

ポリエチレングリコールチンデンプツオモチイタメ
ンエキフクゴウタイソクテイカトメンエキガクテキ
ハンノウセイニツイテ

山田, 巖

澤江, 義郎

<https://doi.org/10.15017/263>

出版情報 : 九州大学医療技術短期大学部紀要. 25, pp.33-38, 1998-03. Kyushu University School of Health Sciences Fukuoka, Japan

バージョン :

権利関係 :



ポリエチレングリコール沈殿物を用いた免疫複合体測定値と 免疫学的反応性について

山田 巖 澤江 義郎

Measurement of Immune Complexes by Polyethylene Glycol Sediments and Their Immunological Reaction

Iwao Yamada and Yoshiro Sawae

The purpose of this study is to measure the amount of immune complex (IC) of the serum of the following two cases: (a) the case of healthy persons, (b) that of the patients who are positive in the rheumatoid factor (RF), in antinuclear antibody (ANA), and in anti-syphilis antibody. The immunoglobulin (Ig) class and antibody activity of the polyethylene glycol (PEG) sediments from samples were also examined.

As the results, the following findings were obtained.

1. The mean value of IC in RF and ANA positive samples was significantly more than that of control serum.
2. The positive rates of IC were 90% in RF positive serum, 71.8% in ANA positive serum, and 48.6% in anti-syphilis antibody positive serum, respectively.
3. Ig class of PEG sediments from patient samples showed IgG, and 11~28% of RF and ANA positive samples additionally showed IgA.
4. Some specific antibody activity of PEG sediments was recognized by the immunological tests.

まえがき

免疫複合体 (immune complex; IC) は、各種疾患の流血中に認められるが、とくに自己免疫疾患において顕著で、しかも病因と深い係わりがあるといわれている¹⁻³⁾。

今回、われわれはリウマチ因子 (RF) や抗核抗体 (ANA) の自己抗体陽性および梅毒血清反応陽性の患者血清と、健常人として本学の学生から得た血清を用いて IC を測定した。同時に、血清中からポリエチレングリコールによる沈殿物 (PEG 沈殿物) を採取し、その PEG 沈殿物を形成している免疫グロブリンクラス (Ig) および各種検査法の反応性について、血清での成績と比較検討したので報告する。

対象と方法

1. 対象

ラテックス凝集反応による RF 陽性の 40 検体、蛍光抗体法による ANA 陽性の 39 検体およびガラス板法による梅毒血清反応陽性の 35 検体と、対照の健常人血清として本学の学生より得た 23 検体を用いた。なお、RF 陽性検体の中には ANA 陽性のものが 24 検体 (60%) に、ANA 陽性検体の中には RF 陽性のものが 6 検体 (15.4%) に、ガラス板法陽性検体の中には ANA 陽性のものが 5 検体 (14.3%)、RF 陽性のものが 4 検体 (11.4%) に含まれていたが、いずれもその抗体力価は RF では (+)、ANA では 20 倍と低力価のものであった。

他方、健常人の検体は RF、ANA、梅毒血清反応のいずれも陰性であった。

2. 方法

ICの測定法:表1に示す方法で、PEG沈殿物補体消費試験(PEG-CC)によりPEG-CC%を求めた⁴⁾。

表1 ポリエチレングリコール沈殿物補体消費試験による免疫複合体の測定

- 1) 0.3mlの被検血清に、0.2Mの ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)を0.05ml、ホウ酸緩衝液を0.05ml、12.5%のポリエチレングリコール(PEG)を0.1ml加えて混合後、4℃で90分間反応させる。
- 2) 1,700Gで4℃90分間遠心後上清を捨てる。沈殿物を2.5%のPEG(4℃で冷却)の1.0mlを加え、1,700Gで、4℃15分間遠心して洗浄する。
- 3) 沈殿物を37℃保温のゲラチンペロナル緩衝液(GVB)0.03mlを加えて溶解する。
- 4) 正常ヒト血清を0.01ml加えて、37℃で30分間反応させる。
- 5) 1.5×10^8 /mlの感作赤血球浮遊液を1.0ml加えて、37℃で60分間反応させる。
- 6) 4℃に保った生理食塩水を6.5ml加えた後遠心する。上清液を分光光度計の414nmで吸光度を測定する。
- 7) PEG-CC%をつぎのようにして求める。

$$\text{PEG-CC}\% = \left(1 - \frac{\text{sample (OD414)}}{\text{control (OD414)}}\right) \times 100$$

