CH)、肝硬変 (LC) と、またそれらの各肝細胞ガン合併の 4 つのグループに分類した。その内訳は、54 サンプル、32 サンプル、51 サンプル、934 サンプルであった。標準 CRP は、Human Serum CRP (Dako Co. Ltd., Denmark) を用いた。

Clinical Significance of High Sensitivity CRP Measurement in Liver Disease

Tomoe KOMORIYA, Masahiro OGAWA, Mitsuhiro MORIYAMA and Hideki KOHNO

3. 結果

3-1. 臨床検体による試薬の性能評価

ランダムに抽出した肝疾患患者 263 検体の CRP 値を CRP ポリクローナル抗体、ペプシン消化による F(ab')₂ 型ポリクローナル抗体を用いて作製したラテックス試薬と市販のラテックス試薬を用いて測定し比較した。その結果を Fig. 1 に示す。本研究で作製したラテックス試薬は、ポリクローナル抗体の Fc 部分をペプシンにて消化することにより作製した F(ab')₂ 抗体を使用することにより、市販されている試薬と同等の CRP 値を示し、抗体のペプシン消化は必須でることがわかった。

3-2. 肝疾患患者血清中の CRP の測定とその臨床的意義の検討

肝疾患患者血清中の CRP を測定した結果、慢性肝炎は平均値 0.825 µg/mL (中央値: 0.329), 肝硬変は、平均値 1.061 µg/mL (中央値: 0.616), 慢性肝炎と肝細胞ガンの合併症は、平均値 1.982 µg/mL (中央値: 0.666), 肝硬変と肝細胞ガンの合併症は、平均値 2.356 µg/mL (中央値: 1.04) であった。慢性肝炎、肝硬変疾患ともにガンが合併することにより CRP 値は上昇し、危険率 P は 0.05 以下となり、明らかな有意差があった。また、慢性肝炎と肝硬変における CRP 値を比較すると肝細胞ガンの有無に関わらず、わずかであるが肝硬変の方が高い CRP 値を示した。

以上の結果より、肝疾患の病態が重症化進行するに従い、CRP 値の上昇傾向が観測され、肝疾患における微量 CRP 変動を測定することは、臨床的に意義があると言える。

参考文献

- 1) Ridker, P. M., *Circulation* **2001**, 103, (13), 1813-8.
- 2) Rifai, N.; Tracy, R. P.; Ridker, P. M., *Clin Chem* **1999**, 45, (12), 2136-41.

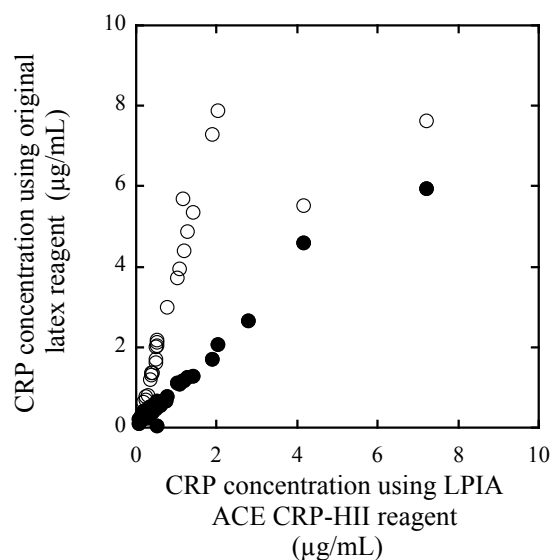


Fig. 1. Correlation between CRP concentrations obtained using LPIA ACE CRP-H II reagents and those obtained using prepared latex reagents containing the IgG polyclonal antibody (○), F(ab')₂ polyclonal antibody (●).

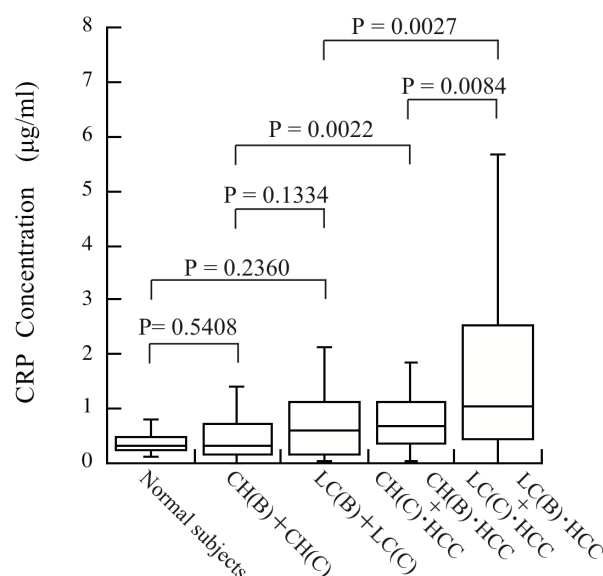


Fig. 2. CRP serum concentrations (µg/mL) for patients with chronic hepatitis (CH), liver cirrhosis (LC), CH with HCC, LC with hepatocellular carcinoma (HCC) and healthy subjects, presented as box (representing the 25th to 75th percentile, containing the median line) and whisker plots.