

免疫溶血濁度測定法による血清補体価 (CH50) の検討と正常値設定

松丸 恭子, 畑川 清美, 岩本 佳子
今野 純夫

はじめに

血清補体価(CH50)は、各種自己免疫疾患をはじめ多くの疾患に有用な検査である。現在、Mayer法¹⁾が主な検査法となっているが、日常検査として繁雑であるため、自動化への試みがなされている²⁻⁹⁾。そこで今回、免疫溶血濁度測定法による血清補体価測定についての検討及び同法での正常値を設定したので報告する。

測定原理

感作ヒツジ赤血球と血清を反応させると、血清中の補体の作用により感作ヒツジ赤血球が溶血する。この溶血反応を波長660nmで吸光度変化(濁度減少)として捉える。この吸光度変化は、血清中の補体価に比例するため、あらかじめ既知補体価の標準物質で作成した検量線により血清中の補体価を求める。

材料と方法

A. 測定機器

COBAS MIRA (日本ロシュ 株)

B. 試薬

1) 感作ヒツジ赤血球

COBAS MIRA 用

オート CH50 (デンカ生研)

使用時の添付のゼラチン加ペロナール緩衝液(GVB⁺⁺)で10倍希釈して使用した。

2. 標準物質

COBAS MIRA 用

標準補体-A (デンカ生研)

使用時に1バイアルあたり0.5mlの精製水で溶解して使用した。

3) コントロール

補体コントロール「ロシュ」(デンカ生研)

使用時に1バイアルあたり0.5mlの精製水で溶解して、測定の際、同時に測定させた。

4) Mayer法試薬

ワンポイント CH50 (デンカ生研)

使用時説明書に従って使用した。

C. 対象検体

1) 任意ヒト血清……114例

2) RF陽性検体……49例

3) 補体蛋白成分(C3c・C4)検査の依頼のあった検体……88例

4) 18歳以上の健常者検体……108例

(以下の条件を満たす院内供血者及び健康診断受診者)

※ WBC 10,000/mm³以下

※ AST 8~35 IU

※ ALT 4~30 IU

5) 小児科外来患者検体……148例

D. 測定条件

COBAS MIRAでの測定条件を表1に示した。

E. 分析機の測定動作

① 37°Cの反応槽内のキュベットに感作ヒツジ赤血球320 μ l, 検体6 μ l, サンプル押し出し用のGVB15 μ lをはき出し、攪拌する。

② 直後から25秒ごとに混合液の吸光度を波長660nmで測定する。

③ 直後から75秒後と12分後の吸光度差(Δ ABS)が読みとられ、7濃度の標準補体のLOGIT/LOG5次式による Δ ABS曲線より被検血清の補体価が示される。

表1. 測定条件

GENERAL	
MEASUREMENT MODE	: ABSORB
REACTION MODE	: R-S
CALIBRATION MODE	: STD, NONLIN
REAGENT MODE	: NO BLANK
WAVE LENGTH	: 660 nm
UNIT	: U/ml
ANALYSIS	
SAMPLE DILUTION NAME	: GVB
POST DIL. FACTOR	: NO
POST CONC. FACTOR	: NO
SAMPLE VOLUME	: 6.0 μ l
DILUTION VOLUME	: 15.0 μ l
REAGENT VOLUME	: 320 μ l
CALCULATION	
REACTION DIRECTION	: DECREASE
CONVERSION FACTOR	: 1.00000
OFFSET	: 0.00000
CALCULATION STEP A	: END POINT
READINGS	FIRST : 3 ※ LAST : 29 ※
CALIBRATION	
CALIBRATION INTERVAL	: ON REQUEST
STANDARD NONLINEAR	
1: 0.0 U/ml	2: ★★ U/ml
3: ★★ U/ml	4: ★★ U/ml
5: ★★ U/ml	6: ★★ U/ml
7: ★★ U/ml	8: NO
REPLICATE	: SINGLE
DEVIATION	: NO
CALCULATION MODEL	: LOGIT/LOG5

