

## C-反応性蛋白質の酵素免疫測定法の開発

森 秀 治

### Enzyme Immunoassay for Rabbit C-reactive Protein

Shuji MORI

#### SUMMARY

Sensitive enzyme immunoassay method specific for rabbit C-reactive protein was established. This was based upon specific  $Ca^{2+}$ -dependent binding profile of C-reactive protein for some compounds containing phosphorylcholine moiety intramolecularly. By this method, more than  $0.001\mu\text{g}$  of rabbit C-reactive protein was detectable. Specific binding of C-reactive protein for p-aminophenylphosphorylcholine immobilized on solid phase was inhibited by either addition of EDTA or phosphorylcholine analogues, effectively. It may be useful to study possible roles of C-reactive protein in inflammatory regions.

**Key Words :** C-reactive Protein, Enzyme Immunoassay

#### 1. 緒 言

C-反応性蛋白質は炎症惹起に伴って肝臓から血中へと分泌される血清蛋白<sup>1)</sup>の1つであり、ヒトやウサギにおいては炎症後24~48時間以内に約1,000倍もの血中濃度上昇<sup>2)</sup>を認める特徴的な性質を有する。この急激な濃度増加は炎症局所に集積した活性化単球ならびにリンパ球から分泌されたインターロイキン1やインターロイキン6が血流を巡り肝臓を刺激する<sup>3)-5)</sup>ことにより引き起こされる。しかしながら、分泌されたC-反応性蛋白質の生理学的な役割については、補体を活性化<sup>6),7)</sup>したりマクロファージの貪食能を亢進<sup>8)</sup>するなどの知見より生体の防御機構になんらかの役割を果たすものと示唆されているものの未だ明確な答えは出されてはいない。また、C-反応性蛋白質は分泌後、炎症局所に選択的に沈着する<sup>9)-12)</sup>性質を示すことから炎症局所での役割につき特に興味もたれている。

炎症局所は、pHの低下<sup>13)</sup>、活性酸素の生産<sup>14)-16)</sup>や種々の加水分解酵素の分泌<sup>17),18)</sup>など生理的条件

とは大きく異なった状態にあることが予想され、その中でのC-反応性蛋白質の生理学的役割を明らかにする上で、本蛋白質を簡便かつ正確に測定する方法を確立することは意義あるものと考えられる。本研究では酵素免疫測定法を用いたC-反応性蛋白質の微量定量法の確立ならびに本法の精製への応用例につき報告する。

#### 2. 材料と方法

##### 1) 試薬

p-アミノフェニルホスホリルコリン (APPC)、ウシ血清アルブミン (BSA) はシグマ社より購入した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドは同仁化学の製品を用いた。ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗モルモット IgG 抗体はカッペル社より得た。ABTS は東京化成より購入した。その他の試薬は市販の特級を用いた。

##### 2) モルモット抗ウサギC-反応性蛋白質抗体の調製

モルモット抗ウサギC-反応性蛋白質抗体は以

下のようにして調製した。精製ウサギC-反応性蛋白質溶液 (0.2mg/ml 10mM Tris-buffered saline(TBS), pH7.5)0.5mlを等量のプロインド完全アジュバントを用いて懸濁液とし、これをモルモットの背部に皮内感作した。初回感作のそれぞれ14日, 28日, 42日, 56日後にプロインド不完全アジュバントを用いて懸濁液としたC-反応性蛋白質で同様に再感作した。最終感作の7日後に全採血を行い、血清分離後 Protein A-セファロース 4 B アフィニティゲルを用いて IgG 画分にまで精製し、これをモルモット抗ウサギC-反応性蛋白質抗体として本実験に用いた。

### 3) P-アミノフェニルホスホリルコリン (APPC) -ウシ血清アルブミン (BSA) 複合体の調製

50mgのBSAならびに25mgのAPPCを含む水溶液 (2 ml) に、縮合剤として1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(25mg)を徐々に添加した。反応液のpHを1MのHCl溶液を用いて4.5に調節した後、室温で更に24時間反応させた。これを4℃で1晩生理食塩水に対して透析したものをAPPC-BSA複合体とした。

