赤血球凝集反応による抗サイログロブリン抗体 検出の特異性に関する検討

虎の門病院内分泌検査部及び内分泌学科, 沖中記念成人病研究所

小林 俊子, 紫 芝 良 昌

Specific and Non-specific Reaction of Hemagglutination for the Detection of Anti-Thyroglobulin Antibody

Toshiko KOBAYASHI and Yoshimasa SHISHIBA

Division of Endocrinology and Endocrine Research Laboratory, Toranomon Hospital,
and Okinaka Memorial Institute for Medical Research, Akasaka, Tokyo.

Tanned red cell hemagglutination has been widely accepted for use in the detection of anti-thyroglobulin antibodies. The interpretation, however, especially when the hemagglutination was observed at a low titer of serum dilution, has remained equivocal. In order to separate specific and non-specific hemagglutination, we tried to concentrate serum IgG to compare the hemagglutination titer at various concentrations of IgG. If the hemagglutination is specific for the presence of antithyroglobulin antibodies, the hemagglutination titer would increase as the IgG concentration rises. On the contrary, when the hemagglutination is non-specific and irrelevant to the presence of anti-thyroglobulin antibodies, the hemagglutination titer is expected not to increase while the IgG concentration rises. Based on this hypothesis, sera which showed various hemagglutination titer for anti-thyroglobulin antibodies were studied to examine the parallelism between hemagglutination titer and IgG concentration.

IgG was concentrated with the method of ammonium sulfate precipitation. The grade of concentrate was examined by the IgG determination with the method of immunodiffusion technique employing the kit distributed by Behringwerke. The hemagglutination test was performed with the Boyden's method using the kit distributed by the Wellcome Company.

The results showed that 4 out of 15 sera whose original hemagglutination titer was 1:3 failed to show increase in hemagglutination titer even at the 2 to 4 fold concentration of IgG. On the contrary, only 2 out of 26 sera whose hemagglutination titer was more than 1:6, failed to increase the titer at the IgG concentrate to the same degree. Thus, it is possible to conclude that the hemagglutination observed at 1:3 dilution of the serum is highly non-specific, while that observed at a serum dilution of more than 1:6 is thought to be specific.

緒 言

橋本病を診断する場合、赤血球凝集法を用いて抗サイログロブリン抗体 (抗 TG 抗体と略す) を検出することは診断上、貴重な手掛かりを与える重要な検査である。しかしながら、血清の稀釈系列に一定量の感作赤血球を加えて凝集を眼でみて確かめる検査であるから、高力価の抗体の測定には問題がないとしても、1:10或はそれ以下の血清稀釈で赤血球凝集が起つていると判定した場合、この凝集と判定した現象が本当に抗体が存在したために生じたのかどうか心配である。そこで1:40以上を陽性にする、とか、或は1:100以上を陽性とする、など各研究者が cut off line を任意にきめてこの検査を行つているのが現状である。cut off line が異なれば、当然抗 TG 抗体検出の陽性率も異なることになるであろう。我々はこのような問題を解決する一つの方法として、血清の免疫グロブリンを濃縮した場合の抗 TG 抗体の力価の変動を応用することが出来ないかと考えた。もし、感作赤血球の凝集が実際に血清中の抗 TG 抗体の存在によつて起つているのであれば、血清免疫グロブリンを濃縮して検査すれば、免疫グロブリンの濃縮され具合に相当して、赤血球凝集の力価も上昇する筈である。逆に感作赤血球の凝集を誤認して陽性と判定したり血清蛋白の非特異的な影響により赤血球の凝集が起つているように判定した場合などでは、血清免疫グロブリンの濃縮によつても、赤血球凝集の力価は上昇して来ない筈である。このような考えにもとづき比較的低力価の抗 TG 抗体があると判定された血清を再検討したので報告する。

実験材料及び方法

1) 抗 TG 抗体の検出

タンニン酸処理 TG 感作羊赤血球、対照羊赤血球は、Wellcome 社により市販されているキットを使用した¹⁾。また、感作赤血球及び対照赤血球を凍結乾燥した富士臓器製薬により市販されているキットも平行して使用した²⁾。但し感度を Wellcome 社のキットと同一にするために感作赤血球、未感作赤血球とも稀釈を通常使用量の2倍とした。これら市販のキットを使用したのは、これらにより測定を行つている施設が多いためである。方法は血清 0.1 ml に対照赤血球浮遊液 0.05 ml を加え、室温で30分以上インキュベートし、遠沈して上清を回収し、microtiter cup を用いて倍々に稀釈し、各 cup の内容 0.025 ml 中に感作赤血球浮遊液 0.025 ml を加え室温に放置して24時間後に赤血球凝集を判定した。判定は検体の identity を知らない判定者が行い主観の混入をさけるように配慮した。

2) 被検血清

上記の方法で判定して赤血球凝集の起らなかった血清11例、血清稀釈 1:3 で凝集が生じたと判定されたもの15例、1:6で凝集したと判定されたもの6例、1:12のもの5例、それ以上の凝集力価を示すもの15例の血清につき、血清中の IgG, IgM, IgA を測定し³⁾、かつ、抗体の力価を調べ、血清グロブリンを濃縮した液についても同様の検査を行つた。

