Solid Phase Radio immunoassay 法による供血者の オーストラリア抗原の分布についての検討

石 井 良 治 ・ 平 野 武 道

(慶応大学医学部輸血センター)

(受付: 昭和47年10月4日)

STUDIES ON THE DISTRIBUTION OF AUSTRALIA ANTIGEN AND ANTI AUSTRALIA ANTIGEN ANTIBODY IN FAMILY DONORS BY SOLID PHASE RADIOIMMUNOASSAY

by

Ryoji ISHII and Takemichi HIRANO

(Blood Transfusion Center, School of Medicine, Keio University)

The distribution of Australia antigen (Au-ag) and the antibody towards the antigen (Au-ab) in family donors in Blood Transfusion Center, School of Medicine, Keio University, was studied by using Solid Phase radioimmunoassay technique.

Au-ag was detected in 5.9% of the tested donors, and Au-ab was detected in 23%.

No relationship among the value estimated of Au-ag, SGOT and SGPT in donors could be found.

序言

1965年オーストラリア抗原 (以後 Au-Ag と略) が, Blumberg¹⁾ によって発見されて以来, Au-Ag と血清肝炎との病原的関係の可能性について論じられてきた。また Au-Ag の検査法も今日まで ouchterlony 法, Immunolectrosyneresis (IE) 法, Complement-fixation (CF) 法, Immunoadherence-hemagglutination (IAH) 法, Passive-hemagglutination (PAH) 法などが利用されてきている。しかしながら, これらの諸法のうち PHA 法を除く測定法はすべて Au 抗体の検出率が極めて悪い。また Au 抗原の検出法についていえば, より満足的なものが求められている。大河内²⁾は Microdouble-Diffusion 法で発見できない抗原の存在も無視で

きないものであるといっている。それを裏づけるように村上³⁾は Ouchterlony 法で Au-Ag の検出を行なった結果, その検出率は 0.78% と報告している。小島⁴⁾は 1971年10月末現在で MO 法で 0.66%, IE 法で 1.11%, Single-radial-immuno-diffusion (SR) 法で 0.94% の Au-Ag を検出した。また IA, IE, SR 法の3法で調査した 505 件の新鮮血についても IA 法で 8 例, IE 法で 4 例, SR 法で 5 例の陽性を認めた, と報告している。今井⁵⁾は PHA と IE 法によって供血者の Au 抗体の検出を行なった結果 PHA 法で 11.7%, IE 法で 0% であったと報告している。Au-Ag 陽性者の血液を輸血に用いることなく陰性血液のみを輸血に用いて, なお血清肝炎発症を見ることは検査法

の検出率と鋭敏度が満足的でないことを示唆するものと思われる。したがって、更に鋭敏な方法の開発が望まれる。

Radioimmunoassay (RIA) は Berson および, Yelow により開拓された微量タンパク定量法で, 本法の Au-Ag および Au-Ab 定量への応用は Walsh および Berson¹⁶⁾にはじまり Coller および Millman⁷⁾の研究があり, わが国では豊島, 瀬戸 稲垣らの報告¹⁰⁾がある。Millman らは Au-Ag の測定を I D 法および C F 法と Radioimmunoprecipitation (RIP) 法と比較して R I P 法は前 2 者の方法より Au-Ag 検出に関しては, 1000 倍, Au-Ab の検出では 20,000 倍鋭敏であると報告している。Hollinger⁹⁾ は, R I は, P H A 法よりも測定限界希釈度において 5-35 倍鋭敏であると報告している。Overby⁹⁾ もまた Au-Ag の検出鋭敏度は C F

表 1 Family Donors の Au-抗原検出における S-RIA と I E の比較

測定法 事項	S-RIA		I E
	cutoff point 7 × S.D.	Cutoff point 2.1 $\bar{x}$	
テストされた donor	367	367	367
Au-抗原陽性数	22	16	4
陽性者のパーセント	5.9 (%)	4.3 (%)	1 (%)

が 16 倍希釈あるのに対し, 250 倍希釈まで検出しようと報告している。わが国では, 豊島, 瀬戸, 稲垣¹⁰⁾により membrane filter を用いた R I A および Solidphase RIA が Au-Ag ならびに Au-Ab の検出および定量の点で非常に高い効率をもってることが報告されている。すなわち供血者志願者のスクリーニングにおいて, M O 法, C F 法, I E 法と R I A の比較検討で Au-Ag 陽性をみると R I A 法で 4.71%, M O 法と I E 法では 0% C F 法では 0.94% の検出率であったと報告している。さらに C F 法と R I A 法の鋭敏度の比較で Solidphase RIA 法は C F 法より 157 倍鋭敏であると報告している。また, 豊島, 瀬戸, 稲垣¹¹⁾らは, R I A を使用することにより Au-Ag の検出は 5% に上昇するが Au-Ab の検出も 47% に達したと