### 4) ウサギC-反応性蛋白質の酵素免疫測定法

96穴平底マイクロタイタープレートに0.1mg/ml APPC-BSA水溶液を0.05ml分注し、4℃で12時間放置した。これを10mM CaCl<sub>2</sub>を含む10mM TBS (pH7.5) 0.2mlで2回洗浄した後、非特異的結合を除去するため0.5% BSA溶液0.1mlで4℃, 12時間ブロッキングを行った。これを2回洗浄後、10mM CaCl<sub>2</sub>あるいは5mM EDTAを含むC-反応性蛋白質試料を0.05ml分注した。4℃で12時間結合反応を行った後、先と同様に洗浄し、これに1次抗体(モルモット抗ウサギC-反応性蛋白質抗体)溶液を0.05ml添加し4℃, 12時間反応させた。2回洗浄後、2次抗体(ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗モルモットIgG抗体)溶液を0.05ml添加し4℃で12時間インキュベートした。プレート洗浄後、最後に0.05mlの基質溶液 (2.5mM ABTS, 44.1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100mM citrate Na 緩衝液, pH4.0)を添加し室温で10分間反応させた。反応は0.1% NaN<sub>3</sub>溶液を0.25ml添加することによって終了させ、生成して来た緑色色素の

吸光度を各々405nmで比色定量した。

### 5) P-アミノフェニルホスホリルコリン (APPC) -セファロース 4 Bゲルの調製

APPC-セファロース 4 Bゲルは、Cuatrecasasの方法<sup>19)</sup>に準じてCNBr法にて調製した。氷冷下、0.1MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液 (pH11.8)中に懸濁させたセファロース 4 Bゲル (15ml)に攪拌しながらCNBrを4.5g添加し活性化を行った。反応の進行に伴ってpHが低下するため10MのNaOH水溶液を用いてpHを11.5付近に維持した。反応後、活性化ゲル5mlを氷冷精製水 (300ml)で洗浄し、APPC10mgならびに0.5M NaClを含む0.1M NaHCO<sub>3</sub>水溶液 (pH8.4)に懸濁させた。この懸濁液を室温で5時間攪拌した後、精製水で洗浄し、これを1M Tris-HCl緩衝液 (pH8.2) 10mlに懸濁し4℃で1晩放置した。これを0.5M NaCl水溶液500mlで洗浄後、10mM TBS (pH7.5)に懸濁し、C-反応性蛋白質の精製に用いた。

### 6) P-アミノフェニルホスホリルコリン-セファロース 4 Bを用いたC-反応性蛋白質のアフィニティ精製

1.0%クロトン油10mlで感作24~36時間後のウサギ炎症血清30mlをあらかじめ10mM CaCl<sub>2</sub>を含む10mM TBS (pH7.5)で平衡化したセファロース 4 Bカラム (5 ml gel bed)に通した。素通り画分を集め、次に上記緩衝液で同様に平衡化したP-アミノフェニルホスホリルコリン-セファロース 4 Bカラム (5 ml gel bed)にかけた。同緩衝液で洗浄後、結合蛋白を5mM EDTAを含む10mM TBS (pH7.5)で特異的に溶出した。

### 7) 蛋白定量

蛋白質濃度は、Lowryらの方法<sup>20)</sup>に準じて測定した。この際、BSAを標準物質として用いた。

## 3. 結果と考察

### 1)ウサギC-反応性蛋白質に対する酵素免疫測定法の標準曲線

C-反応性蛋白質はCa<sup>2+</sup>存在下でホスホリルコリンを含有する化合物に対して強い親和性<sup>21),22)</sup>を示すことが知られている。本測定系はこの性質を利用してFig. 1で示すAPPC-BSAへのC-反

応性蛋白質のCa<sup>2+</sup>依存性の結合活性を基にして測定を行っている。Fig. 2に本酵素免疫測定法により得られたC-反応性蛋白質の典型的な標準曲線を表わす。C-反応性蛋白質の添加量に依存して

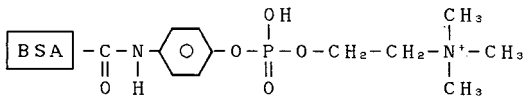


Fig. 1. Structure of APPC-BSA.