※ : 1 POINT = 25 sec

★★ : 使用した標準補体の表示値を入力した。

検討内容及び成績

A. 再現性

① 同時再現性 3濃度のヒト血清を用いてそれぞれ10回測定したところ、CV 2% 以内の良好な成績を示した(表2)。

② 日差再現性 -80°C と -20°C にヒト血清を凍結保存し10日間測定した(表3)。 -80°C のほうがより良い結果を示し、10日間は安定であった。

表2. 同時再現性

ヒト血清	低	中	高
N	10	10	10
MEAN	16.12	33.40	44.57
S.D.	0.175	0.316	0.646
C.V.	1.09%	0.95%	1.45%
MIN.	15.9	32.9	43.1
MAX.	16.4	33.8	45.3
RANGE	0.5	0.9	2.2

表 3. 日差再現性

保存条件	-20°C	-80°C
N	10	10
MEAN	39.24	41.58
S.D.	1.464	0.840
C.V.	3.73%	2.02%
MIN	37.0	40.0
MAX.	42.1	42.9
RANGE	5.1	2.9

B. 希釈直線性

3 濃度の標準補体をそれぞれ GVB で 5 段階希釈して測定し、直線性を示した (図 1)。期待値が 15 U/ml 以下では直線性がはずれたが、測定範囲を超す高補体価検体については、2~3 倍の希釈検体を用いて再測定させても問題はないと思われる。

C. 共存物質の影響

共存物質の影響を図 2 に示す。ヘモグロビン 500 mg/dl で約 7%、ビリルビン 50 mg/dl で約 9%、乳ビ 10,000 ホルマジン濁度で約 8% のいずれも正誤差となった。RF 120 U/ml では約 19%

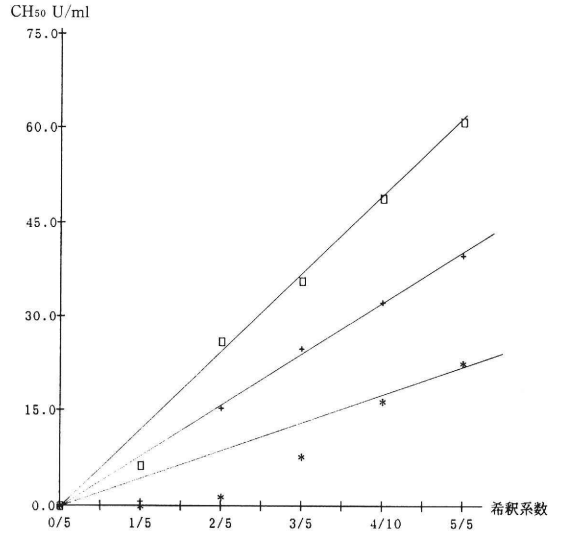


図 1. 直線性
 試料 (*): 22.0
 試料 (+): 41.0
 試料 (□): 62.0
 単位 : U/ml

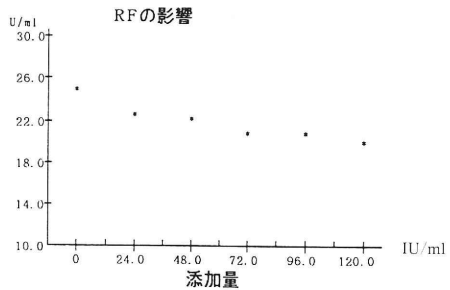
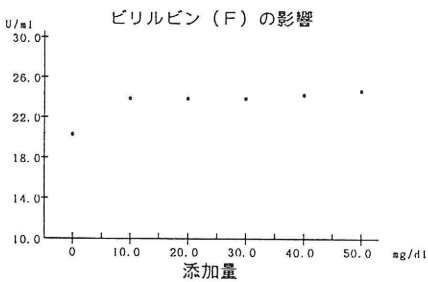
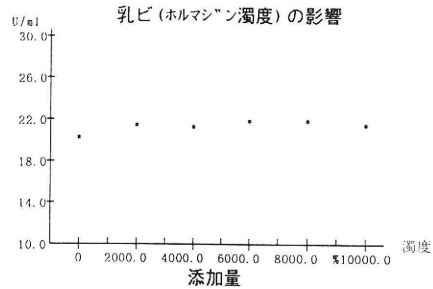
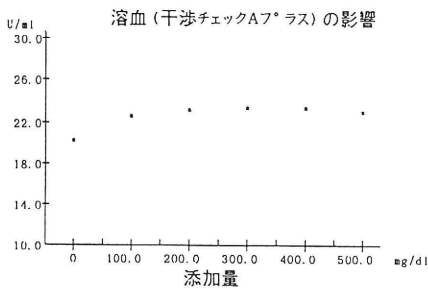


