

ヒトヘパリン静注後血漿中の肝性トリグリセリドリパーゼの抗原活性の 長期保存における安定性の検討

西村 誠,^{*,a} 岩永武敏,^a 大軽靖彦,^a 高木敦子,^b 池田康行^c

Studies on the Antigenic Stability of Hepatic Triglyceride Lipase in Human Postheparin Plasma during Long-Term Storage

Makoto NISHIMURA,^{*,a} Taketoshi IWANAGA,^a Yasuhiko OHKARU,^a
Atsuko TAKAGI,^b and Yasuyuki IKEDA^c

*Division of Laboratory Products, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.,^a 33-94 Enoki-cho, Suita City
564-0053, Japan, Department of Pharmacology,^b and Department of Etiology and Pathophysiology,^c
National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita 565-8565, Japan*

(Received January 6, 2003; Accepted April 2, 2003)

The present study describes how to process human postheparin plasma (PHP) containing hepatic triglyceride lipase (HTGL) that is utilized as a standard material of HTGL for the quantification of HTGL mass in human plasma. The optimal storage conditions for PHP were established by monitoring the stability of HTGL molecules in PHP as an antigen, which was stored in the liquid, frozen, or lyophilized state, using purified human PHP-HTGL as the standard material and a commercial HTGL ELISA MARUPI kit, which is a direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The HTGL ELISA MARUPI kit, for which the validity was confirmed by precision and dilution tests, showed that the immunoreactive mass of HTGL in lyophilized PHP remained stable for at least 12 months at a storage temperature of 4°C or lower. These results indicate that lyophilized PHP stored at a temperature of less than 4°C can be utilized as the standard material for the quantification of HTGL in human plasma using the HTGL ELISA MARUPI kit.

Key words—HTGL; immunological stability; enzyme immunoassay

緒 言

肝性トリグリセリドリパーゼ (hepatic triglyceride lipase : HTGL, EC 3.1.1.3) は、分子量 65 kDa の糖蛋白で、モノマーで活性型である。¹⁾ HTGL は、肝実質細胞で合成された後、細胞表面に転送され、ヘパリン硫酸様糖鎖を介して細胞表面に結合し、生理作用を発揮している。²⁾

HTGL は、食餌由来の大型リポ蛋白であるカイロミクロンや肝臓由来の超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein : VLDL) がリポ蛋白リパーゼ (lipoprotein lipase : LPL, EC 3.1.1.34) により小型化されたカイロミクロンレムナントや中間比重

リポ蛋白 (intermediate density lipoprotein : IDL) 及び高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein : HDL) に含まれるトリグリセリドやリン脂質の水解に関与し、²⁾ これらのリポ蛋白の異化代謝において重要な役割を担っている。

HTGL は、通常、血中にごく微量の酵素活性のない不活性型酵素として認められる。一方、ヘパリンを静脈内投与することにより細胞表面にヘパリン硫酸様糖鎖を介して係留していた活性型 HTGL を流血中に遊離することができる。このヘパリン静注後血漿 (postheparin plasma : PHP) は、活性型 HTGL を含むので、臨床検体として広く使用されている。HTGL 酵素異常は、PHP 中に含まれる活性型 HTGL の酵素活性を測定することで判定できる。^{1,3)} しかし、一般に用いられている HTGL の活性測定は、基質である長鎖トリグリセリドの乳化及び PHP 中に共存する LPL との分別定量が必須で

^{a)}大日本製薬株式会社ラボラトリープロダクツ部, ^{b)}国立循環器病センター研究所薬理部, ^{c)}国立循環器病センター研究所病因部

e-mail: makoto-nishimura@dainippon-pharm.co.jp

あり、一連の酵素活性測定方法が煩雑で長時間を要するため多検体処理には難点がある。

最近、我々はヒト HTGL 分子の異なる 2 つのエピトープを認識するモノクローナル抗体を用いてサンドイッチ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) を確立し、HTGL の蛋白量 (mass 量) の測定を可能にした。^{3,4)} この HTGL ELISA の確立のために一次標準としてヒト PHP より精製した HTGL 蛋白を用いたが、ELISA 試薬として広く普及させるため標準物質として利用できる HTGL 蛋白標品の確保が必要となった。利便性を重視し、HTGL を含むヒト PHP の凍結乾燥化を試み、その長期保存時における HTGL 蛋白の抗原活性の安定性について検討した。

