

レーザーネフェロメーターによる血清 CRP

定量に関する研究

——第1報：低濃度領域について——

中 村 紀士子, 富 田 仁

Measurement of C-Reactive Protein in Serum Using Laser Nephelometer PDQ

(1) Studies in a Region of Low Concentration

Kishiko NAKAMURA and Shinobu TOMITA

ABSTRACT: It was well-known that there was no detectable C-reactive protein (CRP) in sera from normals. In 1968, however, Nilsson found the existence of CRP in sera from normals by the conventional immunodiffusion method, though the concentration of CRP was very low. In order to establish a simple method for the measurement of the low concentration of CRP, we examined the laserimmunoassay (LIA) method. By the LIA method, we could successfully determine the low concentration of CRP employing a standard curve drawn with diluted reference sera. We recommend this technique which is excellent and simple, especially in practical use.

緒 言

CRP は C-reactive protein の略であり, 1930年頃肺炎菌の菌体成分より C (第3番目という意味) -polysacchride が発見され¹⁾, その物質と反応するという意味である。人体のどこかに急性の炎症や組織の破壊の有無, その程度を判定するための急性反応物質のうち最も重要なものの一つであり, 日常検査の中で頻度の高い検査である。その測定法は現在毛細管沈降法 (以下毛細管法と略記) が主流を占めている。この方法は簡便で少量の検体で行なわれるなど

の長所を有しているが, しかし①定量性に欠ける, ②判定までに1晩以上の長時間を要する, ③製品の種類やその製品番号によりばらつきが大きい, ④ Standard をとらないので正確性に欠ける, などの多くの欠点を有している。一方一元免疫拡散法 (Single Radial Immunodiffusion, 以下 SRID と略記) も以前から行なわれている方法であり, 定量性, 再現性はよいが, 低濃度が測定出来ず, 毛細管法と同様に時間がかかるという欠点を持っている。長い間この様な方法で血清 CRP が測定されていたので, 正常人の血清中に CRP は存在しないと言われ, もし存在が証明されればそれは異常であると考えられていた。しかし Radioimmunoassay 法^{2,3)} (以下 RIA 法と略記) が開発され, 低濃度の蛋

京都大学医療技術短期大学部
College of Medical Technology, Kyoto University
1981年6月受付, 同年8月受領

白も測定されるようになってからは,CRP も正常人血清に存在することが明らかに証明された。最近抗原抗体複合物のわずかな混濁が Laser nephelometer により測定されるようになったので Laserimmunoassay 法(以下 LIA 法と略記)を利用して CRP の測定が可能となった。そこで我々はこの LIA 法による CRP 測定法の検討を行なうと同時に、低濃度領域における CRP の測定法を検討し、それを可能にした。また毛細管法で陰性の新鮮血清は不活化することにより約20%陽性化するとされている^{4,5,6)}のでこの点についても併せて検討した。

実験材料と方法

1. 被 験 材 料

京大病院中央検査部血清検査室に提出された各種疾患患者血清及び健康者として本学々生有志のうち毛細管法で CRP 陰性血清、計260例を用いた。また毛細管法で陽性の患者血清23例を用いた。

2. 器 具

Hyland 社レーザーネフェロメーター PDQ 及び LIA カリキュレーター YHP 9815A システムを使用した。Cuvettes は LAS-R Test 用 Disposable Borosilicate Glass cuvettes (10×75 mm) Hyland 製を用いた。

3. 試 薬

A) LIA 法

a) Anti-CRP goat antiserum (Hyland)
Lot. No. 8678U002A

b) Antiserum diluent Lot. No. 8550U004
A

c) Sample blank solution Lot. No. 8651
U009A

d) CRP reference serum (Hyland)

Reference No.	表示値	Lot. No.
I	7.7 mg/dl	8686U001A
II	6.6 mg/dl	8687U001A
III	5.2 mg/dl	8688U001A
IV	3.8 mg/dl	8689U001A
V	1.7 mg/dl	8690U001A