PEG沈殿物の採取法:表2に示すような手順にしたがって被検血清を処理して得られたものを直ちに検査に供した。

表2 PEG沈殿物の採取法

被検血清	0.3ml) 4℃ 90分間
0.2M EDTA	0.05ml	
ホウ酸緩衝液	0.05ml	
12.5% PEG	0.1ml	
↓		
1,700G 4℃ 90分間遠心		
↓		
沈殿物を2.5% PEG(4℃)で洗浄 1,700G 4℃ 15分間で3回		
↓		
沈殿物をGVB(37℃保温)の0.05mlで溶解		
↓		
直ちに検査に供する		

PEG沈殿物のIgクラス:PEG沈殿物をゲラチンペロナル緩衝液により可溶化したものを、抗IgG、抗IgA、抗IgM血清(MBL製)を用い、二元免疫拡散法により測定した。

リウマチ因子測定法:ラテックス凝集反応であるRA77[®](栄研製)と間接凝集反応であるセロディア-RA[®](富士レビオ製)を用いた。

抗核抗体測定法:蛍光抗体法であるフルオロHEPANAテスト、フルオロnDNAテスト(MBL製)、さらに二元免疫拡散法であるENAスクリーニングテスト(MBL製)により測定した。

梅毒血清反応:ガラス板法(住友製薬製)と赤血球凝集反応であるセロディア-TP[®](富士レビオ製)により測定した。

成 績

1. ICのPEG-CC%による比較

健常人検体とRF陽性、ANA陽性および梅毒血清反応陽性検体のIC価を図に示した。まず平均値±SDにより比較してみると、健常人検体では16.6±8.9%であり、RF陽性のものは65.9±21.1%と最も高く、ついでANA陽性のものが51.6±

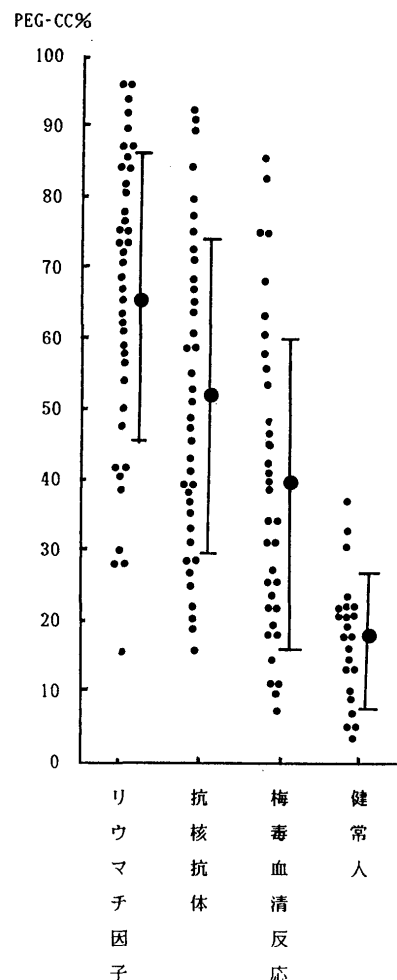


図 ICのPEG-CC%による比較

21.9%, 梅毒血清反応陽性のもものでは $39.6 \pm 21.5\%$ で、いずれも健常人よりも高値で、とくに RF陽性検体と ANA陽性検体では、健常人検体との間に有意差が確認された ($P < 0.05$)。

