

# 乾燥汙紙血による免疫グロブリン (IgG, IgA, IgM) と補体活性 (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>) の測定 とマス・スクリーニングへの応用

矢 田 純 一

野 間 剛

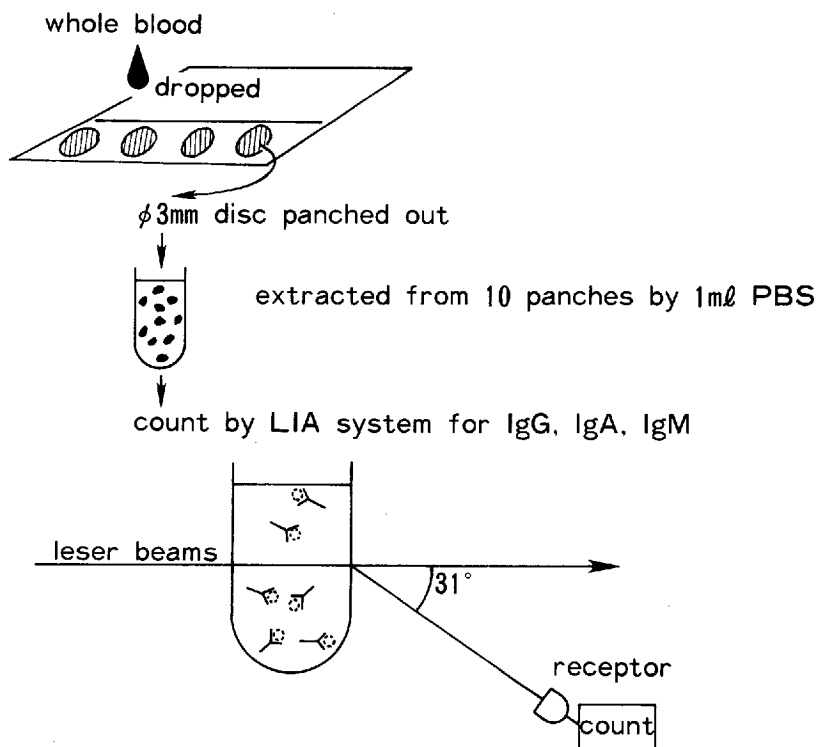
(東京医科歯科大学医学部小児科)

## 要 旨

乾燥汙紙血を用いて IgG, IgA, IgM および補体値の測定を試みた。免疫グロブリン (Ig) 抽出率は IgG で  $107.0 \pm 21.1$  (SD) % (n=37), IgA で  $90.5 \pm 27.3$  (SD) % (n=32), IgM で  $93.2 \pm 18.3$  (SD) % (n=34) であり, 補体抽出率は C<sub>3</sub> で  $90.2 \pm 16.8$  (SD) % (n=28), C<sub>4</sub> で  $96.3 \pm 20.4$  (SD) % (n=30) であり, 汙紙血中の Ig および補体がほとんど抽出されていると考えられた。汙紙乾燥時間 1 日と 7 日間では Ig および補体抽出率に有意差はなかった。汙紙浮遊時間を 7 日間乾燥汙紙血を用いて検討したところ, IgG では 24 時間浮遊は 3 時間に比較して抽出率がややよくなる傾向が認められたが, IgA, IgM では大差なく, 3 時間でほとんどの Ig が抽出されてくるものと思われた。C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> についても同様であった。血清値と抽出液換算値についての相関関係は IgG で相関係数  $r = 0.87$ , 相関式  $y = 1.036x - 16.0$  (x: 血清値, y: 換算値) (n=37) であり, IgA で  $r = 0.98$ ,  $y = 1.26x - 23$  (n=32), IgM で  $r = 0.93$ ,  $y = 1.14x - 18.7$  (n=34) であり, また C<sub>3</sub> では  $r = 0.87$ ,  $y = 0.85x - 0.59$  (n=28), C<sub>4</sub> では  $r = 0.81$ ,  $y = 1.2x - 8.7$  (n=30) であり両者の相関は汙紙血を用いた測定が実用可能であることを示した。本法は, 小児免疫不全症の疫学的アプローチとしてマス・スクリーニングに応用しうるものであり, また新生児・乳児期の重症感染や予防接種の重篤な副作用の予防と対策を知る上で有用な方法であると考えられた。

