

Lecithin/Cardiolipin 感作 Latex 試薬における Lecithin の影響

日大生産工 ○小森谷友絵 日大・医 小川眞広
日大・医 荒川泰行 日大生産工 神野英毅

1. 緒言

て当初は梅毒患者血清に見られていた。梅毒の病原体である *Treponema pallidum* が生体内に感染すると、病原体に対する抗体とともにリン脂質と反応性を持つワッセルマン抗体(抗リン脂質抗体)が産生される¹⁾。

近年、抗リン脂質抗体の存在が、反復性の流産、動・静脈血栓症、血小板減少症などと密接に関連していることが判明し、これらの自己抗体と特有の病態を示す症例は抗リン脂質抗体症候群(APS)と呼ばれている^{2,3)}。この APS により、抗カルジオリピン抗体が病態に応じて増減することが知られている。このことから、カルジオリピン抗体を高感度に測定することが臨床学的に重要であることがわかる。

本研究では、検体をそのまま使用し、迅速性・簡便性に優れているラテックス凝集法を用いて、その定量を行った。Latex 粒子と脂質抗原を混合し乾燥させることにより強制的に吸着をさせ、脂質抗原の固定化を行った。その方法により感度良い Latex 試薬を作製することができたので、その方法、反応性を報告する。

2. 実験方法

2-1. 脂質感作 Latex 試薬の作製方法

Latex particle と脂質抗原溶液(カルジオリピン、レシチン)を素早く混合し、アスピレーターを用いて溶媒を乾燥除去した。乾燥ラテックス粒子に BSA 溶液を加え、超音波を用いて乾燥した Latex を再懸濁した。その後、マグネチックスターラーで 30 分間攪拌をし、脂質抗原を Latex 粒子に吸着させた。遠心分離器を用いて Latex 試薬を洗浄し、濃度の調製を行い、試薬を完成させた。

抗リン脂質抗体は、リン脂質に対する抗体とし

2-2. 試薬の反応性の検討(測定法)

サンプル(RPR 標準血清、極東製薬) 30 μ l に 0.06%脂質感作 Latex 試薬 40 μ l を加え、さらに Buffer 1 (0.1M Tris-HCl) μ l を加える。その後、Latex とともに Buffer 2 μ l (0.1M Tris-HCl) を加える。これらの操作はサンプルを調製する以外は全自動免疫分析装置によって自動的に行われる。凝集反応は 950nm の波長により濁度変化として測定し、その値はサンプル中の抗体濃度と対応する。その凝集反応速度をラテックス試薬ごとに比較し、試薬の反応性の検討を行った。

3. 結果と考察

3-1. 脂質抗原濃度の検討

脂質抗原中のカルジオリピンとレシチンの濃度を変化させて Latex 粒子に固定化することにより、その最適濃度の検討を行った。

Fig. 1 にカルジオリピン濃度の Fig. 2 にレシチン濃度の検討結果を示した。カルジオリピンの最適濃度は 0.20mg/ml、レシチンの最適濃度は 0.1mg/ml となった。また、レシチンのみを固定化した Latex 試薬は、まったく凝集反応を示さなく、カルジオリピンのみを固定化した試薬は、わずかに反応性を示した。

よって、本疾患の免疫反応性はカルジオリピンにあるが、レシチンの添加により反応性が向上したことから、抗原性は複合脂質にあり、さらに、カルジオリピンとレシチンの組成は 1 : 5 が良いことがわかった。

3-2. Latex 粒子径の検討

JSR 社製の粒径 0.31 μ m ~ 1.12 μ m の Latex 粒子を用い脂質感作 Latex 試薬を作製し、RPR 標

Immunoreactivity of Lecithin Covered Latex in Serum Testing

Tomoe KOMORIYA, Masahiro OGAWA, Yasuyuki ARAKAWA and Hideki KOHNO

準血清と反応させた。0.31 μm の Latex 粒子は RPR 標準血清の R.U. 値が低濃度から高濃度まで比例的に反応することが確認できた。また、Latex の粒子が大きくなると高濃度側での反応上昇が見られず、さらに Latex 粒子が大きくなるにしたがい粒径と測定波長が近くなるため凝集反応が検知されにくくなることを確認した。RPR 標準血清において陽性陰性のカットオフ値は 1.0 R.U. である。よって 1.0 R.U. が測定可能かどうか重要となる。粒径 0.31 μm の Latex では 1.0 R.U. の測定が不可能であるため、この試薬を作製するためには、0.47 μm の粒径が有用であることがわかった。