2. IC価(PEG-CC%)の正常値の設定

PEG-CC%によるIC価(以下IC価の%は省略)の正常値の設定について、健常人のIC価によって検討すると、平均値 $\pm 1SD$ すなわち $7.5 \sim 25.5$ では3検体が25.6以上、4検体が7.4以下で、その範囲内に入るものは78.3%となる。そこで、平均値 $\pm 2SD$ すなわち $0 \sim 34.4$ を正常値とすると1検体のみが37となり、95.7%ものがこの範囲に含まれることになり、35以下を正常値とするのがよいと考えられた。

3. 各種検体のPEG-CCによるICの陽性率

IC価の正常範囲を健常人の検体のPEG-CCの平均値 $\pm 2SD$ すなわち34.4以下と設定した場合の陽性率を参考にして検討した。

表3に示すように、RF陽性検体は90%の検体で陽性で、そのうちANAが陽性の24検体中22検体(91.3%)と、ANA陰性の16検体中14検体(87.5%)でPEG-CCが陽性で、ANA陽性のものがやや高率に陽性であったが、有意差はなかった(Z検定 = 0.36)。

また、ANA陰性の検体が25.5以下と特に低値であった。

ANA陽性検体では39検体中28検体(71.8%)が陽性で、RF陽性であると100%陽性であった。RF陰性の場合には22検体(66.7%)に陽性と陽性率が低下した。

梅毒血清反応陽性検体では17検体(48.6%)が陽性で、陽性率が50%以下で、25.5以下の低値のものが13検体(37.1%)と多かった。この梅毒血清反応陽性検体では、RF, ANAいずれかが陽性のものに陽性のものが多く、いずれも陰性のもものでは8検体(30.8%)が陽性であった。

4. PEG沈殿物のIgクラス(表4)

健常人検体でのPEG沈殿物のIgクラスは、すべてIgGのみ認められた。

RF陽性検体でのIgクラスは、40検体中

39検体(97.5%)にIgGが認められ、そのうちの11検体(28.2%)のものにはIgAも同時に検出された。

ANA陽性検体でのPEG沈殿物のIgクラスは、39検体中36検体(92.3%)にIgGが、そのうち4検体(11.1%)にはIgAも同時に検出された。IgAのみ認められたものが1検体(2.7%)あり、残りの2検体からは検出されなかった。

梅毒血清反応陽性検体でのPEG沈殿物のIgクラスは、35検体中32検体(91.4%)にIgGのみ検出された。

なお、IgMはいずれの検体からも検出されなかった。

5. RF陽性検体の血清とPEG沈殿物の反応性の比較

表5に示すように、PEG沈殿物のラテックス凝集反応によるRF陽性の検体は20検体(50%)で、血清でANAを認めた24検体中14検体(58.3%)のものが陽性であった。また、ANAの染色型別により見てみると、血清で斑紋型であった17検体中11

表3 各種検体のPEG-CCによるICの陽性率

検体	検体数	検体数(%)			陽性率
		≤ 25.5	25.6-34.4	34.5 \leq	
健常人	23	20 (87.0)	2 (8.7)	1 (4.3)	4.3
RF陽性	40	1 (2.5)	3 (7.5)	36 (90.0)	90.0
ANA(+)	24	0	2 (8.7)	22 (91.3)	
ANA(-)	16	1 (6.3)	1 (6.3)	14 (87.5)	
ANA陽性	39	5 (12.8)	6 (15.4)	28 (71.8)	71.8
RF(+)	6	0	0	6 (100)	
RF(-)	33	5 (15.2)	6 (18.2)	22 (66.7)	
梅毒血清反応陽性	35	13 (37.1)	5 (14.3)	17 (48.6)	48.6
ANA(+ RF(+)	0	0	0	0	
ANA(- RF(+)	4	0	0	4 (100)	
ANA(+ RF(-)	5	0	0	5 (100)	
ANA(- RF(-)	26	13 (50.0)	5 (19.2)	8 (30.8)	

