

マイクロタイターによるAS0価測定法の基礎的検討

山田, 巖
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 巖 澤 江 義 郎

Studies on ASO Titration Using Microtiter Method

Iwao Yamada and Yoshiro Sawae

1. まえがき

1954年 Rantz-Randall⁵⁾ 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⁾、ここでは基礎的反應条件の設定を試み、被検血清と Streptolysin O (SLO) の反應時間ならびに SLO と赤血球の反應時間さらに incubate のための 37°C 恒温槽とフラン器

とを比較し、至適反應条件を検討した。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°C 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 を蒸留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。判定は反應終了後ただちに 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 pH 6.5 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。

3. 実験成績

3.1. 被検血清とS L Oとの反応時間

被検血清の希釈系列に2倍希釈S L O液を0.05ml 添加して、A S OとS L O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A S O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A S O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A S O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A S O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. S L Oと赤血球との反応時間

被検血清の希釈系列へ2倍希釈S L O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、S L O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A S O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A S O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A S O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. P B SのpH

血清希釈に用いるP B S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を用いて、MT法によりA S O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P B S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。

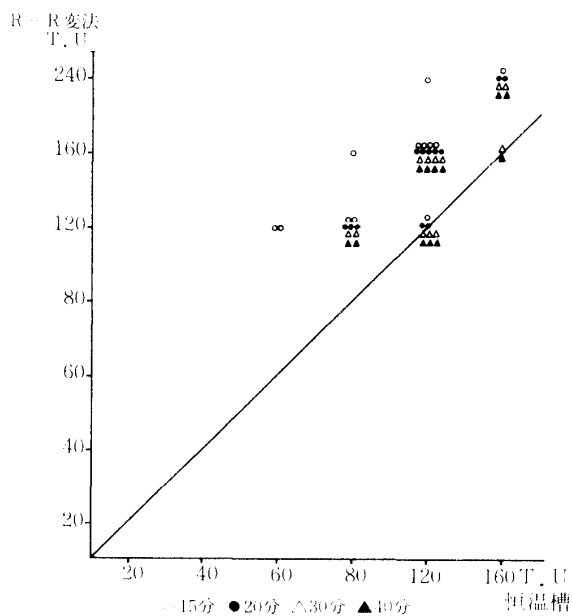


図1 被検血清とS L Oの反応時間(恒温槽)

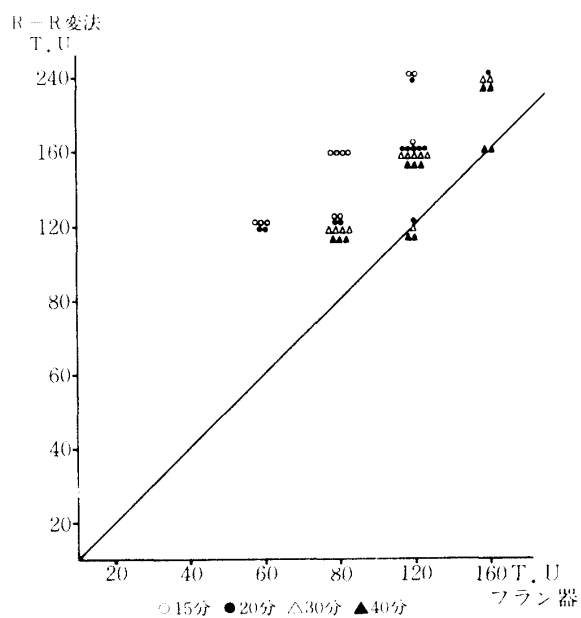


図2 被検血清とS L Oの反応時間(フラン器)

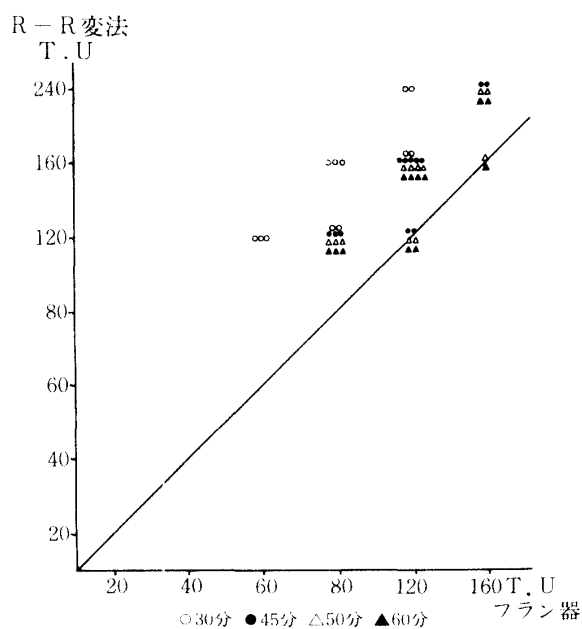


図4. S L Oと赤血球の反応時間(フラン器)

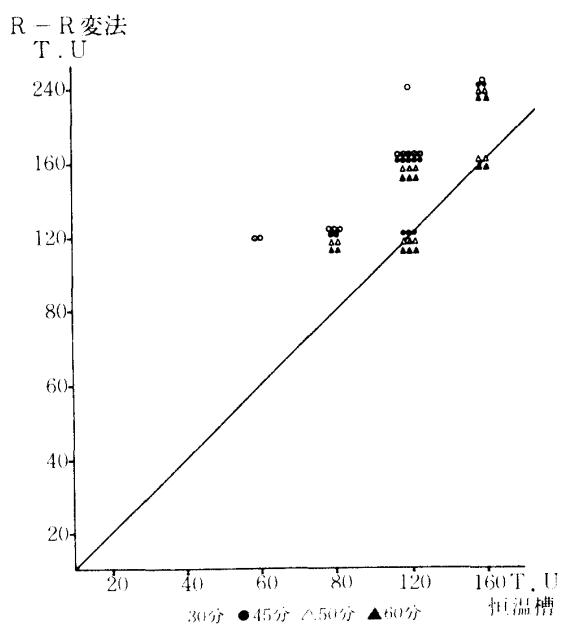


図3 S L Oと赤血球の反応時間(恒温槽)

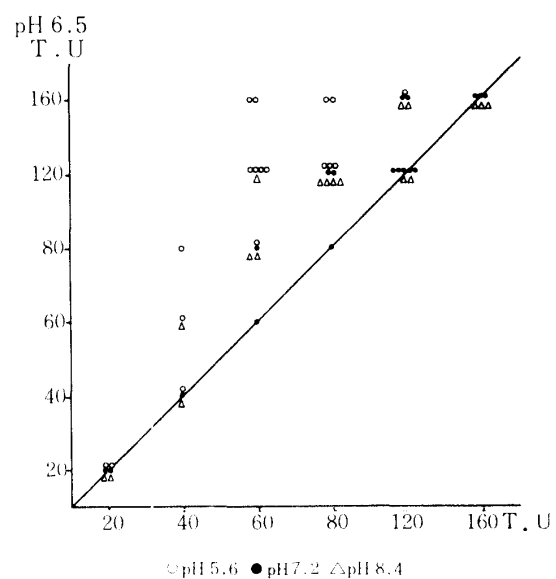


図5. P B Sの pH

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法へ切替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増え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るが、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増えた。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価測定の基礎的反應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) 巴山顯次, 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, 山田巖: 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.