実験の部

1. 材料 既知濃度の純正 HTGL 蛋白は、ヒ

ト PHP (ヘパリン静注後血漿) から精製した。¹⁾ 純正 HTGL 蛋白は、ヒト血漿と混合し、液体窒素中に保存した。この純正 HTGL 蛋白は、「HTGL ELISA マルピー」キット (大日本製薬株式会社、大阪) の評価のために使用した。HTGL 蛋白の抗原活性を検討するためのヒト PHP は、オクト社 (東京) より購入した。ヒト PHP は、体重 1 kg 当たり 30 ユニットのヘパリンナトリウムを静脈内投与し、10 分後に採血した全血を遠心して得た血漿である。購入した PHP は、液状、凍結状態、凍結乾燥品として保存し、PHP 中に含まれる HTGL 蛋白の抗原活性の経時的変化の解析のために使用した。

2. 方法

2-1. HTGL 蛋白を含む PHP の保存方法

PHP は液状で、150 μ l ずつプラスチックチューブ (イワキ、東京) に分注し、4°C 又は 25°C で 0, 2, 9, 24, 32 及び 48 時間保存した。一方、150 μ l の PHP

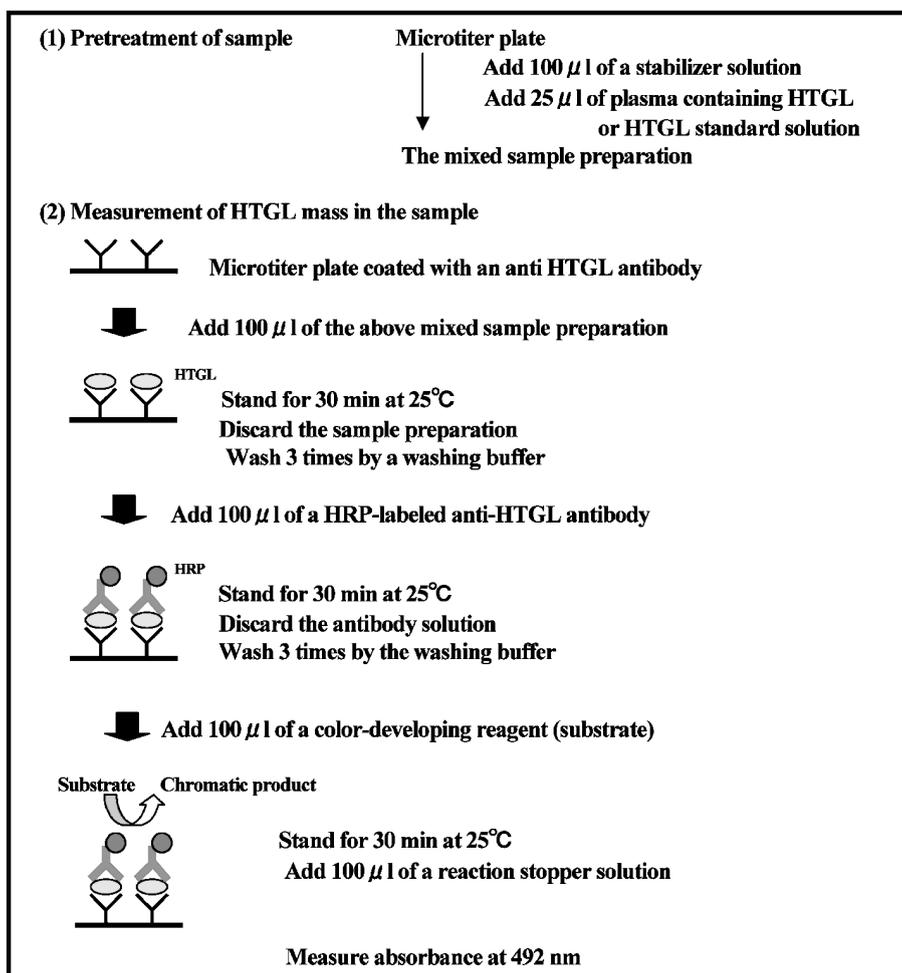


Fig. 1. Assay Procedure of the HTGL ELISA MARUPI Kit

を含むプラスチックチューブは、 -20°C 、 -80°C 又は液体窒素中で凍結し、2ヵ月間 (-20°C 、 -80°C)及び4ヵ月間 (液体窒素) 保存した。さらに、PHPを500 μl ずつガラスバイアル (内外硝子工業, 大阪) に分注し、予備凍結 (-30°C , 1時間) 後、凍結乾燥機 (日本真空技術, ULVAC DF-03H) にて真空度 0.01 torr で、18時間凍結乾燥し、常圧リーク時窒素置換し、PHPの凍結乾燥品を調製した。凍結乾燥品は、密栓して -80°C 、 -20°C 、 4°C 、 25°C 及び 37°C にそれぞれ12ヵ月まで静置保存した。