VI 0.6 mg/dl 8691U001A

B) 毛 細 管 法

栄研抗 CRP 血清 Lot. No. 91N2KA

4. 測 定 方 法

A) LIA 法

濃度既知血清 (CRP reference serum) 及び検体血清に抗血清を加え混和し、室温 (20~25 °C) でインキュベートした。この反応液中の抗原抗体複合物による光散乱強度 (以下% RLS と略記) をレーザーネフェロメーターPDQ と LIA カリキュレーター YHP で測定した。

B) 毛細管法

前記試薬キットを用い使用書の通り行った。

5. 実 験 方 法

A) LIA 法の精度の検討

LIA 法による CRP 測定法の精度を検討するために以下の実験を行なった。

① 前記6種の濃度既知血清の検量線を作成した。

② 6種の濃度既知血清を用いて反応の経時の変化を調べた。

③ 再現性を検討するために毛細管法陽性患者血清 (3例) について20回反復測定した。

④ 毛細管法陽性患者血清 (20例) につき二重測定を行なった。

B) 低濃度領域の測定法の検討

標準血清を汙過生理食塩水で、1.7 mg/dl, 1.0 mg/dl, 0.6 mg/dl, 0.36 mg/dl, 0.18 mg/dl, 0.06 mg/dl の6濃度に希釈し、抗原抗体反応後室温で100分間インキュベート後140分以内に測定した。

C) 不活化の影響

260例の新鮮血清を 56 °C, 30分間加温して不活化した後の CRP 値を LIA 法で上記の低濃度の測定法にしたがって測定した。

結 果

1. 測定法の検討

a) 標準血清における検量線

標準血清 I ~ VI の検量線はゆるやかな S 字状の三次の回帰曲線が得られた (図1)。この結

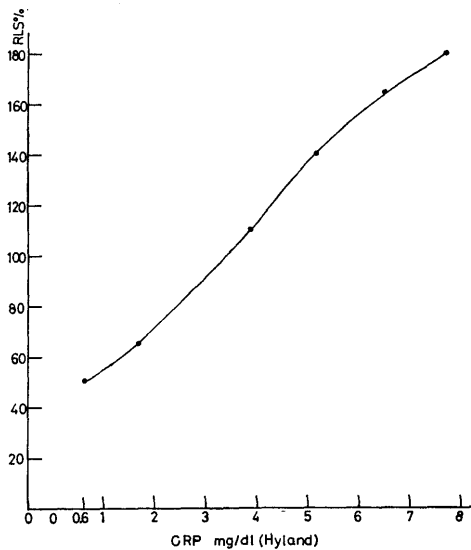


図1 標準血清による CRP 検量線 (LIA 法)

果は LIA 法による CRP の測定値の信頼性の高いことを示している。

b) 反応の経時変化

標準血清 I : 7.7 mg/dl, II : 6.5 mg/dl, III : 5.2 mg/dl, IV : 3.8 mg/dl, V : 1.7 mg/dl, VI : 0.6 mg/dl についての変化を図 2 に示した。標準血清 I ~ IV は反応開始と共に急速に % RLS が増加, 90 分後には最高に達し 240 分迄平衡安定を示した。一方標準血清 V, VI は 100 分後迄複合物の生成が見られ以後 240 分迄平衡安定を示した (図 2)。

c) 再現性について

3 種の毛細管法陽性血清での再現性は, 表 1 に示した様に, A 検体の変動係数 (以下 C.V. と略記) は 3.8%, B 検体の C.V. は 3.2%, C 検体の C.V. は 1.9% で 3 検体の平均 C.V. は 2.9% で共に低値を示した。この結果より再現性のかなり良いことが判明した (表 1)。