図 2. 共存物質の影響

の負誤差となった。RF の影響については後述する。

D. 抗凝固剤・凝固剤の影響

8人の健常者から採血し、普通採血、EDTA-2K、-2Na、ヘパリン、トロンビンにそれぞれ混和し測定した(図3)。EDTA採血による値が普通採血よりも約30%低値を示した。これは試薬中のCa・Mgイオンの添加量よりもEDTAのキレート作用によるものが大きいと考えられる。

E. Cold Activationの検討

Cold Activationを示した患者(2例)について、溶血濁度法とMayer法とで血清とEDTA採血による血漿のそれぞれのデータを比較した(図4)。血清では2例とも測定法にかかわらず低値を示した。血漿では、検体Aで18.7 U/ml、検体Bで21.5 U/mlの差が生じMayer法に比べ溶血濁度法は低値となった。よって溶血濁度法でCold Activationの確認のためEDTA採血による血漿補体価を測定することに意義は認められない。

F. RFの影響

前述においてRF 120 IU/mlで約19%の負誤

差を示したが、純粋なRF標準物質ではないため種々の影響が否定できない。よってMayer法との相関により検討を行った。C3c・C4補体蛋白成分検査の依頼のあった検体88例とRF陽性検体49例についてのそれぞれの相関図を示す(図5)。両者の相関係数・回帰式は同じ傾向を示し、危険率5%で相関が認められた。このことからRFの影響を受けずにMayer法に準じた測定法であるといえる。

G. 信頼性

任意検体114例について溶血濁度法とMayer法による血清補体価の相関図を示す(図6)。回帰式 $Y=0.928X+0.285$ 、相関係数 $R=0.8829$ となり、ほとんどが95%の信頼楕円に入る良好な相関で原点を通る回帰直線が得られた。よって免疫溶血濁度法の信頼性は高いといえる。

