九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

マイクロタイターによるASO価測定法の基礎的検討

山田, 巌
九州大学医療技術短期大学部

澤江, 義郎
九州大学医療技術短期大学部

https://doi.org/10.15017/109

出版情報：九州大学医療技術短期大学部紀要. 6, pp.56-61, 1979-03-25. 九州大学医療技術短期大学部
バージョン：
権利関係：

マイクロタイターによるＡＳＯ価測定法の基礎的検討

山田　巌　澤江義郎

Studies on ASO Titration Using Microtiter Method

Iwao Yamada and Yoshiro Sawae

１．まえがき

1954年 Rantz-Randall[5] によって導入されたAntistreptolysin O（ASO）価測定法は，化膿性レンサ球菌感染症なかんずく続発症としてのリウマチ熱や急性糸球体腎炎の血清学的診断法として，必要欠くことのできないものとなっている。最近ではStreptolysin Oで感作された菌体やLatex粒子を用いる間接凝集反応によるＡＳＯ価の測定も試みられているが，Rantz-Randall（Ｒ－Ｒ）法によるＡＳＯ価測定が今日でも標準的な検査法となっている。

一方，臨床検査室に提出される検体数は年々増加する傾向にあり，どこも限られた人員で対処することが困難となっている。従って，臨床検査の領域でも合理化，省力化が必要となり，微量化，器械化が進行している。そこで，ＡＳＯ価測定法もマイクロ化が試みられている。しかし，マイクロ化には測定誤差を最小限にするために試薬管理，成績管理，精度管理が不可欠のものとして重要である。

われわれはＡＳＯ価の測定をＲ－Ｒ法からマイクロタイター（ＭＴ）法に移行させるにあたっての問題点を検討して，すでにその一部を発表しているが[6]，ここでは基礎的反応条件の設定を試み，被検血清とStreptolysin O（SLO）の反応時間ならびにＳＬＯと赤血球の反応時間さらにincubate のための37℃恒温槽とフラン器とを比較し，至適反応条件を検討した。また，リン酸緩衝液（ＰＢＳ）の pHの変化がＡＳＯ価に及ぼす影響についても検討したので併せて報告する。

２．実験材料および方法

九州大学医学部附属病院検査部に，ＡＳＯ価測定のため提出された患者血清を無作為に選んで実験に供した。血清は－20℃に保存し，同一血清をその都度溶解して用いた。

ＭＴ法：富山の方法[7]に従って行った。すなわち，パーマネントのＵ型プレートを用い，pH 6.5 のＰＢＳにて被検血清１検体について20倍から2560倍までと，60倍から3840倍までの倍数希釈系列を作り，それに栄研製ＳＬＯを蒸溜水で所定の量に溶解し，活性化させたのち，等量のＰＢＳを添加して作成した２倍希釈ＳＬＯ液を0.05ml 加え，さらに２％ヒトＯ型赤血球浮遊液を 0.025ml 加える方法で行った。判定は反応終了後ただちに1000rpm，１分間遠心し，完全不溶血の最高希釈倍数をＡＳＯ価とした。

Ｒ－Ｒ変法：試験管法でpH6.5のＰＢＳによる20倍と60倍からの２倍希釈系列を２列つくりその後の操作はＲ－Ｒ原法に従ってＡＳＯ価を測定した。

九州大学医療技術短期大学部

３．実験成績

3.1.　被検血清とＳＬＯとの反応時間

被検血清の希釈系列に２倍希釈ＳＬＯ液を0.05ml 添加して，ＡＳＯとＳＬＯとの反応時間を15分，20分，30分，40分として，37℃の恒温槽とフラン器で反応させたのち，２％ヒトＯ型赤血球浮遊液を0.025ml 加え，恒温槽とフラン器で45分間反応させて得られた成績を，Ｒ－Ｒ変法のＡＳＯ価と比較した。