## 緒 言

小児先天性免疫不全症は他の疾患と比較して症例数の多い疾患ではないが, その実態についての正確な把握はいまだ十分でない。また新生児・乳児期の免疫不全状態は重症感染症の原因となることが知られ, 免疫グロブリン低下症児のポリオ生ワクチン摂取はそれと気づかれないで投与されると重篤な副作用を引き起こす。小児の免疫状態の把握は, いまだ実態が十分に明らかにされていない疾患の疫学的研究として, あるいは, 重症感染症や予防接種の重篤な副作用の予防と対策を知る上で重要なことと考えられる。著者らは, 乾燥汙紙血を用いて免疫グロ



$$\text{Immunoglobulin value} = \frac{1\text{ml}}{1.5\mu\text{l} \times 10} \times A = 66.6A$$

A : count

LIA : Leser immunoassay

PBS : phosphate buffered saline

図1 Method for detection of immunoglobulin (IgG, IgA, IgM)

ブリンおよび補体の測定を試み、新生児・乳児期の免疫不全状態を把握する上で有用と考えられる知見をえたので報告する。

## 方 法

### 1) 対 象

健康成人5名，小児科一般外来を受診し他の血液検査の必要であった患者35名，免疫グロブリン低下症患者4名を対象とした。

### 2) 方 法

先天性代謝異常症のマス・スクリーニングに用いられている沓紙上に，健康成人より採取した全血および他の検査のために患児より採取した全血のうち残りの数滴を滴下吸収させ7日間乾燥させたのち，3mm ディスク10個をパンチアウトし，1ml のリン酸バッファーに浮遊し24

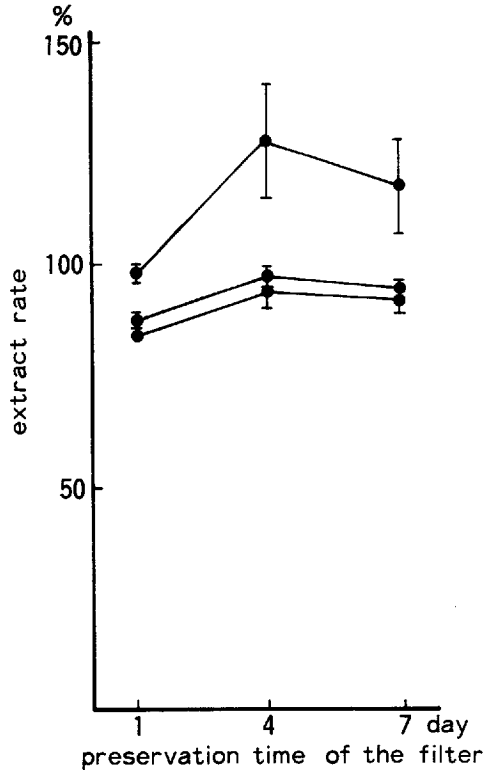


図2 Relationship between preservation time of the filter and extract rate of IgA from filter paper. No significant difference was found between 1 day and 7 days. The points on the graph indicate mean  $\pm$  SD of extract rate in three replicate assays.

時間後に回収した抽出液を濾過し被検々体とした (図1)。

被検々体25  $\mu$ l あるいは別に分離した血清を生理食塩水にて101倍に希釈したもの25  $\mu$ l (IgM, C<sub>3</sub> ではそれぞれ100  $\mu$ l) を2倍に希釈した抗血清 (抗 IgG, 抗 IgA, 抗 IgM, 抗 C<sub>3</sub>, 抗 C<sub>4</sub>; Hyland) 1ml と混和し, 室温で1時間反応させたのち, Laser nephrometer<sup>1)</sup> にて He, Ne ガスレーザー光線 (波長 632.8 nm) を照射し透過前方光線を 31° の角度に設置した受光管で捕え, 形成された免疫複合体を標準曲線より換算して測定した。

3 mm ディスクの血清量は, トレーサーを用いた予備実験からヘマトクリットが40%のとき 1.38~1.71  $\mu$ l であったことから約1.5  $\mu$ l であるとし, 抽出液の実測値を元の血清濃度に補正することにより免疫グロブリン値を以下の方法により求めた。

$$\text{免疫グロブリン値および補体値} = \frac{1 \text{ ml}}{1.5 \mu\text{l} \times 10} \times A = 66.6 A \quad (A: \text{実測値})$$

さらに乾燥濾紙からの免疫グロブリンおよび補体の抽出が十分であるか否かを知るために血清値との比をとり抽出率の検討を行った。またIg の抽出条件を検討するために, 濾紙乾燥時間, 濾紙浮遊時間などについての検討を加えた。