表4 PEG沈殿物のIgクラス

検体	検体数	Igクラス(%)				
		IgG	IgA (IgGと共存)	IgAのみ	IgM	(-)
健常人	23	23 (100)	0	0	0	0
RF陽性	40	39 (97.5)	11 (28.2)	0	0	1 (2.5)
ANA陽性	39	36 (92.3)	4 (11.1)	1 (2.7)	0	2 (5.1)
梅毒血清 反応陽性	35	32 (91.4)	0	0	0	3 (8.6)

検体(64.7%)にPEG沈殿物でも認められたが、その他の染色型は1/3に減少し、核小体型では全くみられなくなっていた。

つぎにPEG沈殿物のセロディア-RAテストによるRFの検査では、未感作粒子に凝集が出現したり、未感作粒子に凝集は認められないが非特異反応による高値と思われるような反応が、健常人の検体も含め、すべての検体でみられた。ちなみにPEG溶液とセロディア-RAテストの感作粒子、未感作粒子の間に凝集は認められなかった。

また、抗ENA抗体は、PEG沈殿物からは全く検出されなかった。

6. ANA陽性検体の血清とPEG沈殿物の反応性の比較

表6に示すように、ANA陽性検体のすべてにPEG沈殿物からもANAが認められた。しかし、染

表5 RF陽性検体の血清とPEG沈殿物の反応性の比較(40検体)

検査法	陽性検体 (%)	
	血清	PEG沈殿物
RA77	40 (100%)	20 (50%)
セロディア RA	22 (55%)	すべて非特異反応
ANA	24 (60%)	14 (35%)
染色型*		
斑紋	17 (42.5%)	11 (27.5%)
均質	6 (15.0%)	2 (5.0%)
辺縁	3 (7.5%)	1 (2.5%)
核小体	3 (7.5%)	0
抗DNA抗体	2 (5.0%)	1 (2.5%)
抗ENA抗体	3 (7.5%)	0

*2種類の染色型を示した5検体を含む

表6 ANA陽性検体の血清とPEG沈殿物の反応性の比較(39検体)

検査法	陽性検体 (%)	
	血清	PEG沈殿物
ANA	39 (100%)	39 (100%)
染色型*		
斑紋	14 (35.9%)	35 (90.0%)
均質	14 (35.9%)	4 (10.3%)
辺縁	9 (23.1%)	3 (7.7%)
核小体	4 (10.3%)	0
抗DNA抗体	31 (79.5%)	19 (48.7%)
抗ENA抗体	14 (35.9%)	0
RA77	6 (15.4%)	3 (7.7%)
セロディア RA	1 (2.6%)	すべて非特異反応

*2種類の染色型を示した2検体を含む

色型についてみると、PEG沈殿物の場合に斑紋型のものが39検体中35検体(89.7%)に認められ、血清の場合の2.5倍に増加していた。その他の染色型については、RF陽性検体の場合と同様であった。

抗DNA抗体は、血清で陽性であった31検体中19検体(61.3%)にPEG沈殿物でも認められた。

7. 梅毒血清反応陽性検体の血清とPEG沈殿物の反応性の比較

表7に示すように、ガラス板法、セロディア-TPテストともに血清で陽性を示したもののうち15検体(42.9%)、13検体(54.2%)のものはPEG沈殿物にも認められた。また、ラテックス凝集反応によるRFは血清の場合と同様、PEG沈殿物からも検出されたが、ANAはすべて陰性であった。

8. 健常人検体の血清とPEG沈殿物の反応性の比較

表8に示すように、RF,ANA,梅毒血清反応は、血清の場合と同様、PEG沈殿物からも全く検出されなかった。

表7 梅毒血清反応陽性検体の血清とPEG沈殿物の反応性の比較(35検体)

検査法	陽性検体 (%)	
	血清	PEG沈殿物
ガラス板法	35 (100%)	15 (42.9%)
セロディア TP	24 (68.6%)	13 (37.1%)
RA77	4 (11.4%)	4 (11.4%)
セロディア RA	2 (5.7%)	すべて非特異反応
ANA	5 (14.3%)	0
染色型		
斑紋	1 (2.9%)	0
均質	4 (11.4%)	0
抗DNA抗体	0	0
抗ENA抗体	0	0

