

超高感度 CRP 測定試薬の開発 — amino acid spacer 鎖長の検討 —

日大生産工 ○小 森 谷 友 絵, 神 野 英 毅

1. はじめに

CRP (C-reactive protein) は、正常ヒト血清中において CRP は、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、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。CRP 測定は、従来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ため、感度に優れた測定法はあまり必要とされていなかった。しかし、近年、動脈硬化症が血管の炎症である可能性が指摘され、CRP 濃度は血管内皮の機能障害の程度と相関していることが示された。また、狭心症発作や心筋梗塞発作などの危険因子として新たな臨床的意義が報告されるなど、あらためて CRP 高感度測定の意義が注目されている^{1)~4)}。そのため、より精度良く、高感度な CRP の測定法が求められている。

我々は、検体と試薬を混合するのみで定量可能なラテックス凝集法を利用した CRP の高感度定量を行った。前発表では、アミノ酸のスペーサーを用いたラテックス試薬の作製を行い高感度 CRP を測定することを発表し、本発表では、さらに、アミノ酸スペーサーの鎖長について検討したので報告する。また、本試薬を用いて健康者、肝疾患患者、糖尿病患者血清中の CRP を測定し、試薬の有用性そして新規臨床的意義について検討を行った。

2. 実験方法

2-1. 抗 CRP 抗体感作ラテックス試薬の作製方法

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。

2-2. ラテックス試薬による CRP の測定

1) ラテックス試薬の性能評価とその測定条件
ラテックス免疫比濁法 (LIA 法) を原理として、CRP の定量を行う。試料中の CRP とラテックス粒子に結合させた抗体が抗原抗体反応を起こすことにより、凝集塊が生じる。この凝集反応の濁度を指標に計測し、その反応曲線の微分値をもとに反応速度としてデータ処理を行う。測定には全自動免疫血清検査システム LPIA-500 (三菱化学ヤトロン) を用いた。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. 結果および考察

グリシンが 1,2,3 分子結合したオリゴペプチドをスペーサーとして用いたラテックス試薬を作製した。その後、CRP と反応させスペーサーの鎖長が及ぼす反応性への影響を検討した。その結果を Fig. 1~3 に示した。グリシン 1 分子をスペーサーとして用いた場合、Latex 粒子 100 mg に対してグリシンを 266 μ mol 加え、スペーサーを結合させた時、もっとも反応性が高くなった。また、ジグリシンやトリグリシンにおいても、Latex 粒子 100 mg に対してグリシンを 266 μ mol 加え、結合させた時、最も反応性が高くなることがわかった。さらに、それらを比較するとジグリシンをスペーサーとして用いた試薬が、最も反応性が向上することが確認できた。この反応性の差異は、現在 2 つの理由が考えられる。1 つ目は今回のテーマであるスペーサーの鎖長による影響、2 つ目はこれらオリゴペプチドの溶解度差による影響である。最も溶解度の高いのはジグリシンであり、より水溶性のスペーサーが反応を向上させたのではないかと考えられる。

3. 今後の展開

さらに Latex 試薬の反応性を向上させるため、今回考察に挙げた鎖長と水溶性の 2 つの観点から研究を進めてゆく。

参考文献

- 1) Paul M Ridker, MD, MPH. Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham risk scores. *Circulation*, 2004 ; 109: 1955-1959
- 2) Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*, 1998 ; 97: 425-428
- 3) Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. *Circulation*, 1998 ; 97: 2007-2011
- 4) 飯塚儀明, 澤畑辰男, 高野佐重喜ほか. CRP 定量の問題点と新試薬による測定. 日本臨床検査自動化学会誌 2001 ; 26 : 82-86

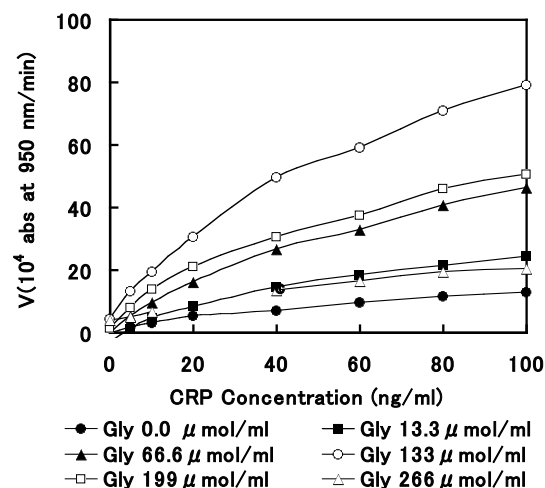


Fig. 1 Comparison of reactivity in various concentration of glycine

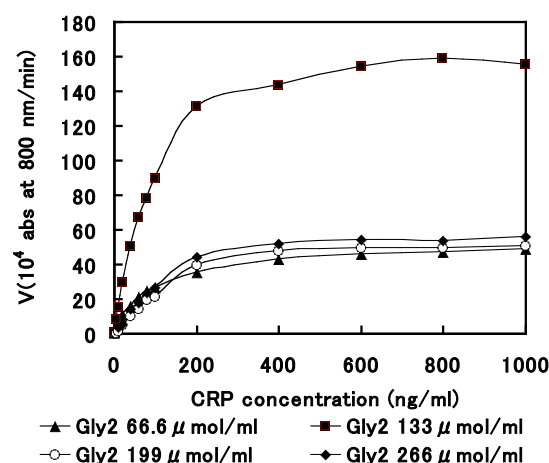


Fig. 2 Comparison of reactivity in various concentration of diglycine

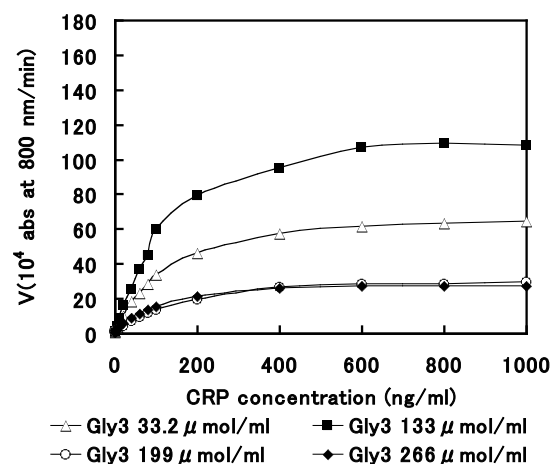


Fig. 3 Comparison of reactivity in various concentration of triglycine