d) 二重測定について

20 検体についての二重測定は表 2 に示した。その結果二測定値間の差の百分率は平均 5.8%

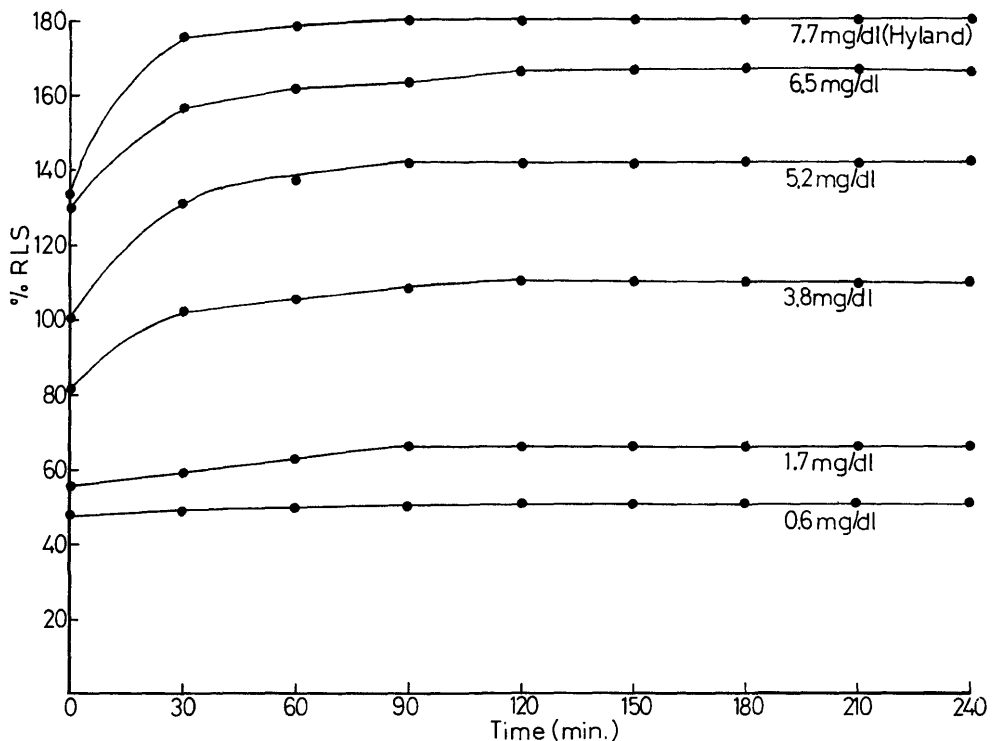


図2 LIA 法による血清 CRP 定量反応の経時的変化

表1 LIA 法による血清 CRP 定量の再現性

検体 回数	A (mg/dl)	B (mg/dl)	C (mg/dl)
1	3.15	5.07	4.27
2	3.19	5.00	4.14
3	3.19	4.79	4.08
4	3.13	4.71	4.10
5	3.15	4.75	4.14
6	3.08	4.64	4.16
7	3.09	4.70	4.18
8	3.26	4.67	4.11
9	3.19	4.70	4.25
10	3.52	4.51	4.32
11	3.42	4.45	4.27
12	3.29	4.57	4.19
13	3.22	4.69	4.31
14	3.43	4.55	4.33
15	3.19	4.61	4.21
16	3.42	4.69	4.14
17	3.33	4.65	4.19
18	3.34	4.67	4.26
19	3.34	4.51	4.25
20	3.24	4.44	4.31
$\bar{x}$	3.26	4.68	4.21
S.D.	0.12	0.15	0.08
C.V.	3.82	3.25	1.87

* $\bar{x}$ =平均 S.D.=標準偏差 C.V.=変動係数

と低値であり、測定法の信頼性の高いことを示している。

2. 低濃度領域における測定の検討

低濃度領域を測定する場合は、標準血清を用いると 0.6 mg/dl 以下では below reference curve と表示されるか、あるいは機械的に Reference VI (0.6 mg/dl) の1.5倍の点と Reference VIを直線で結んだ検量線での読みを表示するので、数値目安になるが信頼出来ない。6種の希釈標準血清の検量線は、図3に示す様なゆるやかなカーブを描いており、十分使用しうるものであるとみなされた(図3)。そこでこの検量線を用いて、毛細管法で陰性を示した新鮮血清の260検体を LIA 法で測定した結果は図4に示した(図4)。すべての検体は 0~1.7 mg/dl の間に平均して分布していた。