吸光度は増大し、0.02μg/ml (即ち、0.001μg/well)以上の濃度でC-反応性蛋白質が存在しておれば検出が可能であった。また、この結合活性は、Ca<sup>2+</sup>濃度に依存し5mMのEDTAの存在下では完全に消滅することも判明した (Fig. 2)。

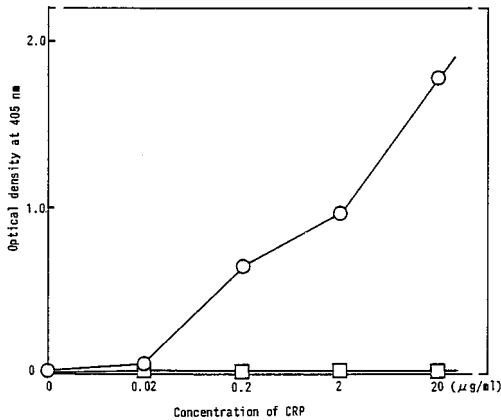


Fig. 2. Standard curve of enzyme immunoassay for C-reactive protein. Enzyme immunoassay for C-reactive protein was conducted with various concentrations of C-reactive protein in the presence of either 10mM CaCl<sub>2</sub> (○) or 5mM EDTA (□).

炎症局所では多種の活性化された免疫担当細胞の集積が認められ、活性酸素<sup>14)-16)</sup>や加水分解酵素<sup>17),18)</sup>が大量に存在することが知られている。従って、炎症局所にある蛋白質は完全な状態のままとどまっているとは考えがたく、その分解産物との混合状態で存在するものと予想される。本測定系はC-反応性蛋白質が持つ特徴的な結合活性(即ち、Ca<sup>2+</sup>依存性のホスホリルコリン結合活性)に基

づいて測定を行っているため、炎症組織抽出液中のC-反応性蛋白質を測定する場合でも、効果的にホスホリルコリン結合活性を保持したC-反応性蛋白質だけを測定することが可能であると考えられる。

2) ホスホリルコリン誘導体による阻害

Fig. 3はホスホリルコリン誘導体による本測定系の阻害活性を表わしたものである。1.5μg/mlのC-反応性蛋白質によって得られる結合活性は、ホスホリルコリン誘導体の添加によって濃度依存的に抑制され、それぞれ10μMのホスホリルコリン、200μMのホスホリルエタノールアミンの存在下で50%の阻害が認められた。

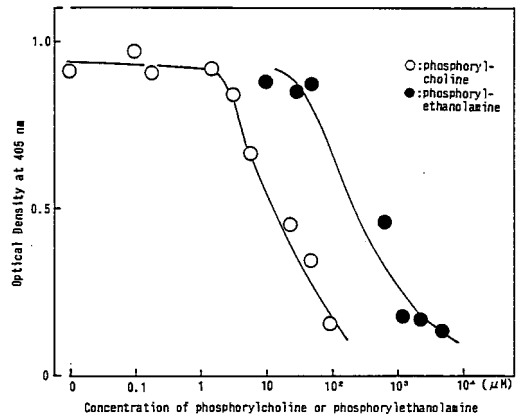


Fig. 3. Inhibition of C-reactive protein binding to APPC-BSA by phosphorylcholine and phosphorylethanolamine. Fifty μl of C-reactive protein solution (1.5μg/ml) was incubated with various concentrations of inhibitors (○, phosphorylcholine; ●, phosphorylethanolamine) in APPC-BSA immobilized plate for 12 hr at 4°C. Then, C-reactive protein concentration was measured as described in Materials and Methods.

炎症後、血中に分泌されたC-反応性蛋白質は正常部位ではなく炎症局所にのみ選択的に沈着する<sup>9)-12)</sup>ことが知られており、この原因として炎症部位でのフィブネクチンの露出やリゾホスファチジルコリンの生成が明らかとなっている<sup>23)</sup>が、C-反応性蛋白質がこれら物質にホスホリルコリン結合部位を介して結合するかどうかは未だ明ら

かではない。本研究で示した測定法は、C-反応性蛋白質のホスホリルコリン結合能に影響を与える物質を感度良く検出することが可能なため今後有効な手段として大いに利用されるものと考えられる。

### 3) ウサギC-反応性蛋白質の精製

APPC-セファロース 4 Bアフィニティゲルを用いたC-反応性蛋白質の精製の際の指標として本酵素免疫測定法を適用した。Fig. 4は、APPC-セファロース 4 Bカラムからの5 mM EDTAによるC-反応性蛋白質の特異的な溶出パターンを表わしている。