報告している, また血清肝炎と臨床的に診断された患者の発症初期の血清中より R I A 法を用いると 90% に及ぶ高率で Au-Ag を検出する事ができたと報告している。そこでわれわれは Solidphase-RIA を利用し, 供血者のスクリーニングを行ない 5.9% の Au-Ag と 23% の Au-Ab の検出率を得たので報告する。

実験方法および材料

Solidphase-radioimmunoassay 法

Au-Ag と Au-Ab の標準曲線の作成

- 1) Au-Ag および Au-Ab の検出はポリエチレンのおのの小試験管に Au-Ab および Au-Ag の coat されたものを用いる。
- 2) この試験管に被検液, あるいは段階希釈した標準 Au-Ag または Au-Ab を加える。
- 3) 水平の所で 16 時間 25℃ 室温に放置する。
- 4) 洗浄液として, トリスバッファー溶液を用い, その 1 ml で 5 回洗浄する。
- 5) ¹²⁵I でラベルした Au-Ab あるいは Au-Ag を各小試験管に 0.1 ml を入れる。
- 6) 室温に 90 分放置する。
- 7) ロジック 101 型のウエル型ガンマー測定器でカウントする。

著者は R I A を用いて測定する際の cutoff point を 7 $\bar{x}$ S.D. に決め, これを越えたものを Au-Ag および Au-Ab 陽性とした。またアメリカにおいてアボット社では 2.1 $\bar{x}$, すなわち 10-12 S.D. に相当する測定誤差を越えたものを陽性としているので, この cutoff point を用いた計算も行なって見た。

実験結果

1) Solidphase-RIA 法と Immuno-electrocytotoxicity とによる Au-Ag 検出の比較

慶大病院輸血センターでは訪れた family donors について日常 I E 法をもって Au-Ag の検出を行っているため, R I A と I E との比較検討を行った。

表 1 に見られる如く検査件数 367 例中に 7 S.D. を Cutoff point にした場合 Au-Ag 陽性 22 例 (5.9%), 2.1 $\bar{x}$ を cutoff point にした場合 16 例 (4.3%) に Au-Ag 陽性者を R I A でみとめた。一方, I E 法は Au-Ag 陽性は 4 例 (1%) を認めるに

すぎず，RIAとIEの比較で cutoff point を 7，Sとすると 5.9対1，cutoff point を $2.1\bar{X}$ とすると 4.3%という検出率になった。これらの結果は在来の検出法で Au-Ag 陰性として選択されその血液を輸血しても血清肝炎減少への方をたどらないことの一因を示唆しているのではないだろうか。

2) Solidphase-RIA と IE での Au-Ab 検出の比較

表2に示すごとく Solidphase-RIA の検査件数 105例中，7 S.D. を cutoff point とした場合 Au-Ab 陽性者は24例 (23%) であった。一方，IE 法による検査件数 2,800例中20例，0.7%に抗体を認めるにすぎなかった。これらの結果は RIA の優位性を裏づけるものであろう。

表2 S-RIA と IE による Family Donors における Au 抗体の検出

測定法	S-RIA	I E
	cutoff point 7 S.D.	
事項		
テストされた donor 数	105	2800
Au-抗体陽性数	24	20
Au-抗体陽性者パーセント	23(%)	0.7 (%)

3) Au-Ag 陽性者における RIA 法と IE 法とによりえられた測定値の関係について

まず実験結果を比較する場合，RIAについて はCPMを比較するのみでは正確な相互比較は得られないので，比較条件を統一して行う必要がある。このため $\left(\frac{\text{テストサンプルの CPM}-\text{コントロールの CPM}}{\text{コントロールの CPM}} \times 10 \right)$ の計算式によって，放射活性係数を求めて検討した。

図1で示すごとく Au-Ag の検出で IE 法で陽性となるものは，RIA法での放射活性係数も高い数値を示しこれらの測定法で得られた値の間には一定の関係が見られるようである。

4) Solidphase-RIA による Au-Ag 陽性者の GOT および GPT 値について

表3に示すごとく GOT，GPT とともに正常値にされている単位の範囲に Solidphase-RIA に

よる Au-Ag 陽性者の1例が含まれている。残る1例について，わずかに GOT の異状値がみつめられる。この結果 Au-Ag 検出の陽性と GOT 値

図1 S-RIA と IE の検出効率の比較

表3 S-RIA 値と GOT および GPT 値との関係

Au-抗原の検出		GOT および GPT の検出			
S-RIA Index	I E 法による陽性数 (人)	GOT		GPT	
		unit	人数 (人)	unit	人数 (人)
		1			
5		1- 5	2	1- 5	3
5, 6		6-10	2	6-10	7
12,16, 6,135,7	1	11-15	5	11-15	4
83, 4, 224	1	16-20	8	16-20	1
4,10,40,84,29	1	21-25	4	21-25	6
24, 59, 119, 6		26-30		26-30	
		31-35		31-35	
79		36-40	1	36-40	
144	1	41-55		41-55	1
		105		105	