3. 不活化の影響

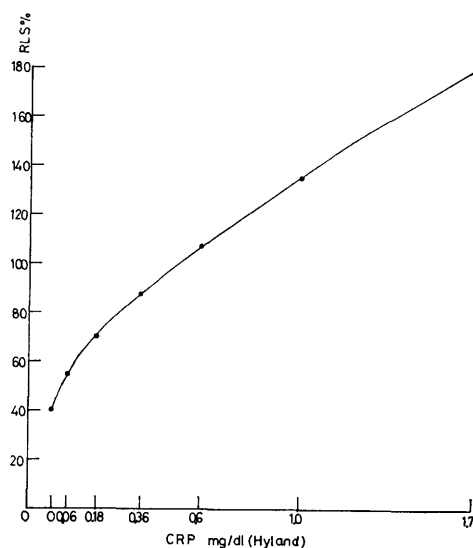


図3 CRP 低濃度領域における検量線 (LIA 法)

表2 LIA 法による血清 CRP の二重測定

検 番	体 号	1回目 (A)	2回目 (B)	差の百分率*
1		4.70	4.98	5.8
2		7.62	7.93	4.0
3		5.10	5.23	2.5
4		4.00	3.78	5.7
5		5.15	5.55	7.5
6		3.42	3.82	11.1
7		2.81	2.53	10.5
8		3.60	3.62	0.6
9		1.30	1.38	6.0
10		2.11	2.43	14.1
11		1.90	2.13	11.4
12		5.33	5.81	8.6
13		6.88	6.90	0.3
14		2.58	2.61	1.2
15		0.78	0.72	8.0
16		3.57	3.73	4.4
17		2.71	2.90	6.8
18		3.12	3.12	0.0
19		5.18	5.38	3.8
20		5.00	5.21	4.1
平 均		3.84	3.99	5.8

* $\frac{2|A-B|}{A+B} \times 100$

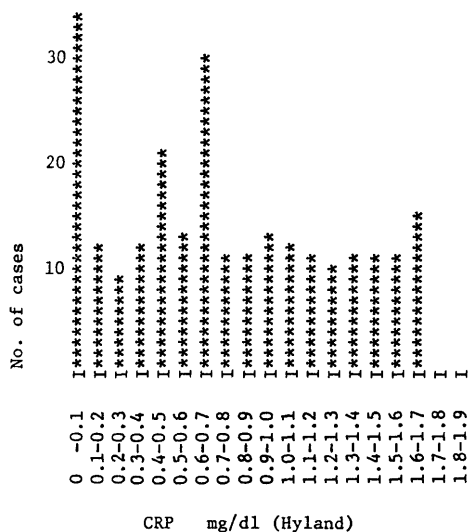


図4 LIA 法による正常領域血清(新鮮)のCRP 定量値

毛細管法で陰性を示した新鮮血清260検体の不活化後のCRP測定値は図5に示した。その結果, 約50%は0~0.2 mg/dl の間に存在していた。そこで, この不活化血清の測定値と新鮮血清の測定値の相関を検討した。両者の相関々係は図6に示した。その結果新鮮血清で0 mg/dl を示した検体は不活化することにより, 1例を除き0.02~0.68 mg/dl の値を示した。同様にして, 新鮮血清で0.25 mg/dl 以下の検体は不活化により測定値の上昇傾向を認めた。しかし0.25 mg/dl 以上では不活化により逆に抑制される傾向がみられた。

考 按

血清CRPは, 急性炎症や組織の破壊があれば, 血清中に増加する異常蛋白と考えられ正常血清中には存在しないと考えられていた。しかし正常血清中にCRPが存在することを最初に報告した人は, スウェーデン Göteborg 大学の Nilsson (1968)⁷⁾ であった。Nilsson は免疫拡散法により健康供血者の50~70%の血清から痕跡のCRPを証明した。その後 Saxstad ら⁸⁾ は健康な小児98人中17人にCRPを証明し, Scheiffarth ら⁹⁾ は同じく Ouchterlony 法によ