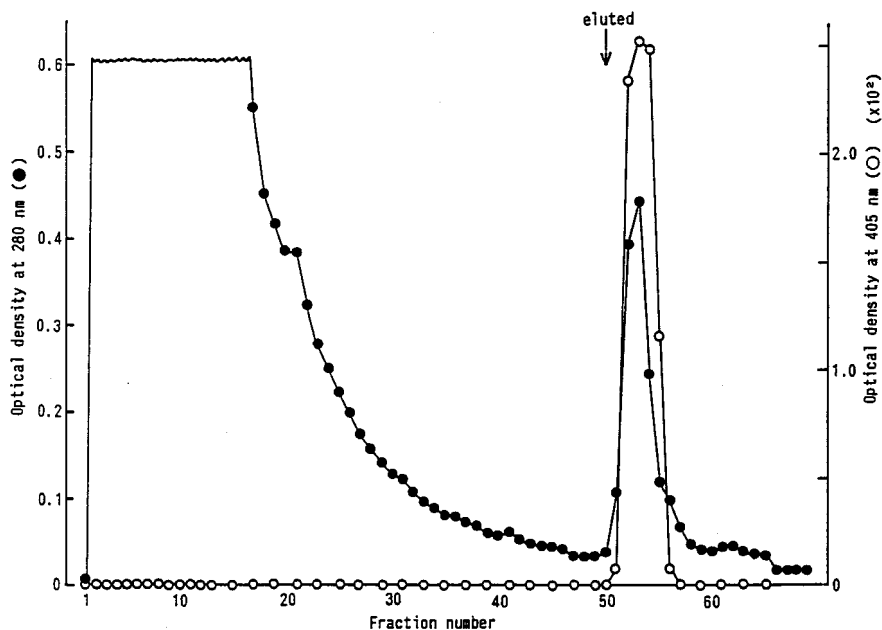


Fig. 4. Gel elution profile of C-reactive protein from rabbit acute phase serum on APPC-Sepharose 4B affinity gel (●, absorbance at 280 nm; ○, C-reactive protein concentration).

矢印の画分より溶出を開始したところ、特異的にC-反応性蛋白質がカラムから溶出し、これは280nmでの吸光度パターンとほぼ相関関係にあることが判明した。データには示さないが、カラムからの溶出画分をそれぞれ2-メルカプトエタノール存在下で12.5%アクリルアミド濃度のSDS電気泳動にかけたところ、本酵素免疫測定法で得られた値とほぼ相関して、分子量22.5Kダルトンの所のみ1本の泳動バンドが検出された。これらの知見より、本測定系は精製を行う場合など微量のC-反応性蛋白質を検出する際に適用性の高い有力な手法であることが示唆された。

### 5. 参考文献

- 1) de Beer, F.C., Hind, C.R.K., Fox, K.M., Allan, R., Krikler, D.M. Maseri, A. and Pepys, M.B.: Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br. Heart. J.*, 47: 239-243, 1982
- 2) Kushner, I., Broder, M.L. and Karp, D.: Serum C-reactive protein kinetics after acute myocardial infarction. *J. Clin. Invest.*, 61: 235-241, 1978
- 3) Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J., David, M., Hirao, T., Kishimoto, T., and Heinrich, P.C.: Recombinant human interleukin-6 (IL-6 / BSF-2 / HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett.*, 132: 347-350, 1988
- 4) Geiger, T., Andus, T., Klapproth, J., Hirano, T.,