表8 健常人検体の血清とPEG沈殿物の反応性の比較(23検体)

検査法	陽性検体 (%)	
	血清	PEG沈殿物
ANA	0	0
RA77	0	0
セロディア RA	0	すべて非特異反応
ガラス板法	0	0
セロディア TP	0	0

考 察

ICは生体が異物として認識した抗原に、これに対応して産生された抗体と補体が結合して形成されたもので、抗原をICに変形して排除しようとする生体防御機構に参与している^{5,6)}。反面、ICは生体の免疫異常により質的あるいは量的に変化すると流血中に長期に存在し病的状態を招くともいわれている^{6,7)}。

今回、われわれはこのような生体にとって功罪両面を持つICの測定を行い、同時にPEG沈殿物を採取して、PEG沈殿物を形成しているIgクラスをはじめ、種々の検査法に対する反応性について血清の成績と比較検討した。

PEG-CCによるICは、正常値を健常人の平均値 $\pm 2SD$ すなわち34.4以下とするのがよく、RF陽性検体では90%以上の検体で陽性で、ANA陽性検体では70%以上の高い陽性率を示すものの、やや低率であった。しかし、健常人でも37%とやや高値のものがあることにも留意する必要がある。

PEG沈殿物のIgクラスは、RF陽性検体では97.5%に、ANA陽性検体では92.3%に、梅毒血清反応陽性検体では91.4%にIgGが陽性であった。そしてRFやANA陽性の検体ではIgAが28.2%、11.1%に混在していた。しかし、IgMは全く認められなかった。これについてCreightonら⁸⁾は高濃度のPEGには抗原抗体の結合または解離を止める働きがあるが、低濃度のPEGには抗原抗体の解離を必ずしも止めるものではないと報告しており、安倍ら⁹⁾も4%PEGによる洗浄操作で抗原抗体の結合能に40%から80%の低下をみたことと述べており、われわれのPEG沈殿物の採取法において2.5%PEGによる洗浄操作があり、このことがIgMについて特に問題となるのかも知れない。

また、健常人以外の検体でIgクラス陰性のものが6検体にみられたが、その原因については二元免疫拡散法の感度が影響しているかも知れないが明らかではない。

PEG沈殿物のANA活性をみみると、RF陽性検体ではANAの検出率は血清の場合より低下し、抗DNA、抗ENA抗体は殆ど認められなくなった。一方、ANA陽性検体では血清の場合と同様すべ

て陽性であったが、染色型は非常に異なったパターンを示していた。この原因は明らかではないが、RF陽性検体や梅毒血清反応陽性検体にはこのような現象が認められていないことから、ANA陽性検体から採取したPEG沈殿物には、他のANAに由来する染色型に変化させるような作用があるのかも知れない。また、ANAの辺縁型染色パターンは、原血清や10倍希釈程度でよく検出され、20倍ないし40倍に希釈することにより60~70%の辺縁型は脱落すると報告されており¹⁰⁾、PEG沈殿物採取時の希釈も加わって辺縁型あるいは抗DNA抗体は減少したものと思われる。なお、核小体型はPEG沈殿物からは全く認められなかったが、この染色型は他の染色型が存在するとマスクされて判別困難になるといわれており^{11,12)}、希釈操作も加わって、他の染色型の出現によりマスクされ見逃されたのかも知れない。

セロディアーRAテストにおいて、患者の検体および健常人の検体を問わず、PEG沈殿物で検査を行うと未感作粒子に凝集が出現したり、未感作粒子に凝集は認められないが非特異反応によると思われる高値のものが、健常人も含めすべての検体に認められた。しかし、PEG溶液と感作粒子、未感作粒子の間には凝集はみられなかったことから、PEG沈殿物に非特異凝集を惹起する因子が存在するのではないかと考えられるが、明確にすることはできなかった。

