

「血中 Type II コラーゲン抗体の検索システム」

はじめに

Type II コラーゲン「K41」「K42」は、研究者の皆様のご要望により、1982年、わが国で初めて製品化いたしました。以来、多くの皆様にご利用いただいております。特に、大手製薬企業では、90%以上で使用され、「コラーゲン関節炎動物」の誘発剤として、いまや「基準品」とみなされていると自負しております。

一方、他分野、例えば、培養や病理の研究者の皆様からも種々のご要望をいただき、その都度特別に調製したり、専門家をご紹介したり、ご便宜をはかってまいりました。

今回、ご紹介する「血中 Type II コラーゲン抗体の検索システム」もその一つです。

現在、血中 Type II コラーゲン抗体の存在は、主として関節リウマチ(RA)患者について論議されています。その主な意見は、次のようなもので、未だ一致をみておりません。

- 1) 健康人、RA患者および非RA患者の抗体出現率
- 2) 初期RA患者には高頻度に出現するが、慢性RA患者では低下する
- 3) 肝疾患など、他疾病での出現率

この論議を進める上で、誰もが手軽に使い、感度の良い検索システムである、ELISA法を以下に詳しく述べたいと思います。

なお、本品は「コラーゲン関節炎動物」の抗体価測定に広く利用されているものです。



1 試薬 (品番 K 7 2 / 液型 / 0 0 / 1 2)

A	ラット用タイプ2コラーゲン (ウシ)	1 0 0 μ l / V	- 2 0 C 保存 (長期)
B	コラーゲン溶解剤	1 2 m l	
C	酵素標識抗体 (ラット) *希釈後 1 1 m l		*「C-2 抗体希釈液」で希釈する
D	検体希釈液 (濃縮)	2 0 m l	
E	発色基質液	1 0 m l	遮光保存
F	反応停止液	5 m l	
G	洗浄液 (濃縮)	2 0 m l	

* 保存温度は、「A (長期保存 - 2 0 C)」を除き、4 ~ 8 C。

「A」は使用時、4 ~ 8 Cで溶解させる。

2 試薬の調整 用時に行なう。

1) コラーゲン液

- ・「B コラーゲン溶解剤」9. 9 m lに、「A ラット用タイプ2コラーゲン (ウシ由来)」1 0 0 μ lを加え、4 ~ 8 Cで撹拌する。

2) 洗浄液

- ・「G 洗浄液 (濃縮)」1 容に、精製水 1 4 容を加える。

3) 検体希釈液

- ・「D 検体希釈液 (濃縮)」1 容に、P B S (pH 7. 4、各自用意) 4 容を加える。
2 ~ 8 Cで1 0 日間保存可。

4) 使用時

- ・全試薬と検体を室温に戻し、浮遊・沈殿物が完全に無くなるよう、静かに混和。

3 検体の調整

- 1) ラット血清 (又はラット関節液) 1 ~ 5 μ lを、検体希釈液で、通常 1 0 0 0 ~ 2 0 0 0 倍に希釈して用いる。抗体価に応じて、希釈倍数は、調整する。

2) その他

- ・検体の希釈剤として、異種動物血清 (ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ウシ、ウマ他) の濃度を工夫し、用い得る。

- ・検体の比較には健常群を用い、O D 値を比較する。

又は、健常群の O D 値を「1 単位」とし、陽性検体が健常群と同じ O D 値を示すまで希釈する。この希釈倍数を「単位の数値」とする。

* 構成試薬の凍結融解は、繰り返しを避ける。

* 試薬、検体の取扱いに際しては、皮膚、衣服に付着しないよう、充分留意する。

万一、付着した時は、直ちに大量の水で洗い流し、専門家の処置を受ける。

4 操作手順 (液型/00/12)

マイクロプレート (96well) を用意。

コラーゲン液 $100\mu\text{l}$ / well を加える。

1夜放置 (4℃、16時間) 後、上清を吸引除去。

洗浄 ($300\mu\text{l} \times 1$ 回) 後、ペーパータオル上にプレートを伏せ、水分を吸い取る (以下同)。

ブランクを除き、各ウェルに検体 $100\mu\text{l}$ を加える。

*プレートを、緩やかに、15秒間、混和。

室温で2時間放置後、上清を吸引除去。続いて洗浄 ($300\mu\text{l} \times 3$ 回 以下同)