恒温槽で反応させた場合は図１に示すごとく，全体的にＭＴ法の値がＲ－Ｒ変法によるものよりも低値であり，15分の反応では12検体中，４検体（33.3％）に２管の低下が認められたが，20分，30分，40分の反応では１管の低下にとどまった。とくに30分以上の反応においては４検体（33.3％）がＲ－Ｒ変法のＡＳＯ価と一致した。

フラン器で反応させた場合は図２に示すごとく，ＭＴ法によるＡＳＯ価が２管低下するものが，15分の反応では12検体中，９検体（75％）と高率にみられ，20分の反応でも３検体（25％）に認められた。一方，Ｒ－Ｒ変法のＡＳＯ価と一致したものは20分と30分の反応では１検体(8.3％）にすぎず，40分の反応で４検体（33.3％）であった。

3.2.　ＳＬＯと赤血球との反応時間

被検血清の希釈系列へ２倍希釈ＳＬＯ液を0.05ml 添加し，恒温槽の場合15分間，フラン器の場合30分間反応させたのち，2％赤血球浮遊液を0.025ml 加え，ＳＬＯとの反応時間を30分，45分，50分，60分にして，37℃の恒温槽とフラン器で反応させて得られたＡＳＯ価をＲ－Ｒ変法の値と比較した。

恒温槽で反応させた場合は図３に示すごとく，ＭＴ法がＲ－Ｒ変法より２管低下したものが30分の反応で12検体中，３検体(25％)に認められたが，45分以上の反応では認められなかった。しかし，Ｒ－Ｒ変法のＡＳＯ価と一致したものは45分の反応で３検体（25％），50分と60分の反応で５検体（41.7％）にすぎなかった。

フラン器で反応させた場合は図４に示すごとく，30分の反応ではＲ－Ｒ変法より２管低下したものが８検体（66.7％）と高率に認められたが，45分以上の反応では２管低下するものはなかった。一方，Ｒ－Ｒ変法のＡＳＯ価と一致したものは45分の反応で２検体（16.7％），50分と60分の反応で３検体（25％）と少なかった。

3.3.　ＰＢＳのｐＨ

血清希釈に用いるＰＢＳのｐＨを，6.5のほか，5.6，7.2，8.4にそれぞれ修正したものを用いて，ＭＴ法によりＡＳＯ価を測定し，ｐＨ6.5の場合との比較を試みた。

図５に示すごとく，ｐＨ5.6のＰＢＳを用いた場合には３管低下したものが18検体中，２検体（11.1％），２管低下したものが７検体（38.9％）と半数が大きく変動した。

ｐＨ7.2の場合には，１管低下したものが５検体（27.8％）あったにすぎず，ｐＨ6.5の値と一致したものが多かった。

ｐＨ8.4の場合には，８検体（44.4％）はｐＨ6.5の値と一致したが，１管低下したものが９検体（50％），さらに２管低下したものが１検体（5.6％）に認められた。