- Kishimoto, T. and Heinrich, P.C. :  
Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo.  
*Eur. J. Immunol.*, 18 : 717-721, 1988
- 5) Syin, C., Gotschlich, E.C. and Liu, T. :  
Rabbit C-reactive protein.  
*J. Biol. Chem.*, 261 : 5473-5479, 1986
- 6) Kaplan, M.H. and Volanakis, J.E. :  
Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system.  
*J. Immunol.*, 112 : 2135-2147, 1974
- 7) Robey, F.A. Jones, K.D. and Steinberg, A.D. :  
C-reactive protein mediates the solubilization of nuclear DNA by complement in vitro.  
*J. Exp. Med.*, 161 : 1344-1356, 1985
- 8) Barna, B.P., Deodhar, S.D., Gautam, S., Yenlieberman, B. and Roberts, D. :  
Macrophage activation and generation of tumoricidal activity by liposome-associated human C-reactive protein.  
*Cancer Res.*, 44 : 305-310, 1984
- 9) Du Clos, T.W., Mold, C., Paterson, P.Y., Alroy, J. and Gewurz, H. :  
Localization of C-reactive protein in inflammatory lesions of experimental allergic encephalomyelitis.  
*Clin. Exp. Immunol.*, 43 : 565-573, 1981
- 10) Kushner, I. and Kaplan, M.H. :  
Studies of acute-phase protein. I. An immunohistochemical method for the localization of Cx-reactive protein in rabbits. Association with necrosis in local inflammatory lesions.  
*J. Exp. Med.*, 114 : 961-973, 1961
- 11) Kushner, I., Rakita, I. and Kaplan, M.H. :  
Studies of acute phase protein. II. Localization of Cx-reactive protein in heart in induced myocardial infarction in rabbit.  
*J. Clin. Invest.*, 42 : 286-1963
- 12) Parish, W.E. :  
Studies on vasculitis. VII. C-reactive protein as a substance perpetuating chronic vasculitis. Occurrence in lesions and concentrations in sera.  
*Clin. Allergy*, 6 : 543-550, 1976
- 13) Yatvin, M.B., Kreutz, W., Horwitz, B.A. and Shinitzky, M. :  
pH-sensitive liposomes: possible clinical implications.  
*Science*, 210 : 1253-1255, 1980
- 14) Halliwell, B. and Gutteridge, M.C. :  
Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection.  
*Trends Biochem. Sci.*, 11 : 372-375, 1986
- 15) McCord, J.M. :  
Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase.  
*Science*, 185 : 529-531, 1974
- 16) Sasada, M., Yamamoto, K. and Kubo, A. :  
Microbicidal mechanism of neutrophils.  
*Acta hematol. Jpn.*, 46 : 1470-1476, 1983
- 17) Vadas, P. and Pruzanski, W. :  
Biology of disease. Role of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in the pathobiology of disease.  
*Lab. Invest.*, 55 : 391-404, 1986
- 18) Pruzanski, W., Vadas, P., Stefanski, E. and Urowitz, M.B. :  
Phospholipase A<sub>2</sub> activity in sera and synovial fluids in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Its possible role as a proinflammatory enzyme.  
*J. Rheumatol.*, 12 : 211-216, 1985
- 19) Cuatrecasas, P. :  
Protein purification by affinity chromatography; Derivatizations of agarose and acrylamide beads.  
*J. Biol. Chem.*, 245 : 3059-3065, 1970
- 20) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. :  
Protein measurement with the Folin phenol reagent.  
*J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951
- 21) Bach, B.A., Gewurz, H. and Osmand, A.P. :  
C-reactive protein in the rabbit: Isolation, characterization and binding affinity to phosphocholine.  
*Immunology*, 14 : 215-219, 1977
- 22) Oliveira, E.B., Gotschlich, E.C. and Liu, T. :  
Comparative studies on the binding properties of human and rabbit C-reactive proteins.  
*J. Immunol.*, 124 : 1396-1402, 1980
- 23) Mori, S., Nakata, Y. and Endo, H. :  
Involvements of fibronectin and lysophosphatidylcholine for selective binding of C-reactive protein.  
*Cell. Mol. Biol.*, 37 : 421-431, 1991

## 要 約

ウサギC-反応性蛋白質を感度良く測定できる酵素免疫測定法を開発した。本法は、C-反応性蛋白質が分子内にホスホリルコリンを含有する種々の化合物に対してCa<sup>2+</sup>依存的な結合活性を示すことに基づいており、本法によって0.001 $\mu$ g以上のC-反応性蛋白質の検出が可能となった。固相に結合させたp-アミノフェニルホスホリルコリンへのC-反応性蛋白質の特異的な結合活性はEDTAやホスホリルコリン誘導体を添加することによって効果的に消失した。本法は炎症部位でのC-反応性蛋白質の役割を明らかにする上で有効な手段となるものと考えられる。

(1991年10月23日受理)