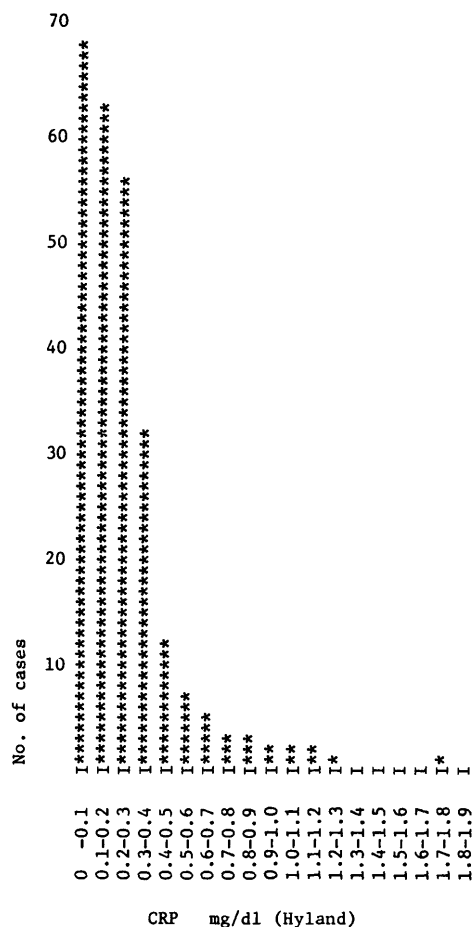


図5 LIA 法による正常領域血清(不活性)のCRP 定量値

り50人の供血者のうち72%に, 抗CRP血清を16倍に希釈することによってCRPを認め, 残りの28%には被験血清を濃縮するかまたは抗CRP血清をより高度に希釈することによってCRPを認め, CRPは健康人の正常の血清蛋白の一つであることを確認したと述べている。また, Greene ら¹⁰⁾ も Cystic fibrosis 組織の免疫化学的研究のなかでCRPは正常人にも多く認められると述べている。Kindmark¹¹⁾ らは, RIを用いたRadio-electro-immuno-precipitation assay法(0.001 mg/dlのCRPも検出可能)で, 血清CRPの各年齢群の正常値を定めている。それによると健康人