H. 正常値設定

健常者検体108例を測定した。男女間に有意な

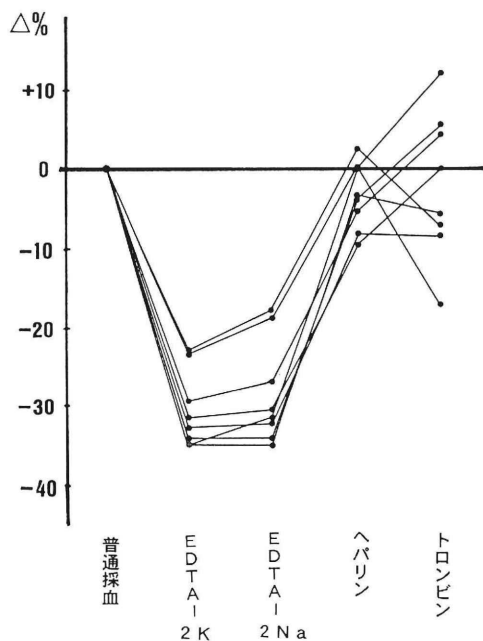


図3. 抗凝固剤・凝固剤の影響

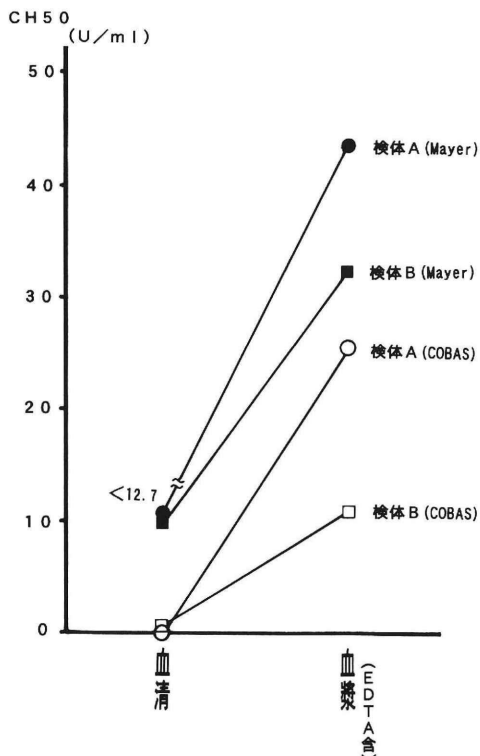


図4. COLD ACTIVATONの検討

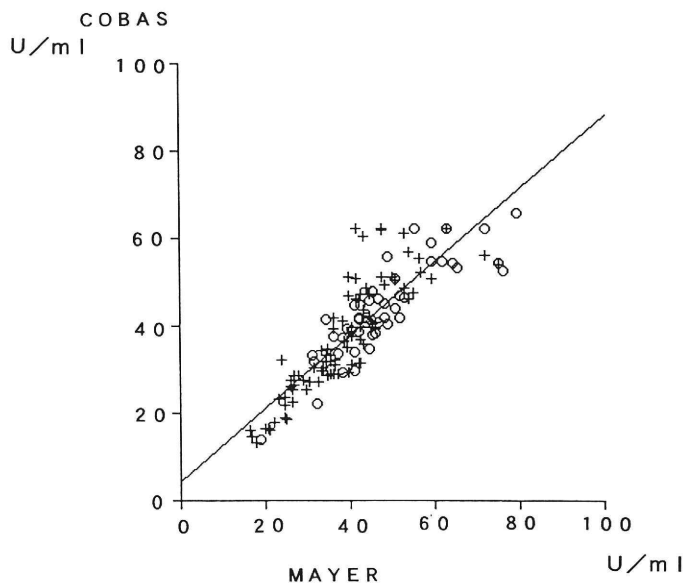


図5. MAYER 法との相関

- (+) C3c・C4 依頼検体
 $N=88$ $R=0.8601$
 $Y=0.8705X+3.1711$
- (O) RF 陽性検体
 $N=49$ $R=0.8632$
 $Y=0.8056X+5.4736$
- TOTAL
 $N=137$ $R=0.8629$
 $Y=0.8380X+4.2973$

差はなく、性差はないものとしてパラメトリックな統計処理を行った(図7)。母集団の平均値±3SDをはずれた1検体が除かれ $N=107$ 、平均 39.11 、 $SD=6.11$ となり歪度 -0.0344 の良好な正規分布を示した。この正規分布より免疫溶血濁度測定法による成人血清補体価の正常値を $27.1\sim 51.1$ U/mlと設定した。

I. 小児における正常値設定

小児の正常値を設定するにあたって、小児の健常者検体を集めることが困難であるため、小児科外来患者検体148例について臨床参考範囲プログラム(以下CRRP法と略す)による統計処理を施した(図8)。 $N=148$ 、平均 46.0 、 $SD=11.58$ 、歪度 -0.2392 となり正常値は $26.9\sim 68.8$ U/mlと設定され、成人の正常値と比較すると正常値上限が有意($P<0.05$)に高値を示した。しかしCRRP法

による統計処理を行うには N 数が依然少ないため、今後例数を増やして、更に検討を続ける予定である。

考 察

免疫溶血濁度法を用いて血清補体価を求める場合、検体は採血直後に血清を分離して用いる。すぐに測定しないときは -80°C で凍結保存し溶解直後に測定する。成績は、再現性が良いためSingle測定で求められる。しかし、測定の際には、以下の点で注意したい。

- 測定前に試薬中の赤血球が沈降しないようによく混和する。
- Cold Activationが疑われる場合、EDTA採血による血漿を用いて、Mayer法で、確認する。

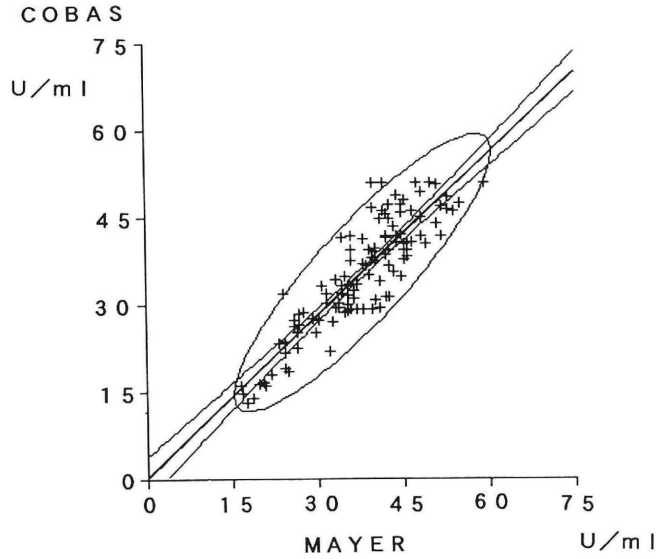


図6. MAYER 法との相関
 対象：任意ヒト血清
 N=114
 信頼楕円——95%
 信頼区間——99%
 回帰式 $Y=0.928X+0.285$
 相関係数 $R=0.8829$

