Amino acid spacerを用いたC-reactive protein(CRP)定量の高感度化と臨床的意義の研究

日大生産工(院)　○伊藤　逸雄
日大生産工　小森谷　友絵，神野　英毅

【緒論】

臨床検査に用いられている C-反応性タンパク(CRP)は、通常正常ヒト血清中でも微量(平均580ng/ml)に存在し、炎症性疾患や組織の変性・壊死が生じるとさらにCRP血中濃度が上昇し、病状の回復に伴い速やかに減少する特徴をもつ。急性期タンパクの代表的な検査の一つで細菌感染、組織損傷などが原因で上昇する炎症マーカーとしてその測定は広く臨床的に利用されている[1]が、新規な臨床的意義を研究するため高感度化の必要がある。従来法のCRP測定は、急性炎症時における通常時からの大幅な濃度上昇を測定していたので、感度に優れた測定法はあまり必要とされなかった。しかし、近年ラテックス凝集法などの高感度 CRP 測定法の開発により、CRP 濃度を低濃度域で精密に測定することが、心筋梗塞や新生児感染症の予知マーカーなどのさまざまな疾患との関係性も注目されはじめた[2]。したがって、高感度ラテックス試薬に対する需要が今後増すことが予想される。

【目的】

本研究は作製法、主にアミノ酸をスペーサーとして修飾したラテックスを用いてラテックス試薬を作製して比較検討し高感度化した。さらにその中のグリシンをスペーサーとしたラテックス試薬で正常者、患者血清 (加齢黄斑変性症・肝炎)で実際測定し比較検討した。

【実験方法】

1. <u>amino acid spacer によるラテックス試薬の作製</u>

1%カルボキシル基修飾ラテックス懸濁液にWSC(Water soluble carbodiimide)溶液と NHS (N-Hydroxysuccinimide) 溶液を撹拌しながら順に加え、298K で 30 分撹拌しラテクッス表面のカルボキシル基を活性化させた。活性化後 pH6.5, 0.05 M MES 緩衝液で洗浄し、その後に MES 緩衝液で 1.33×10^{-4}mol/ml に調製した各スペーサー分子グリシンを加え310Kで1時間攪拌し結合させた。再び、WSC 溶液と NHS 溶液を順に加え撹拌し、スペーサー分子のカルボキシル基を活性化させた。攪拌後遠心分離し、上澄みと沈殿に分けた。沈殿はMES緩衝液で洗浄した。これに濃度調整した抗CRP抗体溶液を加え､310K で 30 分撹拌し結合させた。結合後遠心分離し、上澄みと沈殿に分けた。上澄みは後の操作でラッテクスへの抗CRP抗体結合量の定量に使用した｡沈殿は同じMES緩衝液2mlに懸濁し、粒子洗浄のため一回結合後遠心分離した。遠心分離後同じMES緩衝液 1ml に懸濁し、変性BSA を 1ml 加え 298K で 30 分撹拌し、ラテックス粒子表面の抗CRP抗体未結合部位のブロッキングを行った。ブロッキング後、pH8.2, 0.1 M Tris-HCl 緩衝液に懸濁し未反応活性化カルボキシル基を加水分解した。加水分解後粒子洗浄のため同じ Tris-HCl 緩衝液に懸濁して二回遠心分離した。最終的にTris-HCl緩衝液2 ml に懸濁したものを抗CRP抗体化学結合ラテックス試薬とした。

<u>2.ラテックス試薬の評価</u>

作製したラテックス試薬をCRPと反応させ、近赤外比濁法 (LPIA法) でその凝集反応速度を測定した。測定には全自動免疫血清検査システム LPIA-200 を用いた。測定キュベット内に、抗原

Study on High Sensitive Quantitation of C-reactive protein (CRP) Latex Test and its Clinical Significance by Amino Acid Spacer Conjugated

Itsuo ITOH, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

CRP 標準液 30μl、反応緩衝液 230μl、ラテックス試薬 40μl を分注し、12 秒毎に 10 分間波長 950 nmの吸光度変化を測定し、スペーサーの異なる感作ラテックス試薬の平均反応速度から検量線を作成した。それをもとに CRP 定量と検出限界を測定し高感度化を検討した