3) 免疫グロブリンの濃縮

Meek ら⁴⁾による硫酸分画法を用いた。すなわち血清 0.9 ml を小試験管にとり、0.6 ml の飽和硫酸を加え、一晚冷蔵庫内に放置した後、3,000回転で30分間遠沈し、上清を除去し、沈澱を2~3滴の生理食塩水に溶解し、セルロースチューブにつめ、3 l の生理食塩水に対して24時間透析した。血清及びグロブリン濃縮液の IgG, IgM, IgA を、ヘキスト社製、Tri-partigen キットにより免疫拡散法により定量した⁵⁾。検量曲線の作製には、Behringwerke 社製 standard human serum を使用した。

実験成績

血清 IgG の濃度は 520 mg/dl から 2,560 mg/dl に分布するが、濃縮によつて2~4倍に濃縮された。IgG の濃度を横軸にとり、縦軸に感作赤血球凝集を得るための血清又はグロブリン液の最終稀釈度 (抗 TG 抗体力価と定義する) を示したものが Fig. 1 である。原血清について赤血球凝集が認められなかった11例

については、IgG を 2～3 倍に濃縮しても力価の上昇したものは 1 例もなかった。次に、原血清の抗 TG 抗体力価が 1:3 のもの 15 例中 4 例は IgG 濃度が 2～4 倍に濃縮されているにもかかわらず抗体価の上昇を示さず、赤血球凝集が IgG によらない非特異的なものであると判定された。残り 11 例については IgG 濃縮に伴って力価の上昇がみとめられた。原血清の凝集価 1:6 を示した 6 例、1:12 を示した 5 例は、全例、IgG 濃縮により凝集力価の上昇がみとめられた。1:12 以上の力価を示した血清についても、大部分が IgG 濃度の増加に伴って凝集力価の上昇を示した。但しそのうち 1:24 の力価を示す 1 例と 1:96 の力価を示す 1 例は IgG が濃縮されているにもかかわらず、力価の上昇をみとめなかった。同様な検討を、IgM 及び IgA について行つた結果をそれぞれ Fig. 2 及び Fig. 3 に示す。

Fig. 1. Effect of IgG concentration on the titer of hemagglutination.

Fig. 2. Effect of IgM concentration on the titer of hemagglutination.

Fig. 3. Effect of IgA concentration on the titer of hemagglutination.

考 擦

赤血球凝集法による抗 TG 抗体の検出にあたって低力価の凝集をどのように解釈するかについては長らく疑問のままだに残されて来た。1:10以上を陽性とするとしている人々が多いにしてもそれはそうに定義したのであつて具体的な根拠はあまりなかつたのではないかと考えられる。我々がこの検討に用いた方法は、Chopra ら⁵⁾が、LATS bioassay の非特異的な反応を特異的な反応と区別するために用いた方法と同様である。このような方法を用いて、血清グロブリンによる何らかの反応の特異性を検討しようとする場合、グロブリンの濃縮に伴つて、抗体によると考えられる反応が上昇しなければ、それは非特異的な反応であるか、或はグロブリン濃縮による抗体過剰による反応の阻止が原因となつていていると考えられる。我々の実験の場合、原血清の抗体力価の測定に於て、抗体過剰による反応阻止帯を示したものは1例もないから、グロブリンの濃縮によつても凝集力価の上昇しなかつた血清については、その原血清における凝集はすべて非特異的な反応と考えざるを得ない。1:24, 1:96と比較的高い凝集価を示した血清について、凝集価が IgG と共に上昇しなかつた理由は明らかでない。逆に、血清グロブリンの増加と共に凝集力価が上昇したとしても、それをすべて特異的な反応と考えることは出来ない。もし抗体以外の血清中の成分が非特異的な凝集の原因になつていている場合、グロブリンと共にこれが濃縮されて来る可能性を否定することは出来ないからである。従つて方法の限界は、これらの検討によつて、非特異的な反応が少くともどの位以上あり得るかを明らかにするとどまることである。我々の検討の結果、原血清で1:3の凝集価が得られた場合、少くとも30%以上が非特異的な反応と考えられる。1:6以上の凝集の力価を得た場合には、非特異的な反応は2%以上であることになる。従つて、1:10附近を cut off line と定めるのが適當であると考えられる。このような判定は従来も行われているものであるが、その判定に一つの合理的な根拠を与えることが出来たと考えられる。

付 我々は全く同様の方法を用いて抗甲状腺マイクロソーム抗体を市販のキット (富士臓器製薬) を用いて検出する場合の特異性の検討も合わせて行つた。1:12までの力価に関しては60%が非特異的な反応と考えられる。それ以上の凝集力価を示す血清に関しては、抗体過剰による凝集阻止を示す場合が多く、この方法による非特異性の検討には適さないのでは結果は記載しなかつた。

・本研究は橋本病研究班の援助のもとに行われたものである。

文 献

- 1) Witebsky, E. and N.R. Rose: J. Immunol. 76: 408, (1956).
- 2) 「サイロイドテスト」富士臓器製薬株式会社, 昭和49年7月.
- 3) Mancini, G., A.O. Carbonara and G.F. Herwans: Immunochemistry. 2: 235, (1965).
- 4) Meek, J.C., A.E. Jones, U.C. Levis and W.P. WanderLaan: Proc. Nat Acad. Sci U.S.A. 52: 342, (1964).
- 5) Chopra, I.J., D.H. Solomon and N.P. Limberg: J. Clin Endocr. 31: 382, (1970).