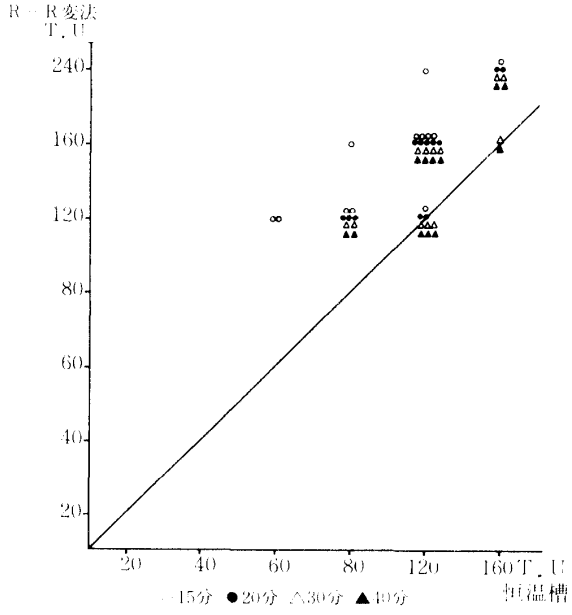

図１　被検血清とＳＬＯの反応時間（恒温槽）

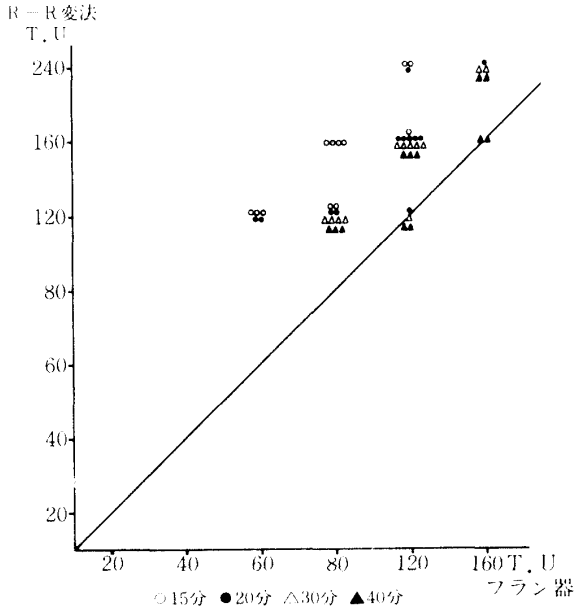

図２　被検血清とＳＬＯの反応時間(フラン器)