2-2. HTGL ELISA による HTGL 蛋白の定量
液状、凍結状態、凍結乾燥品として保存した PHP は、凍結状態の場合は融解し、凍結乾燥品の場合は500 μl の蒸留水で再溶解後、HTGL 蛋白の抗原活性の経時的变化を解析した。解析は、ヒト HTGL 特異的 ELISA である「HTGL ELISA マルピー」キットを用いて、Fig. 1 に示す方法にて行った。

結果及び考察

1. HTGL ELISA マルピーキットの評価

HTGL ELISA の信頼性は、既知濃度の HTGL 蛋白による標準曲線 (Fig. 2) を基に、同時再現性 (繰り返し10回) 及び日差再現性 (繰り返し10回) 実験により確認した。本測定系の検出下限は10 ng/ml であり、良好な希釈直線性を示した。標準曲線範囲は、0–800 ng/ml で良好な標準曲線が得られた (Fig. 2)。Table 1 に示すように、同時再現性及び日差再現性はいずれも変動係数 2.5% 以下の良好な再現性が得られた。

2. PHP を液状で保存後の HTGL 蛋白の抗原活性の経時的变化 ヒト PHP を 4°C 及び 25°C に静置保存し、PHP 中に含まれる HTGL 蛋白の抗原活性を経時的 (0, 2, 9, 24, 32 及び 48 時間) に HTGL ELISA で解析した結果を Fig. 3 に示した。 4°C 保存では24時間で約5%、48時間で約10%の抗原活性の減少が認められた。 25°C 保存では、24時間で約20%、48時間で約40%の抗原活性の減少が認められた。HTGL を含む PHP の 4°C 保存は、約24時間で完全に HTGL 酵素活性が失活すると報告されていることより、⁵⁾ HTGL ELISA における抗原活性は HTGL 酵素活性に比べて安定であった。これは、HTGL 酵素活性は酵素のわずかな変性な

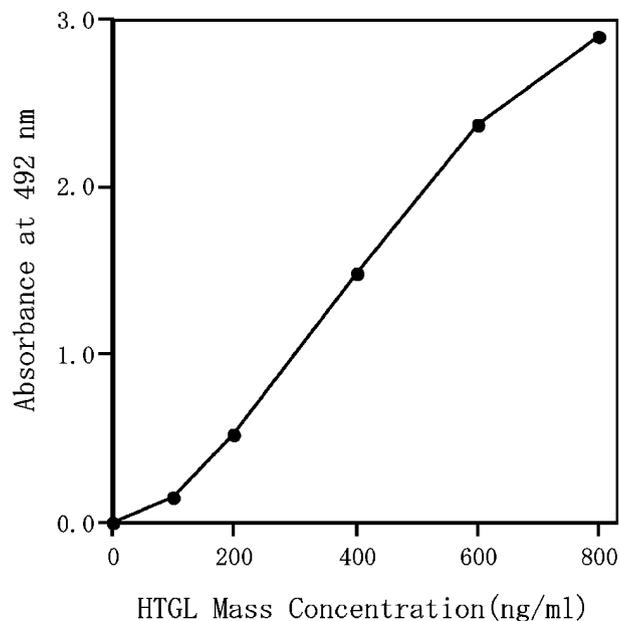


Fig. 2. Standard Curve of Human HTGL Mass with the HTGL ELISA MARUPI Kit

A purified human PHP-HTGL preparation was used as a standard material. Each plotted point represented the mean of three different measurements.