3-3. レシチンの検討

さらなる反応性の向上を目指し、レシチンの種類の検討を行った。その結果を Fig. 3 に示す。用いたレシチンは化学合成である炭素鎖の異なる単一成分のレシチン (C12,14,16,18) 不飽和を持つレシチン (C18:1) と Native のレシチン 7 種である。

飽和型と不飽和型を比較すると不飽和型のレシチンの方が良好な反応性を示した。これは、生体内のレシチンは不飽和型が多く存在していたためであり、化学合成レシチンより Native のレシチンの方が、高い反応性を示した結果からもわかる。

また、炭素数の違いにより反応性に大きな影響を与えることがわかった。最も反応性の高かった炭素数は 14 である。これらより、脂質の抗原性は、細胞膜の外側形成する親水部の違いだけでなく、疎水部にも依存していることが示唆された。

4. 臨床的評価

作製した Latex 試薬を用いて実検体中(健常者 (N=30)、眼科領域における加齢性黄斑変性症 (AMD) 患者 (N=9)) の抗リン脂質抗体の測定を行った。その結果、わずかではあるが AMD 患者において抗リン脂質抗体の増加が確認できた。AMD における新しい検査としての抗リン脂質抗体の測定は症例が少ないながら臨床的意義が示唆され、さらに多くの症例を研究する必要がある。

参考文献

1) Mie Matsumoto etc., Clin. Chem. Vol.39(8), pp.1700-1705, 1993

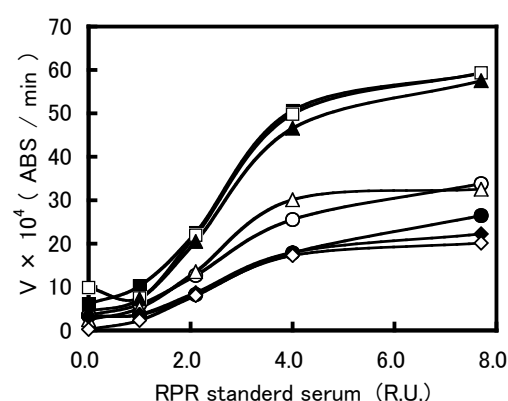


Fig. 1 Comparative study of various cardiolipin concentration

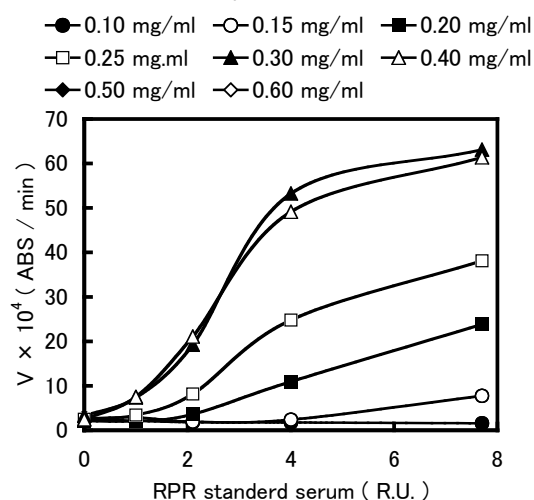


Fig. 2 Comparative study of various lecithin concentration

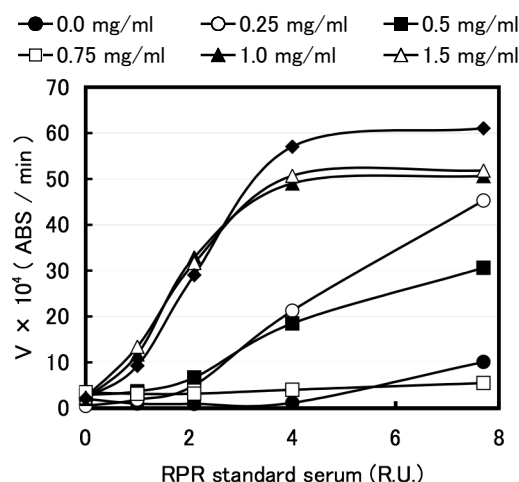


Fig. 3 Comparative study of various lecithin group

2) 鍋木淳一、臨床免疫、Vol.30(9)、pp.1230-1235、1998

3) Juzo Matsuda etc., British Journal of Haematology, Vol. 85, pp.799-802, 1993