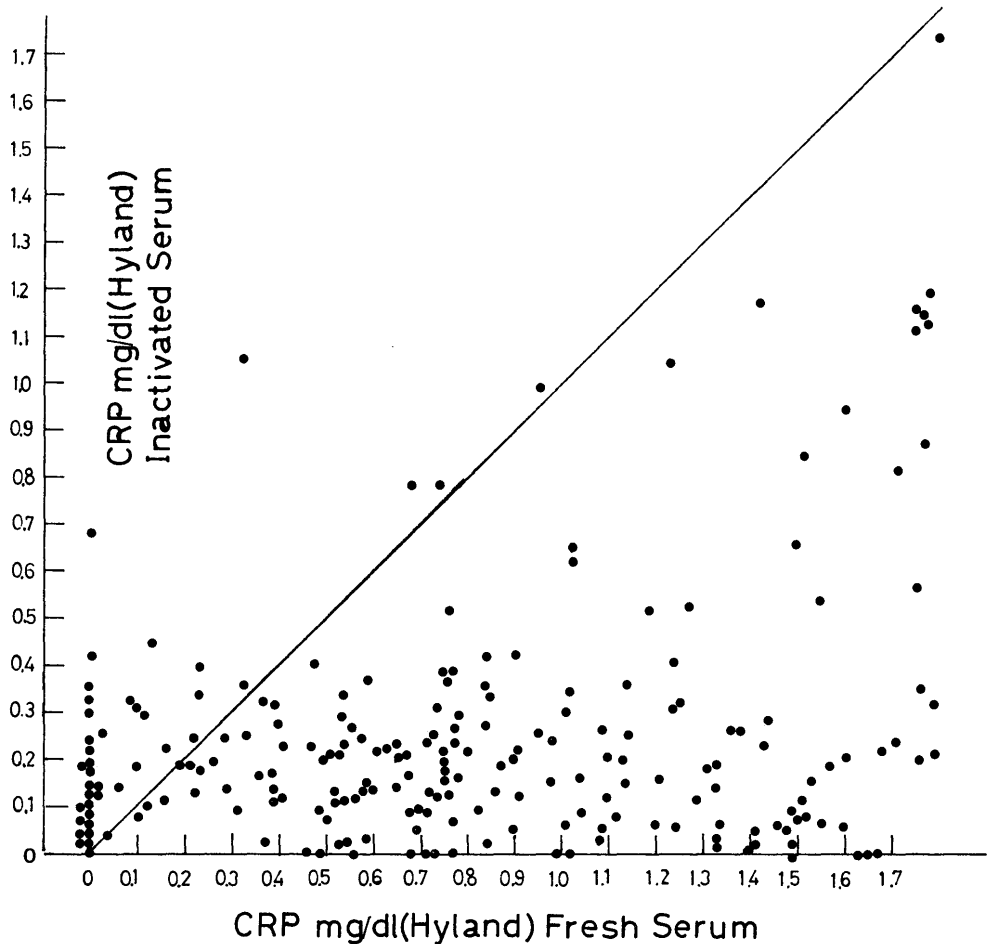


図6 正常新鮮血清と不活化血清とのCRP値の相関図 (LIA 法)

血清から 0.002~1.35 mg/dl を証明し、性別差はないが年齢差は認められ、新生児に最も少く、小児は成人に比べて少い。最近 Claus ら²⁾ も RIA 法で、ほぼ同一の結果を得ている。そしていずれの研究者も正常人にある CRP が、病的に増加する CRP と同じであるといっている。

このように、今日では、CRP は正常人血清に存在する蛋白の一つであることが確認されたので、感度のよい方法や試薬が出現した。蛍光偏光解消法¹²⁾、Lecithin 試薬凝集法¹³⁾、最近のラテックス凝集法¹⁴⁾ が出現し、また被験血清を 56℃、30分間不活化すれば毛細管法で約20%陽性化するという河合ら^{4,5,6)} の提案にもとずい

て、抗 CRP 血清試薬に塩化コリンなどの抗補体剤を加えて感度を上げたものが出現している。同様に LIA 法を用いた CRP 測定法も開発されている。

そこで我々は、Hyland 社のレーザーネフロメーターを用いて Immunoassay system による CRP の定量測定を種々検討してきた。この測定法は経時変化、再現性、二重測定などの検討により、充分信頼性の高いことが判明した。また標準的な方法では測定不能な低濃度領域の CRP 測定を可能にするため、既知標準血清を希釈した結果、低濃度領域の測定を可能にしえた。LIA 法の長所としては、①検体量が少量 (5 μ l) ですむ、②短時間で多数検体が測定出

来る, ③定量が出来る, などの点があげられる。また短所としては①測定機器が高価である, ②比濁法であるので混濁血清などは, その処理法を考慮する必要がある, などである。前記の如く河合ら^{3,4,5)}は, 毛細管法で血清を不活化すれば陰性が約20%陽性化するといひ, 他の施設でも追試されている¹⁵⁾。今回, 我々により確立しえた低濃度領域での LIA 法による測定法を用いて, 毛細管法で陰性の血清の不活化の影響について検討した結果, 0.25 mg/dl 以上の血清群は不活化により抑制される傾向を示したが, しかし 0~0.25 mg/dl の血清群では少々高値を示すものが多くみられた。この事実は LIA 法に特異の現象であるか, その真偽は今後 RIA 法との対比検討などを施行して解決しなければならない問題点である。

低濃度領域の CRP 測定は現在のところ RIA 法が最もすぐれていることは確かであるが, 放射能管理や廃液の処理などに問題がある。一方 LIA 法では 0 mg/dl も出現するので感度の点では RIA 法に劣るが, 簡便で放射能管理の問題もないので, CRP の日常検査法として推奨出来る。

結 論

我々は, Hyland 社製レーザーネフェロメーター及び LIA カリキュレーター YHP システムと, Hyland 社製の CRP 抗血清, CRP 標準液を用いて, 血清 CRP 定量 (LIA 法) を検討し, 次のような結果を得た。