Table 1. Precision Test for Determination of HTGL Mass by the HTGL ELISA MARUPI Kit

	Sample	Assay number (n)	Mean (SD) of HTGL mass (ng/ml)	Coefficient of variation (%)
Intra-assay	A	10	416.6 (9.1)	2.2
	B	10	352.2 (6.4)	1.8
Inter-assay	C	10	452.4 (9.3)	2.1
	D	10	412.7 (10.2)	2.5

どが酵素活性に影響するが、抗原活性については抗体のエピトープ部分が残存していれば活性を保持するためと考えられる。

3. PHP を凍結状態で保存後の HTGL 蛋白の経時的变化 ヒト PHP を -20°C 、 -80°C 又は液体窒素中に静置保存し、融解後、PHP 中に含まれる HTGL 蛋白の抗原活性を経時的 (1ヵ月, 2ヵ月, 3ヵ月及び4ヵ月) に HTGL ELISA で解析した結果を Fig. 4 に示した。少なくとも、 -80°C 保存では2ヵ月間、液体窒素保存では4ヵ月間、HTGL の抗原活性の減少は認められなかった。一方、 -20°C 保存の場合、1ヵ月間の保存で約10%程度の減少が認められた。

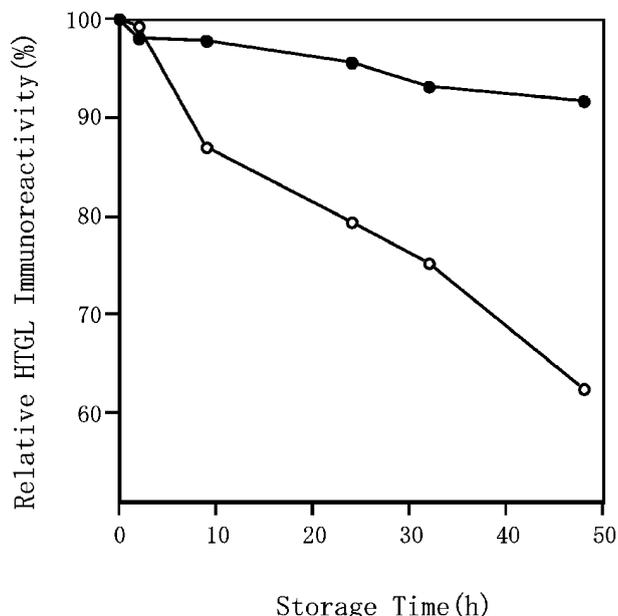


Fig. 3. Time Course of the Antigenic Stability of HTGL Immunoreactive Mass in Human PHP Stored in a Liquid State at 4°C (●) or 25°C (○)

After storage for the indicated time, the HTGL immunoreactive mass was measured with the HTGL ELISA MARUPI kit.

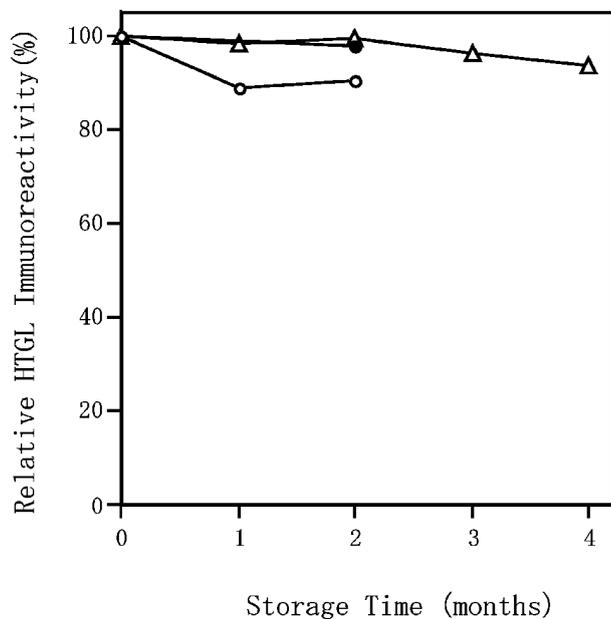


Fig. 4. Time Course of the Antigenic Stability of HTGL Immunoreactive Mass in Human PHP Stored in a Frozen State at -20°C (○), -80°C (●) or in Liquid Nitrogen (Δ)

After storage for the indicated time, HTGL immunoreactive mass was measured with the HTGL ELISA MARUPI kit.

