

高感度ケミルミ法によるアジポサイトカインの臨床検査的研究

日大生産工（院）○関口 敏史 日大生産工 神野 英毅

1 緒言

現在、医療機器ならびに医療技術の向上により、早期発見することで多くの疾患を治療できるようになって来ている。それに伴い、今まで以上に臨床や定期的な健康診断における診断結果の迅速な提示が必要とされている。その検査対象として、生体を循環し多くの情報（タンパク質）を有している血液は、最も有効な診断材料である。その為、全血または血清を対象とした迅速かつ簡便な診断薬が多種多用に製品化されている。

血液検査において immunoassay(免疫分析)は、血中に含まれる特定タンパク質を抗体の結合特異性を利用して定量する分析手法である。その例として、抗原と放射性元素で標識した抗体とが競合的に結合することを利用、結合した複合物質の放射能を測定して微量物質を定量する放射性免疫分析法（RIA）、抗体または抗原をプレート上に固定化し対象物質と結合後、酵素で標識した二次抗体と反応させ酵素基質を添加、酵素による発色反応を定量する酵素免疫測定法(ELISA)、抗体または抗原を微粒子上に結合させ対象物中の標的物質との反応による凝集過程を濁度として定量する免疫比濁法(LPIA)などが挙げられる。¹⁾

2 背景

近年、生活習慣の欧米化により生活習慣病と呼ばれる糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化症といった病態を呈する人口が増加している。その背景には過剰な脂肪組織の蓄積が原因であると考えられるようになってきている。脂肪組織は、摂取した余剰エネルギーを蓄えるエネルギー備蓄装

置として働いているだけでなく、糖脂質代謝や血圧調整、血栓形成など様々な生理活性を持つアディポサイトカインを分泌する生体内で最大の分泌内臓器として再認識されるようになってきている。アディポサイトカインの1つである

Leptin は、食欲抑制やエネルギー消費亢進作用のほかに、交感神経系の活性化を介した血圧上昇作用や糖脂質代謝改善作用、神経内分泌調整作用など、生理機能の調整に広く関与していることが明らかになっている。血中 Leptin 濃度は肥満動物やヒト肥満者において著しい上昇が認められ、ヒトにおける体格指数(BMI)や体脂肪率と良好な正の相関関係を示す。従って血中 Leptin 濃度は体脂肪量や全身エネルギー状態の優れた指標になると考えられる。²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ 結果、血中 Leptin 濃度を知ることは今後の糖尿病や高脂血症、脂肪肝など幅広い代謝疾患を対象に Leptin の臨床応用が展開していく上で重要な指標となると考えられる。

3 目的

これまで本研究室では、ラテックス粒子と抗体間にアミノ酸をスパーサーとして介することで LPIA 法における試薬の高感度化の検討を行ってきた。本研究ではさらに高感度測定可能な ELISA 法と迅速かつ簡便な LPIA 法の両者の特徴を備えた CLEIA 法(Chemi luminescent Enzyme Immunoassay)に注目し、高感度・迅速診断法の確立を目的に新たな試薬の検討を行なう。

3 実験

【ALP 標識抗体の作製】

抗体の ALP 標識には Alkaline-Phosphatase

Study on chemiluminescent enzyme immunoassay
for the measurment of adipocytokines

Satoshi SEKIGUCHI , Hideki KOHNO

Labeling Kit-SH (Dojin)をもちいてヒンジ法により行なった。

【抗体感作磁性粒子の作製】

遠心管(Centrifuge ware PC, NALGENE)に MES Buffer(0.05M pH5.6)を 2ml 入れさらに磁性粒子 (FERRI SPEHRE 100C, NIPPON PAINT)150 μ l 加えた後、遠心分離を行い粒子を洗浄した。沈殿物に再び同 MES Buffer 1ml、WSC (20mg/ml) 2ml、NHS (50mg/ml) 0.23ml を順に加え 27℃で 30 分間攪拌、表面のカルボキシル基を活性化させた。活性化後、MES Buffer (0.05M pH5.6)を 2ml で洗浄し、抗体溶液 30 μ l (5mg/ml)を加え、37℃で 30 分間攪拌、抗体を結合させた。結合後、遠心分離し沈殿物を再び洗浄した。また、その際の上清から抗体の結合量を BCA 法により算出した。上記の沈殿物を同 MES Buffer 1ml に懸濁した後、変性 BSA 溶液(1.5 (w/v)%) 1ml を加え 27℃で 30 分間攪拌し、粒子表面の Blocking を行なった。Blocking 後、遠心分離し 0.1M Tris-HCl Buffer(pH8.2)に懸濁し未反応の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 Tris-HCl Buffer 2ml に懸濁し洗浄を二回行なった。最終的に同 Tris-HCl Buffer で濃度調整したものを抗体感作磁性とした。作製した試薬の測定は、LUMIPULSE *f*にて発光量を測定、検量線を作成した。

【結果および考察】

抗体の磁性粒子に対する結合率は約 96%であった。作製した試薬を用いた CRP の測定結果を Fig.1 に示した。抗原濃度 0~1000ng/ml の範囲において定量的な検量線をえることができた。しかし、ベースラインが高値を示している事が明らかとなった。この原因として二つの事が考えられる。

第一に polyclonal 抗体を用いている事である。polyclonal 抗体の特徴である高い反応性であるが、非特異的な反応が起きていると考えられ、これを改善するために特異性の高い monoclonal 抗体を用いることが考えられる。

第二に、抗体を IgG の状態で感作させている事

が考えられる。IgG は、生体内で IgG 同士の吸着をする特徴をもつ。これは補体活性などを引き起こす重要な役割を果たしている。しかし、この吸着は免疫測定において特異性を低下させる原因として考えられる。したがって pepsin 消化による F(ab)₂を用いた抗体を感作させることで特異性が向上すると期待される。

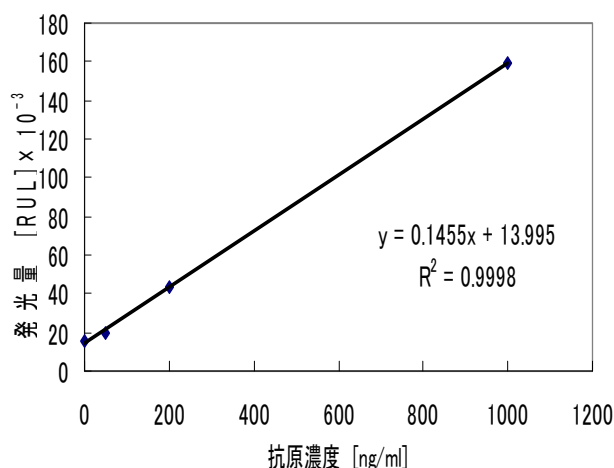


Fig.1 LUMIPULSE *f*による測定結果

【参考文献】

- 1) 浦山 修 臨床検査学講座 第二版 臨床化学検査学 医歯薬出版(株) 86-94
- 2) 嶋津 考 他 Adiposcience フジメディカル出版 15~35
- 3) Ivana Dostalova, Mc.Sc, Marie kunesova, Adipose tissue resistin levels in patients with anorexia nervosa , NUTRITION22 (2006) 977-983
- 4) N.Presle, P.Pottie, Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis.Contribution of joint tissues to their articular production. Osteoarthritis and Cartilage 14 (2006) 690-695
- 5) N Al-Daghri, R chetty , Serum resistin is associated with c-reactive protein &ldl cholesterol in type2 diabetes and coronary artery disease in a Saudi population. Cardiovascular Diabeteology 4 (2005)