

18) 血清シスタチン C 免疫学的測定法の標準化
— 血清マトリックススペースの標準品の作製

研究代表者 赤坂 和美

シスタチン C (cys C) は分子量 13,000 の塩基性低分子蛋白質である。近年、内因性 GFR のマーカーとして臨床利用が拡大し、また心血管障害のリスク因子、生命予後の予測因子としても注目されている。その測定は抗原抗体反応に基づく免疫学的測定法による。これまで測定値が測定法間で乖離が見られたが、2010 年に国際標準物質 ERM-DA471 の登場により測定の標準化が進められかなり改善が得られている。この成果も相まって、日本人の eGFR_{cysC} が設定された。しかし先年実施された ERM-DA471 から各社検量物質への値づけにおいてこの国際標準品、検量物質、患者血清との間に免疫学的反応性に比例互換性がわずかに異なる測定法が散見された。そこで新たなプロトタイプ多目的参照標準品 (new ProBio-S) を作製して基本性能を確認し、さらにこれを用いて乖離の原因を探求した。

[方法]

プロトタイプ参照品作製

概要は図に示す。既に確立された方法に従ってこれまで共同開発してきた、日水製薬に指導して作製した。すなわち ERM-DA471 に準じて native cys C (NovaTeinBio, Lot# P-110104, USA), native beta 2-microglobulin (NovaTeinBio, P-110104) を加えて凍結乾燥仕上げのプロトタイプを作製した。既に購入済みの米国人プール健常者血清遠心後、再度脱脂処理したものを材料に、補体 C3 成分を活性化して C3a 変換、透析後へベスバッファーに至適条件で透析して置き換えた。測定法は Beckman AU680、測定試薬は Nittobo 社を用いた。なお購入の時点で、病原微生物の安全性は確認している。

多目的参照標準品に評価検討

ERM-DA471, 以前作成した recombinant cysC (オリエンタル酵母、滋質) を添加作製した ProBio-S, 患者プール血清、検量物質について複数回測定して精度、希釈直線性を評価した。

糖化影響効果実験

全てを無菌的に実験した。リン酸バッファーに glucose 600 mg/dl, 300 mg/dl, 100 mg/dl, 0 mg/dl 添加しここに recombinant cysC を最終濃度 5 mg/L になるよう調整し 37℃ の条件下で 21 日間培養した。0 日、7 日目、14 日目、21 日目に採取し溶液中の cysC を Nittobo, Eiken, Siemens, Beckman, BioLinks に依頼測定した。糖化指標として Carbonylmethyl lysine (CML) を MBL 社で測定した。

その他の蛋白成分の測定

主な蛋白成分についても Beckman により測定した。



図 1 New ProBio-S

【結果、討論】

Beckman AU680 に関しては上記成分の 5 回連続測定精度の CV 値は ERM-DA471 原液で 3.0%、標準液原液で 0.3%、最高値試料で ProBio-S 0.29%、ProBio-S II 0.35% できわめて良好であった。一方希釈試験では上記の試料、自身の検量線も含め測定値 / 予測値の幅は 0.98 ~ 1.2 ときわめて優れた性能を有することが示された。このことは少なくともこのシステムにおいては、精製 native、サンプルの cys C、recombinant に問わず測定システムは大きく影響を受けることなく測定可能であることが示された。

1 ml の精製水に溶解後の 24 時間まで一定の時間で測定を行ったが、変動幅は CV で 0.79% に過ぎず、きわめて高い安定性を示した。一方長期安定性は、半年後の測定値は 3 回測定で 5.40 mg/L、標準偏差 0 ときわめて高い長期安定性を示した。なお安全性は購入時点で保障されている。以上のことから、本標準品が新たなシスタチン C 研究に有用であることが示された。

糖化の影響効果の検索に、グルコースを添加し反応性を検討した。非特異的吸着を抑える無菌の超親水性チューブが現在市販されていない、 γ 線照射装置も利用が困難な状況で、さらに CML 測定を目的とするために BSA の添加ができないなどの理由から、超親水性チューブを熱処理して、通常の phosphate buffer をやむなく用いた。予想外に吸着は強く 5 mg/L に調整して 0.5 mg/L 程度まで低下した。容器の熱処理による機能の変化、バッファーの選択、蛋白調整濃度調整、希釈用のピペットへの吸着などの問題がある。

このような測定結果の信頼性に課題は残すが、いずれの測定法においてもグルコース濃度 600 mg/dl では 0 mg/dl (コントロール) と比べ、顕著な低下を示し 21 日目は感度限界以下となり、Western blots でもこれを支持するデータを得た。すなわち初日と 14 日目では糖に暴露された cys C はコントロールと比べ反応強度の低下を示し抗原決定位の修飾作用の可能性も疑われた。CML の定量結果ではグルコースが 300 mg/dl 濃度で増加の傾向がわずかに認められ、ほとんどが感度以下であり確定的ではなかった。今後、より高い濃度設定での検討が必要となる。Western blots に見られるように反応性の増強が添加群には認められる。これは非特異的吸着も含め安定化に糖が作用している可能性がある。非特異的吸着影響を抑え本来の作用を特異的

に検出できる至適条件の設定が必要となる。とりわけバッファーの作製がもっとも重要な課題となる。

本標準品はヒト血清ベースとしており、主要蛋白成分はその構造、抗原性が血清に近似している。そこで日常検査で使用される主な成分について測定した。溶解直後、4℃ 保存でも 24 時間までいずれも高い安定性が示され検査室内、検査室間のコントロール、サーベイ調査などへの利用の可能性も示された。

シスタチン C 測定標準化を目的に多目的標準物質 (ProBio-S) を作製した。安定性、安全性も含め標準物質として求められる条件を満たしており、本標準物質を用いて測定標準化を推進し問題解決に当たりたい。

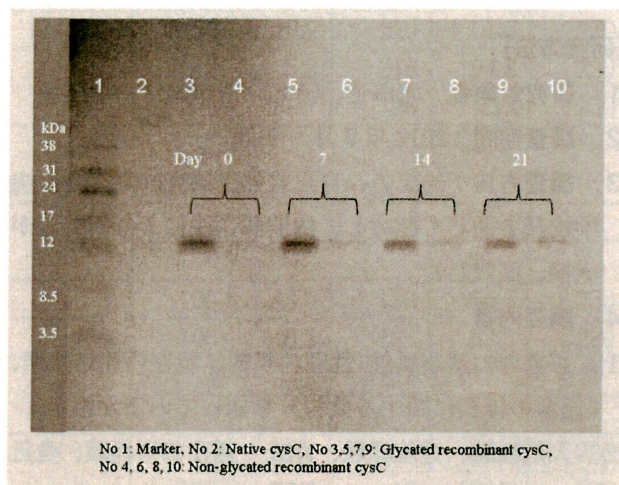


図 2 Western blots による抗原解析

参考文献

シスタチン C の基礎と臨床 臨床病理 60 ; 760-778、2012.

謝辞

本研究の実施にあたり伊藤 喜久教授の指導をいただきました。作製、測定検討にご協力いただいた研究施設、関連会社に深謝します。