および GPT 値の上昇との間には何ら関係ないように思われる。

5) Solidphase-RIA で Au-Ag 陽性となった

血液を輸血されたヒトの経過について

この点について今回は予報の結果として報告する。図2に示すごとくわれわれは Au-Ag 陽性と判定された血液を輸血された患者で8-10週まで追跡可能な2人について調べて見た。

患者 A: Au-Ag 陽性で、放射活性系数が 144 の血液を 1 本、その他に陰性血 17 本の輸血を行なっている。輸血後 2 週目より徐々に GOT, GPT はともに上昇をつづけ、222,480 となり血清肝炎症状を呈した。

図2 Au-抗原陽性血漿を輸血された患者の経過

患者 B: Au-Ag 陽性放射活性系数 161 の血液を 1 本、そのほか陰性血 15 本輸血された。3 週目より GOT, GPT 値が上昇したが血清肝炎症状を呈した。しかし、Au-Ab の検出はできなかった。

患者 C および E: Au-Ag 陽性放射活性系数 131 と 12 のものが輸血されているが、GOT, GPT の変化は認められなかった。

患者 D: Au-Ag 陽性放射活性系数 83 の血液を 1 本、そのほか陰性血 3 本を輸血している。2 週目

より Au-Ab を検出しているが GOT, GPT の変化は認められない。

考察および結語

Solidphase-RIA による Au-Ag と Au-Ab の検出を行ない検討した結果 Solidphase-RIA はこれまで豊島、瀬戸、稲垣によって報告されてきたように Au-Ag, および Au-Ab の検出に鋭敏で有効な方法である。

今回われわれのえた Au-Ag 5.9%, Au-Ab 検出 23% の検出率は豊島らの Au-Ab 検出率約 50% 血清肝炎初期患者より、100% ちかい Au-Ag の検出との報告を合せて考えると一般に健康とされている人々でも、Au-Ag の汚染にさらされていることを示唆している。

また、GOT, GPT の正常値の範囲に Au-Ag および Au-Ab の多くが発見されていることから、GOT, GPT と Au-Ag あるいは Au-Ab との間に何ら相関関係がないように思われる。これを裏づけるように大河内¹²⁾は Au 抗原は血中酵素と必ずしも併行しない。従って肝障害の程度を示すものとは考えにくいといっている。吉田¹³⁾は、供血者では GPT が 40 単位以上の者には Au-Ag を見いだせなかったが 40 単位以下の者に高頻度 Au-Ag を見いだされていると報告している。そのほか村上⁸⁾、吉田⁹⁾、高橋¹⁴⁾、竹本¹⁵⁾、らも同じような報告を行なっている。これらの結果を総合すると地域的な差はなく GOT と GPT の正常値者の中に広く Au-Ag, および Au-Ab が分布している。また放射活性系数の高いものは GOT および GPT 単位の低い数値の方に見られ、放射活性系数の低いものが GOT, および GPT 単位の高い数値を示すことから、血中酵素に関する検査の数値は Au-Ag および Au-Ab 検出と直接的に結びつかないものと思われる。

今後、さらに Au-Ag 陽性血液の輸血を受けたものの詳細な追跡実験を行ない報告する予定である。

本研究を行なうにあたって、慶大薬化学研究所化学療法部門、豊島博士、瀬戸博士、稲垣先生ならびに島村先生のご指導に感謝する。

文献

- 1) B.S. Blumberg, H.J. Alter & S. Visnich: *J.A.M.A.*, **191**: 541, 1965.
 - 2) 大河内一雄ら: 日本輸血学会雑誌, **16** (4・5): 114-116, 1965.
 - 3) 村上省三ら: 日本輸血学会雑誌, **17** (5・6): 216-217, 1970.
 - 4) 小島健一ら: 第20回輸血学会総会講演 (4), 1972.
 - 5) 今井光信ら: 医学のあゆみ, **78** (12): 759-760, 1971.
 - 6) J.H. Walsh, R. Yalow & S.A. Berson: *J. of In. Dis.*, **121**: 550, 1970.
 - 7) J.A. Coller & I. Millman: *J. Clin. Investg.*, **49**: 20A, 1970.
 - 8) F.B. Hollinger & V. Vordam: Hepatitis Scientific Memonanda. August, 1971, Memo H-173.
 - 9) C.M. Ling & L.R. Overby: Hepatitis Scientific Memonanda. October. 1971, Memo H-212.
 - 10) a) 豊島 滋ら: 小児科臨床, **24** (11): 32-40, 1971. b) 瀬戸淑子: 慶応医学, **49** (1): 35-42, 1972.
 - 11) 豊島 滋ら: 第11回日本核医学会総会講演, 1971.
 - 12) 大河内一雄ら: 臨床免疫, **1** (4): 405-416, 1969.
 - 13) 吉田 浩ら: 臨床免疫, **2** (3): 351-354, 1970.
 - 14) 高橋一洋ら: 日本輸血学会雑誌, **17** (5・6): 217-219, 1970.
 - 15) 竹本吉夫ら: 第20回輸血学会講演 (17), 1972,
-