

Amino acid spacer を用いた C-reactive protein(CRP)定量の高感度化と

肝疾患・糖尿病患者における新規臨床的意義の研究

日大生産工

○小森谷 友絵

日大生産工

神野 英毅

【緒論】

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。そのため、急性期タンパクと呼ばれ、その代表的な検査の一つであり、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⁾。

従来法の CRP 測定は、急性炎症時における通常時から的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】

本研究は各種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、スペーサーによる反応性の比較検討をした。さらにグリシンをスペーサーとしたラテックス試薬を用いて健常者、患者(肝炎・糖尿病)血清中の CRP 濃度を測定し比較検討した。

【実験方法】

1. amino acid spacer によるラテックス試薬の作製

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)溶液を攪拌しながら順に加え、298K で 30 分攪拌しラテックス表面のカル

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 溶液を順に加え攪拌し、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 分攪拌し結合させた。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テックスへの抗 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 分攪拌し、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。

2. ラテックス試薬の評価

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 CRP 標準液 30 μ l、反応緩衝液 230 μ l、ラテックス試薬 40 μ l 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

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

Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

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は、日本大学医学部駿河台病院との共同研究により供与された正常者・肝疾・糖尿病患疾患から採血した血清を用い、上記と同様の方法で測定をした。また、CRP が高濃度の患者血清は BSA (1%) を含んだリン酸緩衝生理食塩水にて適宜希釈を行った。この測定結果から正常者と疾患患者の CRP 値とを検討し、微量定量の臨床的意義を検討した。

【結果・考察】

アミノ酸 20 種と合成したペプチド(グリシンを 5 つ結合 : Gly5) をスペーサー分子としてそれぞれ作製した試薬の反応性の結果を Fig. 1 に示す。Gly5 と Arg の時、直線的な良好な検量線が作成できた。また再現性により、安定した測定が可能な最低 CRP 濃度は 10 ng/ml であった。

Fig2 に本研究にて作製した試薬と LPIA-H II (三菱化学ヤトロン) にて肝疾患患者の血清中の CRP 濃度を測定した結果を示す。患者検体は日本大学医学部駿河台病院との共同研究により患者よりインフォームド コンセントをとり、供与されたサンプルである。検体数の 5% 程度の CRP 値において試薬による差異がみられたが 0.75 の相関性が得られた。

Fig3 に健常者、慢性肝疾患患者、糖尿病患者(炎症なし) の血清 CRP 値測定を行った結果を示す。健常者と比較し、検体数は少ないがそれぞれの疾患において高い CRP 値が示された。

以上の結果よりこれらの疾患において CRP を測定することは臨床的に有効であると考えられ、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, 医薬薬出版 (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)

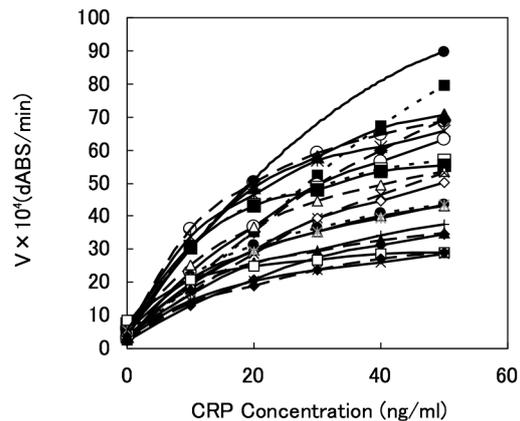
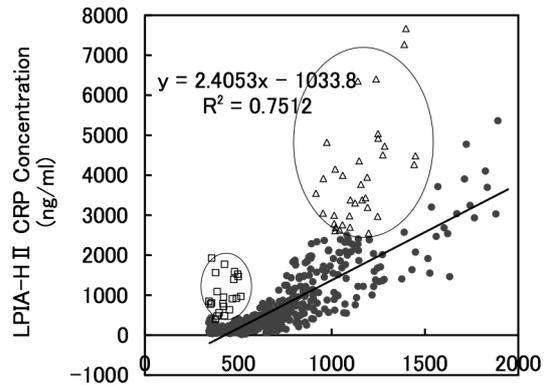
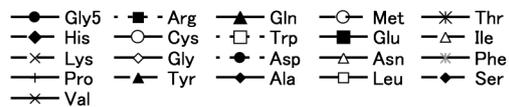


Fig. 1. Comparative study of various amino acid spacers



Our reagent recombinant CRP Concentration (ng/ml)
Fig. 2. Correlation of LPIA CRP-H II with our latex reagent

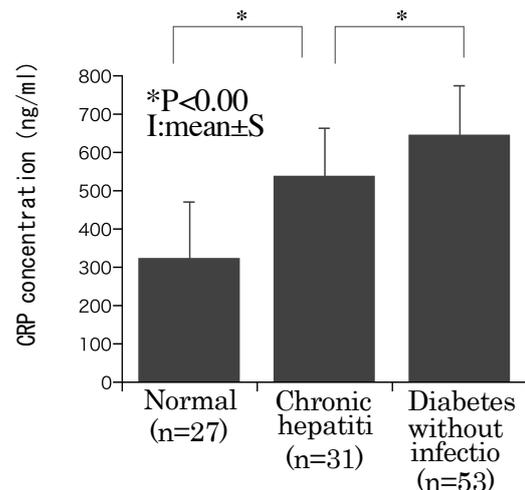


Fig. 3. CRP values in liver disease and CM (without infection)
3) I. Ito, etc.: Clinical chemistry program and Abstract, 52 (S6), A-16, (2006)