「酵素標識抗体」 $100\mu\text{l}$ を加え、軽く混和。

カバーし、室温で1時間放置後、上清を吸引除去。続いて洗浄。

「発色基質液」 $100\mu\text{l}$ を加え、軽く混和。

カバーなしで、室温で30～5分放置。(青色の強さを目安にする)

「反応停止液」 $50\mu\text{l}$ を加え、軽く揺すって混和。直ちに、450nmで測定。

*非特異反応について

マイクロプレート法は、多くの利点があるが、固相法の為反応表面積が狭いとか、固相面が下部の為異物が沈着し易い等の短所を持つ。

それ故、抗体価が低い血清の時には、非特異的反応が、おこり易い。

非特異反応の影響を除去するには、検体中の交叉性物質が反応し難い程度に、検体を適当な希釈剤で希釈するか、検体毎に非特異反応を差引く方法がある。

希釈については、「3 検体の調整」中で述べてあり、ここでは後者について述べる。

例えば、「コラーゲン液」 $100\mu\text{l}$ を「検体希釈液」 1ml に加え、混和後この液で「血清」を100倍に希釈する (希釈倍数は「3 検体の調整」と同じに)。

これを、非特異反応を差引く為の「検体」とし、「4 操作手順」通りに扱えば抗体は検出されない。この時、検出された吸光度は非特異反応である。

以上の操作を、各検体毎に行ない、バックグラウンドとして差引けば、真の抗体の吸光度が得られる。

5 キットの貯法と有効期限

- ・未開封時、遮光下2-8℃で2ヵ月。

6 問合せ先

- ・コラーゲン技術研修会 (Fax. 0424-95-1990) 又は、お近くの試薬販売店へ。
- ・万全を期して出荷しておりますが、万一、構成試薬の不足、変質等がありましたら、直接ご連絡下さい (Tel. 0424-95-1995)。コラーゲンの特注品にも応じています。

7 製品のご紹介

- ・「K11」コラゲノキット

東京医科歯科大学永井裕教授、テネシー大学K. Terato助教授のご指導、ご助言により、世界で最初に開発されたコラゲナーゼ活性測定試薬。
発売以来25年、国内外での使用例、記載文献多数。

- ・「K41」「K42」タイプIIコラーゲン (ウシ由来)
リウマチ関節炎を研究目的に、1982年、世界で最初に製品化され、この分野での標準品として、使用されています。
- ・独自の精製法による各種動物由来のタイプIIコラーゲン
免疫用に、K40 (ラット), K43 (ニワトリ), K44 (ブタ)。
ELISA に、K45 (ラット), K46 (ウシ), K47 (ニワトリ), K48 (ブタ), K49 (ヒト), K49S (サル由来)。
- ・「K71」「K72」「K73」抗タイプIIコラーゲン抗体検索システム
ヒト用、ラット用及びマウス用の3種。
- ・蛍光標識タイプI (ウシ), タイプII (ウシ関節), タイプIV (ヒト胎盤)。
MMP活性の測定用基質に、代謝研究に、高感度ザイモグラフィーの基質(PAT.P)。
- ・「K34」タイプIVコラーゲン (ヒト由来)
ザイモグラフィーにも、お試し下さい。分子サイズは、再精製で、均一化。
国内で最もお使い易い価格 (1mg/ ¥34,000)。
- ・「K61」コラーゲンステインキット
コラーゲンの簡便染色定量キットとして世界で最初に製品化されたもの。
姉妹品「K62コラーゲンレッド」は組織の染色に。
- ・「K79H」「K79L」タイプIVコラーゲン測定ELISAキット
ヒト用、動物用の2種。
- ・「K81 デオキシピリジノリン」「K82 ピリジノリン」 骨粗鬆症の研究に。
- ・腎炎研究試薬
「K35 NC1」 ラット、サルでの腎炎モデル作製に。
ウシ腎糸球体よりタイプIVコラーゲンNC1領域を精製。
「K35 mono」 障害腎のみを免疫組織染色し、健常、回復腎を染色しない(PAT.P)
「K36 抗NC1抗体検出キット」 各種動物及びヒト用(PAT.P)。