結 語

RF陽性、ANA陽性および梅毒血清反応陽性の患者血清と、健常人の血清を用いてICを測定し、同時にPEG沈殿物を採取して、PEG沈殿物を形成しているIgクラスの同定と、種々の検査法との反応性について検討し、つぎのような成績を得た。

1. ICのPEG-CCの平均値は、RF陽性検体では 65.9 ± 21.1 、ANA陽性検体では 51.6 ± 21.9 、梅毒血清反応陽性検体では 39.6 ± 21.5 で、いずれも健常人検体での 16.6 ± 8.9 に比べ高値で、とくにRFとANA陽性検体には正常人検体と有意差が認められた。

2. PEG沈殿物のIgクラスは、健常人では100%

にIgGが認められた。RF陽性検体の97.5%にIgGが、そのうちの28.2%のものにはIgAも同時に認められた。ANA陽性検体では92.3%にIgGが、そのうちの11.1%のものにはIgAも同時に認められ、IgAのみ検出されたものが2.7%であった。梅毒血清反応陽性検体では91.4%にIgGのみ認められた。

なお、健常人以外の検体で陰性のものが6検体に認められたが、その原因は明らかにできなかった。

3. PEG-CCによるICの陽性率を、健常人の平均値±2SDでみると、RF陽性検体では90%の陽性率であり、ANA陽性検体でも70%以上と高率であった。

4. PEG沈殿物の反応性、すなわち抗体活性はラテックス凝集反応によるRFが、RF陽性検体とANA陽性検体の50%に、梅毒血清反応陽性検体では4検体のすべてが、ANAはANA陽性検体の100%に、RF陽性検体の過半数のものに認められたが、梅毒血清反応陽性検体からは検出されなかった。

なお、セロディアーRAテストにおいては、すべての検体で非特異反応がみられた。

文 献

- 1) 坂口弘, 緒方謙太郎: 続発性糸球体疾患. 臨床検査 34: 830~838, 1990.
- 2) Koffler, D., Schur, P. H. and Kunkel, H. G. : Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med., 126: 607~627, 1967.
- 3) 大藤真, 倉田典之: 免疫複合体病. 臨床検査 23: 50~56, 1979.
- 4) 手嶋秀毅, 吾郷晋治, 友岡祐治, 宮崎澄雄, 平良雅裕, 重松信昭, 鳥巢要道: ポリエチレングリコール沈殿物補体消費試験 (PEG-CC) による Circulating Immune Complex (CIC) の定量と臨床応用. アレルギー 130: 59~67, 1981.
- 5) Morretta, L., Webb, S. R., Grossi, C. E., Lydyard, P. M. and Cooper, M. D. : Functional analysis of two human T-cell subpopulations help and suppressions of B-cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG. J. Exp. Med., 146: 184~200, 1978.
- 6) 横張龍一, 青塚新一: 抗 aggregated IgG による血清 aggregated IgG の測定. 最新医学 33: 1366~1369, 1978.
- 7) 濱島義博: Immune Complex 測定の意義と批判. 臨床免疫 9: 1055~1061, 1977.
- 8) Creighton, W. D., Lambert, P. H., Miescher, P. A. : Defection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. J. Immunol., 111: 1219~1227, 1973.
- 9) 安倍千之, 塩川優一, 山形寿太郎, 奈須一, 石黒庸子, David Chia, Eugen V., Barnet, Carl M. Pearson: Polyethylene glycol (PEG) および radial immunodiffusion (RID) による可溶性 immune complex の測定. 厚生省特定疾患系統的血管病変に関する調査研究班 1976 年度報告集, 148~150, 1977.
- 10) 宮脇昌二, 浅沼浩子: 抗核抗体. 臨床検査 41: 508~516, 1997.
- 11) 鏑木淳一, 本間光夫: 抗核抗体の蛍光染色. 臨床検査 27: 243~248, 1983.
- 12) Bickel, Y. B., Barnett, E. V. and Pearson, C. M. : Immunofluorescent patterns and specificity of human antinuclear antibodies. Clin. Exp. Immunol., 3: 641~656, 1968.