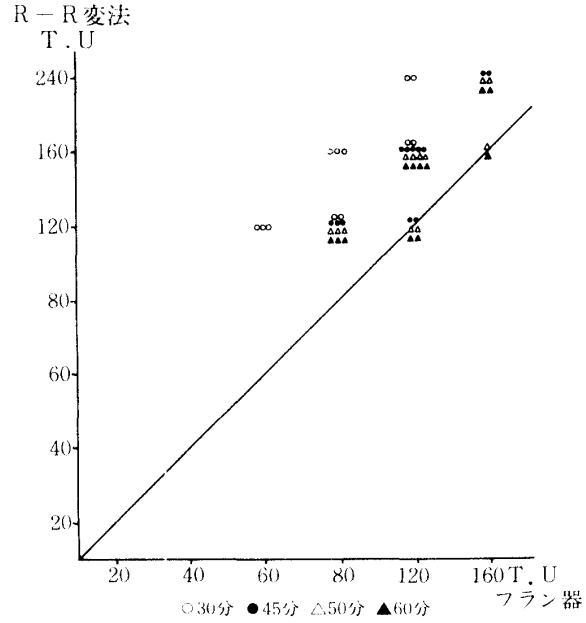

図４．ＳＬＯと赤血球の反応時間（フラン器）

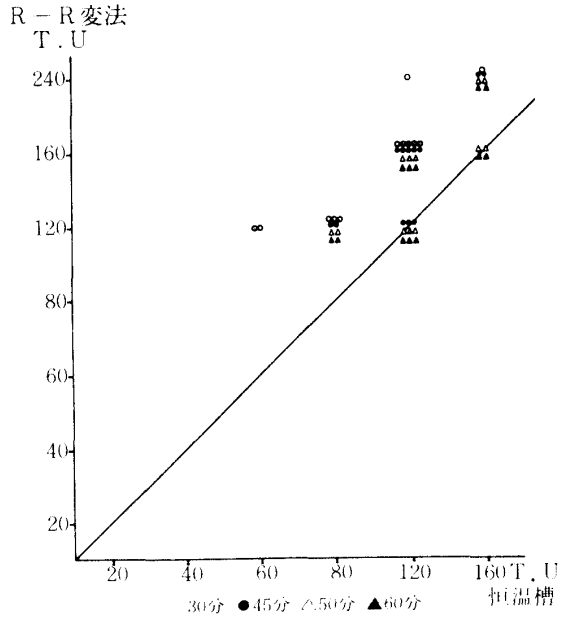

図３　ＳＬＯと赤血球の反応時間（恒温槽）

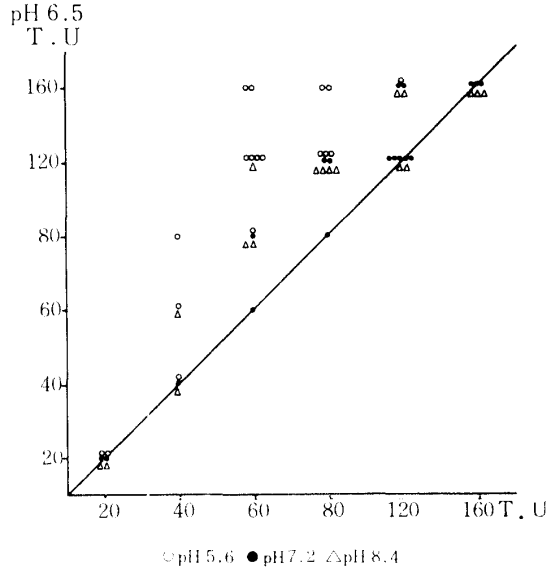

図５．　ＰＢＳの pH

４．考　察

ＡＳＯ価の測定にはＲ－Ｒ法がひろく用いられており，その有用性が確立されている。しかし，その検査方法は多数の試験管を用いて，しかも不規則な希釈を行う煩雑なものである。そこで，同時に多数の検体を測定するには不適で，ＭＴ法にとって代られつつある。この代用に関しては，これまでにも比較検討が試みられ，被検血清のＡＳＯ価（Todd単位）の相違，反応系の各因子の量が微量となることによる誤差などの問題点が指摘されている[3]。

この際，Ｒ－Ｒ法では不規則な血清の希釈倍数を用いるため，ＭＴ法は20倍と30倍とからの２列の２倍希釈系列を用いることにしているが[7]それでも両者の相関をみるときなどに不便である。そこで，試験管法でＭＴ法と同様の２列の倍数希釈系列を作成し，Ｒ－Ｒ法と同様の操作をするＲ－Ｒ変法を行い，ＭＴ法の成績と比較することを行った。試験管法であるＲ－Ｒ原法とＲ－Ｒ変法との成績はよく一致するものであった[6]。

Ｒ－Ｒ変法とＭＴ法の成績とでは，ＭＴ法の値が低値を示すことが一般的であり，著者らもさきに報告した[6]。従って，ＡＳＯ価をＲ－Ｒ法からＭＴ法へ切換える場合には許容測定誤差を見込む必要があり，われわれは１管の低下を許容誤差と考えている。

今回，われわれはＡＳＯ価測定をマイクロ化するに際しての基礎事項として，被検血清とＳＬＯならびにＳＬＯと赤血球の３７℃における反応条件およびＰＢＳのｐＨによる影響について検討した。

被検血清とＳＬＯの反応時間は，恒温槽の場合には15分では２管低下するものが33.3%に認められたが，20分以上では全くみられず，30分以上になるとむしろＲ－Ｒ変法の値と一致するものが多くなることが認められた。

一方，フラン器の場合には15分では75%と高率に，20分でも25%にＡＳＯ価の２管の低下が認められ，恒温槽で反応させた場合よりもＡＳＯとＳＬＯとの結合に長時間を必要とすることが示唆された。

巴山ら[1]はＡＳＯとＳＬＯの結合時間について，15分から60分の反応ではＡＳＯ価にほとんど変化は認められなかったと報告しているが，われわれの成績では２管の変動がみられており，結合時間はＲ－Ｒ法の15分よりも延長する必要があり，富山の方法[7]のフラン器内30分も短かすぎるように思われる。