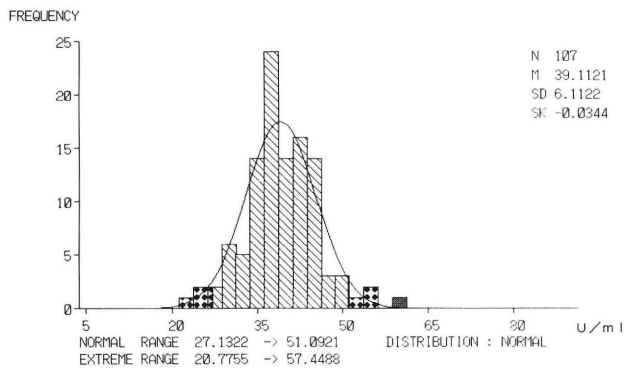


図7. 健常者集団 (パラメトリック統計処理)

・試薬の汚染や変質，試薬調整の際の誤りなどによるデータのミスを避けるため，測定ごとにコントロールを立てる。

ま と め

成人の正常値を 27.6~51.1 U/ml と設定した。

小児の正常値は 26.9~68.8 U/ml となり，正常値上限が有意に高値を示した。

免疫溶血濁度法による血清補体価の測定は，再現性・直線性・Mayer 法との相関性に優れ，また簡便・迅速であるため日常検査法として有用なデータが得られると思われる。

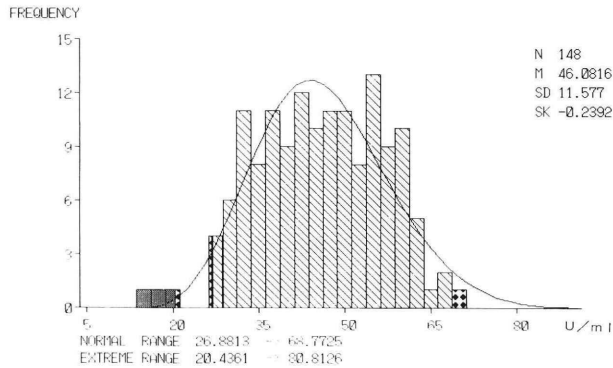


図8. 小児科外来患者集団 (C.R.R.P法による統計処理)

文 献

- 1) Mayer, M.M.: Procedure for titration of complement, In *Experimental Immunochemistry*. by Kabat, E.A. & Mayer, M.M. 149~153 C.C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, 1961.
- 2) 稲井眞彌: 補体価(CH50)の測定, 補体学—基礎・測定・臨床—, 稲井眞彌, 井上公藏, 田村昇共編, 119~133, 医歯薬出版, 1983.
- 3) 佐藤繁美 他: 補体価測定の自動化の試み, *アレルギー* **18**, 139~140, 1969.
- 4) 石川芳久 他: 減光度による人血清補体価の簡便法, *臨床免疫* **1**, 457~462, 1969.
- 5) Nydegger, U.E. et al.: A simple automated method for complement estimation in a continuous flow system. *J. Immunol* **109**, 910~913, 1972.
- 6) 三浦隆雄 他: 濁度測定による血清補体価測定法, *衛生検査* **32**, 1470~1474, 1983.
- 7) 三浦隆雄 他: 濁度測定による補体価測定法の日常検査への応用と評価, *衛生検査* **34**, 119~122, 1985.
- 8) 三浦隆雄 他: 免疫溶血濁度測定法による血清補体価 (CH50) の簡易自動化法 *臨床検査* **32**, 1537~1540, 1988.
- 9) 磯島喜孝 他: COBAS MIRA Sによる血清補体価 (CH50) 測定の基礎的検討, *臨床検査機器・試薬* **14**, 972~976, 1991.