1) LIA 法による CRP 測定法は, 定量測定が可能で, その精密度も高い。被験血清は微量で, 短時間で多数の検体処理が出来るなどの長所を有し, 日常検査として利用し得る。

2) 通常の LIA 法では, 血清 CRP 0.6 mg/dl 以下は測定出来ないが, 既知標準血清を希釈し, 低濃度の検量線を作り 0.6 mg/dl 以下の測定を可能とした。この方法は RIA 法より感度は劣るが, 簡便で放射能管理の問題がない。

3) 毛細管法で CRP 陰性の患者及び健康人

血清 260 例について新鮮血清と不活化血清を比較検討した結果, CRP が 0.25 mg/dl より高値では不活化により抑制される傾向がみられた。

本論文要旨は, 昭和54年10月, 第26回日本臨床病理学会に発表した。本研究の遂行にあたり, 多大な御協力をいただいた京大病院中央検査部稲本キヨ枝官, 野崎康子技官, 日本トラベノール水谷利栄氏に深甚の感謝の意を捧げる。

文 献

- 1) Tillet, W.S. & Francis, T. Jr.: Serological reaction in pneumonia with a non-protein somatic fraction from pneumococcus. *J. Exp. Med.* 52: 561, 1930.
- 2) Claus, D.R., Osmand, A.P. & Gewurz, H.: Radioimmunoassay of human C-reactive protein and levels in normal sera. *J. Lab. Clin. Med.* 87: 120-128, 1976.
- 3) 富田 仁: CRP 血清は正常血清にも存在する。日本臨床 34: 824-825, 1976.
- 4) 河合 忠・松田重三・山田秀雄・堂元信子・岡崎宏子・山岸安子: CRP 試験における血清不活化の意義, 第1報血清不活化の必要性について。臨床病理 19: 633-636, 1971.
- 5) 河合 忠・松田重三・山田秀雄・堂元信子・岡崎宏子・山岸安子: CRP 試験における血清不活化の意義, 第2報不活化による陽転の原因について。臨床病理 19: 685-688, 1971.
- 6) 河合 忠・松田重三・岡田賢二郎・堂元信子・片田美都子・山岸安子: CRP 試験における血清不活化の意義, 第3報成績判定におよぼす不活化の影響。臨床病理 20: 418-421, 1972.
- 7) Nilsson, L.-A.: C-reactive protein in apparently healthy individuals (blood donors) related to age. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 73: 619-623, 1968.
- 8) Saxstad, J., Nilsson, L.-A. & Hanson, L.-A.: C-reactive protein in serum from infant as determined with immunodiffusion techniques. *Acta Paediat. Scand.* 59: 25-30, 1970.
- 9) Scheiffarth, F., Perez-Miranda, M. & Gotz, H.: Nachweis des C-reaktiven Proteins in normalen Sera. *Blut* 20: 296-305, 1970.
- 10) Greene, E.L., Halbert, S.P. & Pallavicini, J.C.: Immunochemical studies of cystic fibrosis tissues:

- The detection of increased concentration of an antigen which was identified as C-reactive protein. *Int. Arch. Allergy* 40: 184-196, 1971.
- 11) Kindmark, C.-O.: The concentration of C-reactive protein in sera from healthy individuals. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29: 407-411, 1972.
- 12) 松田重三・風間睦美・安部 英: 螢光偏光解消法 (Model IBF-129) による CRP 定量の検討. *生物物理化学* 21: 103, 1977.
- 13) 松橋 直・瀬戸幸子・岡田友生: Lecithin 含有試薬による CRP 凝集法. *臨床病理* 24: 678-680, 1976.
- 14) 富田 仁・稲本キヨ・吉田真理子・三角香代子・上尾八郎: C反応性蛋白検査用 CRP テスト (ラテックス試薬) の検討. *Biomedical J.* 2: 579-581, 1978.
- 15) 市田一英・稲本キヨ・上尾八郎・田中時子・富田仁: 2つの新術式による CRP 検査の検討. *臨床病理* 20: 829, 1972.