3. 臨床的意義の評価

臨床的意義について症例の血清は日本大学医学部駿河台病院よりわけてもらい、同様に測定した。この測定結果から正常値と微量定量の意義を検討した。

【結果・考察】

Fig.1 から Amono acid spacer による新規 CRP 抗体固定化方法により低濃度領域では従来の方法と比較して５倍高感度なものとなった。今後は、より多くの観点から作製した試薬が実用上有用なレベルか、既存の方法に比べ新規性、向上性を比較検討する。

我々のラテックス試薬で CRP は、どのように反映するかということで、加齢黄斑変性症といった炎症性を持つ、眼の網膜の疾患検体で CRP を測定した。Fig.2 から検体数 32 で平均値 867ng/ml、最高値　2694ng/ml、最低値 327 ng/ml と、健常者 CRP 血中濃度と比較し、400ng/ml 程度 CRP 濃度が高いことがわかりました。CRP の生物学的活性は十分解明されていないが、T リンパ球に結合し組織を抑制することが報告されていることなどから、CRP が加齢の進むにしたがって増加する傾向がみられるのは免疫能に関与していることを示唆するものである。

Fig.3 に肝疾患患者で測定を行い、血中 CRP 濃度を示した。これは日本大学医学部駿河台病院との共同研究での例で平均値は 1254ng/ml、最高値は 14419ng/ml、最低値は 324 ng/ml でした。肝臓疾患では CRP は肝臓で生産されるため、CRP 産生能の低下が示唆されている。しかし、高感度測定できる本 CRP 濃度測定により、疾患によるこのような高い値の CRP が確認された。このデータから

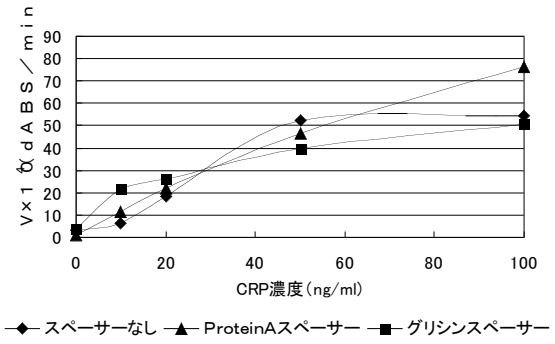

Fig.1 新規 CRP 抗体固定化法と従来法

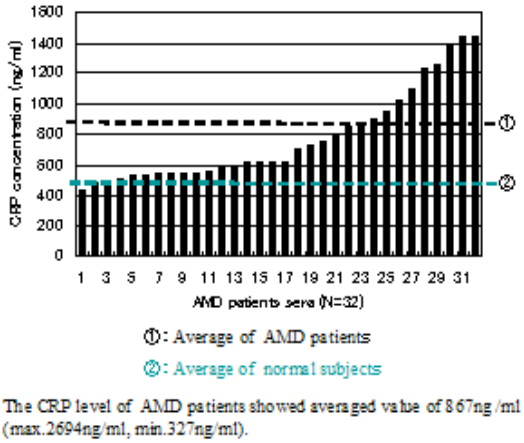

Fig.2 加齢黄斑変性症での CRP 定量測定

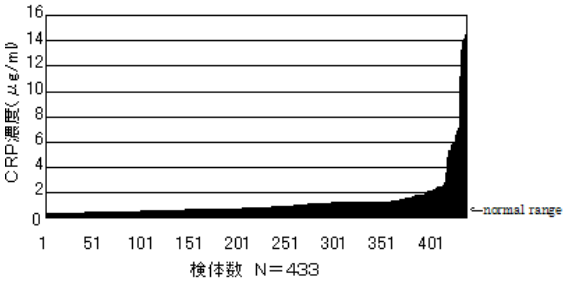

Fig.3 肝疾患患者での CRP 定量測定

言えることは、肝臓疾患がある人にも肝臓の炎症から CRP が産生されていると考える。このことは新しい CRP 測定の臨床的意義として、肝疾患患者における合併症や治療経過観察に利用できるのではと考えられる。

【参考文献】

1) 福岡良男ら ： 臨床免疫学, 医葉薬出版 (1997)

2) 高橋伯夫 ： 臨床病理, 高感度 CRP 測定法の病態診断的有用性 50, 30-39 (2002)