4. PHP を凍結乾燥品として保存後の HTGL 蛋白の経時変化 凍結乾燥したヒト PHP を、-80°C, -20°C, 4°C, 25°C 及び 37°C で保存し、再溶

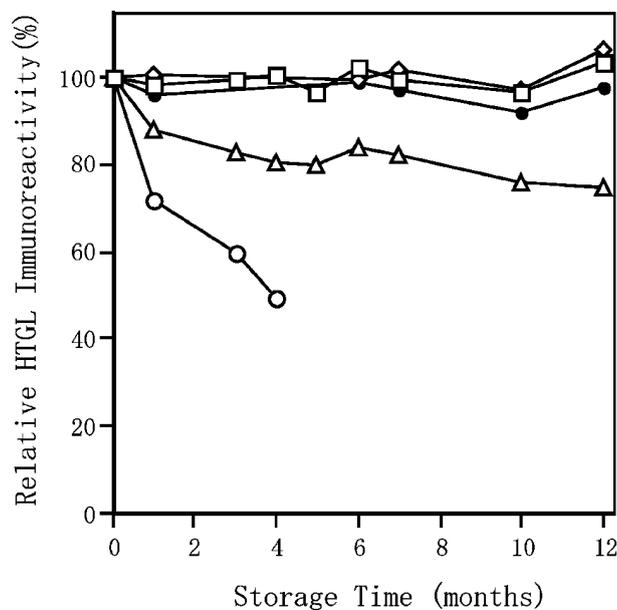


Fig. 5. Time Course of the Antigenic Stability of HTGL Immunoreactive Mass in Human PHP Stored in a Lyophilized State at -80°C (□), -20°C (◇), 4°C (●), 25°C (Δ) or 37°C (○)

After storage for the indicated time, HTGL immunoreactive mass was measured with the HTGL ELISA MARUPI kit.

解後、PHP 中に含まれる HTGL 蛋白の抗原活性を経時的に解析した結果を Fig. 5 に示した。-80°C, -20°C 及び 4°C 保存では 12 ヶ月間で顕著な抗原活性の減少は認められなかった。一方、25°C 保存では 12 ヶ月間で約 25% の抗原活性の減少が認められ、37°C 保存では 4 ヶ月間で 50% の減少となった。さらに 37°C 保存では 5 ヶ月目以降では凍結乾燥 PHP の再溶解時に内容物の不溶化が起こり、HTGL 蛋白測定を実施することができなかった。

不安定な蛋白を長期間保存する方法として凍結乾燥法が、クレアチンキナーゼ、⁶⁾ フォスフォフルクトキナーゼ⁷⁾ 及び α -アミラーゼ⁸⁾ などの蛋白に適用され、長期保存に成功しているため、凍結乾燥法を HTGL 蛋白にて検討した結果、HTGL 蛋白を含む PHP を凍結乾燥した標品は、4°C 以下の保存温度であれば 1 年間開始時と同等の抗原活性を保持し、長期保存に耐え得るものであることが確認できた。よって、HTGL 蛋白を含む PHP は大量供給が可能で、凍結乾燥した PHP 標品は、HTGL ELISA マルピーキットの HTGL 標準品として用いることが可能となった。

REFERENCES

- 1) Ikeda Y., Takagi A., Yamamoto A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1003**, 254–269 (1989).
- 2) Santamarina-Fojo S., Haudenschild C., Amar M., *Curr. Opin. Lipidol.*, **9**, 211–219 (1998).
- 3) Ikeda Y., Takagi A., Ohkaru Y., Nogi K., Iwanaga T., Kurooka S., Yamamoto A., *J. Lipid Res.*, **31**, 1911–1924 (1990).
- 4) Nishimura M., Ohkaru Y., Ishii H., Sunahara N., Takagi A., Ikeda Y., *J. Immunol. Methods*, **235**, 41–51 (2000).
- 5) Jensen G. L., Bensadoun A., *Anal. Biochem.*, **113**, 246–252 (1981).
- 6) Whitner V. S., Morin L. G., McKneally S. S., Sampson E. J., *Clin. Chem.*, **28**, 41–44 (1982).
- 7) Carpenter J. F., Martin B., Loomis S. H., Crowe J. H., *Cryobiology*, **25**, 372–376 (1988).
- 8) Gubern G., Canalias F., Gella F. J., Colinet E., Profilis C., Calam D. H., Ceriotti F., Dufaux J., Hadjivassiliou A. G., Lessinger J. M., Lorentz K., Vassault A., *Clin. Chim. Acta*, **251**, 145–162 (1996).