

1. はじめに

CRP (C-reactive protein) は、正常ヒト血清中において、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ている。前発表では、アミノ酸のスぺーサーを用いたラテックス試薬の作製による高感度化やスぺーサーの長さを制御することによる高感度化を発表した。本発表では、モノクロナール抗体のカクテルによる反応性の検討とその考察を行ったので報告する。

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 緩衝液で調製したスぺ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、スぺ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。これに抗 CRP 抗体 (150 μ g) を加え、310 K 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、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 2.0ml に懸濁し、遠心分離を用いて、洗浄を行った。遠心分離後、同じ MES 緩衝液 1.0 ml に懸濁し、変性 BSA を 1.0 ml 加え 298 K 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、pH 8.2, 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。最後に Tris-HCl 緩衝液 2.0 ml に懸濁し、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 の定量を行った。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-S500 (三菱化学ヤトロン) を用いた。各モノクロナール抗体の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、感度の検討を行った。

3. 結果および考察

抗原決定基が Fig. 1 の A の部位であるモノクロナール抗体 (MoAb) No. 5 と B の部位である MoAb No. 7, No. 8 を用いて 3 種類のラテックス試薬を作製し、その反応性を Fig. 2 に示した。最も良好な反応性を示した抗体は MoAb No. 5 であり、

MoAb No. 8 は、MoAb No. 5 の約 1/6 の反応性であった。さらに、これらの 3 種の抗体を 2 種類ずつ混合し、ラテックス試薬を作製した。その反応性を Fig. 3 に示した。

抗原決定基の異なる抗体を混合した場合 (No. 5 と No. 7 または No. 5 と No. 8)、最も反応性の良好だった MoAb No. 5 のみの場合と比較し、反応性はやや低下してしましたが、No. 7 や No. 8 のみで作製したラテックス試薬より、2 倍以上に反応性が高くなった。また、抗原決定基が同じと分析されている No. 7 と No. 8 のカクテル抗体の試薬においては、それぞれを単独で用いた反応性よりも 2 倍以上の感度の上昇が見られた。これらの結果より、抗体の力価の低いモノクローナル抗体であっても、それらを組み合わせることにより、感度の向上が期待できる。また、その組み合わせは、抗原決定基が異なっているほど有効であると示唆される。

4. 今後の展開

本発表では、抗原決定基の近い MoAb を用いたラテックス試薬の作製とその検討をおこなったが、今後、離れた抗原決定基の MoAb を組み合わせたカクテル抗体により、反応性の検討を行い、ポリクローナル抗体同様の抗体価を持つオリゴクローナル抗体の調整を目指す。

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. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *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会誌* 2001 ; 26 : 82-86

Q	T	D	M	S	R	K	A	F	V	10
F	P	K	E	S	D	T	S	Y	V	
S	L	K	A	P	L	T	K	P	L	
K	A	F	T	V	C	L	H	F	Y	
T	E	L	S	S	T	R	G	Y	S	50
I	F	S	Y	A	T	K	R	Q	D	
N	E	I	L	I	F	W	S	K	D	
I	G	Y	S	F	T	V	G	G	S	
E	I	L	F	E	V	P	E	V	T	
V	A	P	V	H	I	C	T	S	W	100
E	S	A	S	G	I	V	E	F	W	
V	D	G	K	P	R	V	R	K	S	
L	K	K	G	Y	T	V	G	A	E	
A	S	I	I	L	G	Q	E	Q	D	
S	F	G	G	N	F	E	G	S	Q	150
S	L	V	G	D	I	G	N	V	N	
M	W	D	F	V	L	S	P	D	E	
I	N	T	I	Y	L	G	G	P	F	
S	P	N	V	L	N	W	R	A	L	200
K	Y	E	V	Q	G	E	V	F	T	
K	P	Q	L	W	P					206

Fig. 1 Amino acid sequence of CRP and epitope of monoclonal antibody No. 5 (A), No. 7 (B) and No. 8 (C).

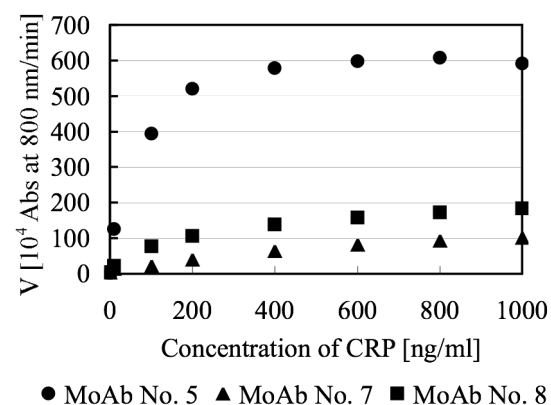


Fig. 2 Comparison of reactivity in various types of monoclonal

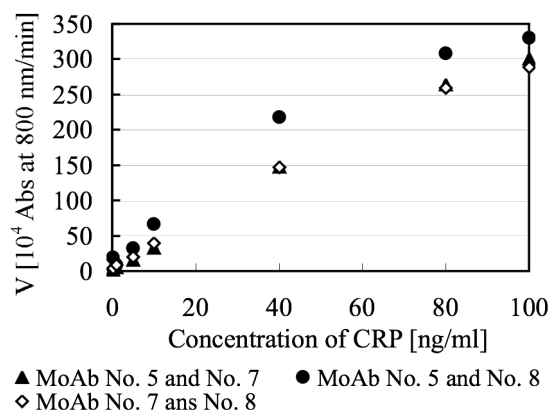


Fig. 3 Comparison of reactivity in some cocktail of monoclonal antibody