ＳＬＯと赤血球の反応時間は，恒温槽で反応させた場合，30分の反応では２管低下したものが25%に認められたが，45分以上であれば２管低下するものはなく，Ｒ－Ｒ変法のＡＳＯ価と一致するものが多くなった。フラン器で反応させた場合，２管低下したものが30分で66.7%と高頻度であったが，45分以上では認められなかった。しかし，Ｒ－Ｒ変法によるＡＳＯ価と一致するものが少なくなっており，恒温槽で反応させる方がよりよい成績であった。

このような測定値の相違する原因として，試験管とマイクロプレートの熱伝導性の相違[8]，および材質の違い[2]など使用器具に負うところが大きいと考えられる。

以上の成績からＭＴ法における被検血清とＳＬＯの37℃での反応条件として，恒温槽で反応させる場合は20分，フラン器で反応させる場合は40分の時間が必要であり，ＳＬＯと赤血球の37℃での反応条件は恒温槽，フラン器いずれの場合でも45分が必要であることが判明した。しかも，恒温槽で反応させた方が，従来の試験管法により得られる成績に近い数値が得られる。しかし，マイクロプレートをシールしたり，はがしたり，あるいは水槽の水の混入に注意する必要があるなど，やや手数がかかるといえる。

つぎに，ＡＳＯ価の判定に際し，赤血球の変色が認められる場合があり，そのときのＰＢＳのpHが通常の6.5よりも酸性を示していたことを経験し，ＰＢＳのｐＨの変化がＡＳＯ価に及ぼす影響について検討した。

ＰＢＳのpHを5.6,7.2,8.4に調整してＡＳＯ価を測定し，従来からのpH6.5のＰＢＳを用いて測定したＡＳＯ価と比較した。pH5.6と酸性に傾いたものでは，２管以上低下したものが半数にあり，ひどい場合には３管も低下した。し

かも赤血球の変色が著しく，わずかの溶血が出現して，不溶血の境界の判定が極めて困難であった。pH7.2のＰＢＳの場合には大半が一致したが，pHが8.4になると２管低下するものが5.6%に認められ，半数は１管低下していた。しかし，判定の際に支障は認められなかった。

これらから，水谷[4]はＰＢＳのpHによるＡＳＯ価への影響は少ないと述べているが，極端に，とくに酸性側にずれると，ＡＳＯ価に低下が生ずるといえる。至適pHが6.5と思われるが更らに酸性に傾かないようにＰＢＳを調整する必要がある。

５．結　論

マイクロタイター法によるＡＳＯ価測定の基礎的反応条件について検討して，つぎの成績が得られた。

１）被検血清とＳＬＯの反応には，恒温槽で反応させる場合は20分，フラン器で反応させる場合は40分の反応時間が必要である。

２）ＳＬＯと赤血球の反応には，恒温槽で反応させる場合も，フラン器で反応させる場合も45分の反応時間が必要である。しかし，恒温槽を用いる方が望ましい。

３）ＰＢＳのpHは6.5から 7.2まではＡＳＯ価に著明な影響はないが，pH5.6になると非常に低下する。

文　献

１）巴山顕次，小寺健一：ＡＳＬＯ価測定の検討（１），衛生検査，23： 773～778，1974.

２）井上栄：マイクロタイター法のメリットとデメリット，micro-diagnostics，１：20～25，1975.

３）水谷昭夫：抗体価の違い，臨床検査，22：337～340，1978.

４）水谷昭夫：ＡＳＯ価測定の注意，臨床検査，22：107～109，1978.

５）Rantz，L．M．and Randall，E．：A modification of the technic for determination of the antistreptolysin titer. Proc. Soc. Exp. Biol and Med.，59：22～25，1945.

６）沢江義郎，山田巌：溶連菌抗体，臨床病理，26：104～109，1978.

７）富山哲雄：マイクロタイターの活用法，臨床検査，16：123～132，1972.

８）富山哲雄：マイクロタイター法の基本手技，micro-diagnostics，１：３～19，1975.