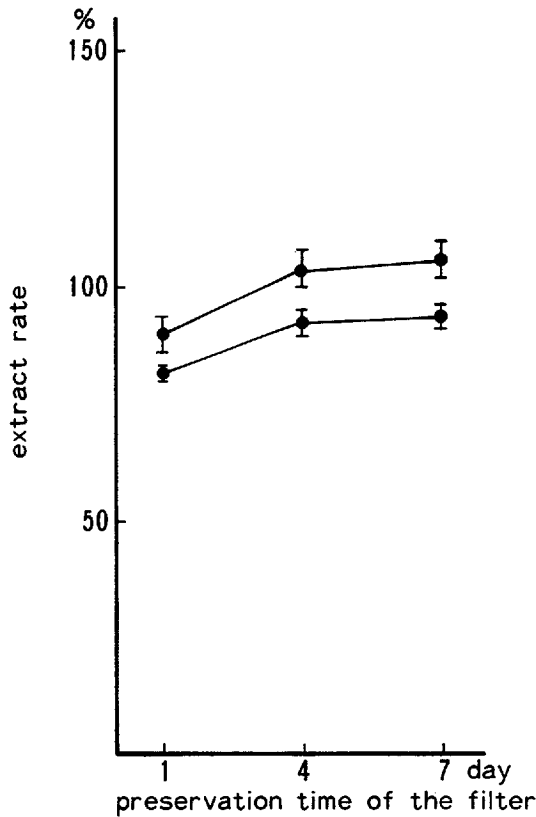


図3 Relationship between preservation time of the filter and extract rate of IgG from filter paper. No significant difference was found between 1 day and 7 days. The points on the graph indicate mean $\pm$ SD of extract rate in three replicate assays.

## 結 果

免疫グロブリン抽出率は、IgG で $107 \pm 21.1$  (SD) % (n=37), IgA で $90.5 \pm 27.3$  (SD) % (n=32), IgM で $93.2 \pm 18.3$  (SD) % (n=34) であり、また補体の抽出率はC<sub>3</sub> で $90.2 \pm 16.8$  (SD) % (n=28), C<sub>4</sub> で $96.3 \pm 27.4$  (SD) % (n=30) であり乾燥濾紙よりほとんどの免疫グロブリンおよび補体が抽出されているものと考えられた。

濾紙乾燥時間を1日、4日、7日間として検討したところ IgG, IgA, IgM とも1日と7日間では有意の差は認められなかった(図2, 図3, 図4)。補体 C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> についても同様であった。

濾紙浮遊時間を7日間乾燥させた濾紙血を用いて検討したところ IgG については24時間浮遊は、3時間に比較して抽出率がよくなる傾向が認められたが、IgA, IgM では大差なく、3時間でほとんどの Ig が抽出されてくるものと思われた(図5)。補体 C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> についても同様

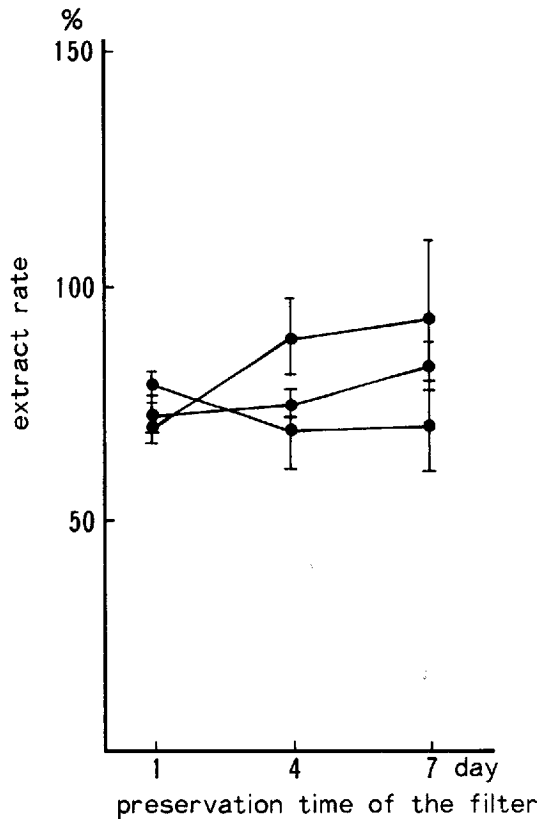


図4 Relationship between preservation time of the filter and extract rate of IgM from filter paper. No significant difference was found between 1 day and 7 days. The points on the graph indicate mean  $\pm$ SD of extract rate in three replicate assays.

であった。

血清実測値と抽出液換算の相関関係についての検討では、IgG の場合で、相関係数  $r = 0.87$ ，相関式  $y = 1.036x - 16.0$  ( $x =$ 血清値， $y =$ 換算値)， $n = 37$ であり(図6)，IgA の場合で  $r = 0.98$ ， $y = 1.26x - 23$ ， $n = 32$ であり(図7)，IgM の場合で  $r = 0.93$ ， $y = 1.14x - 18.7$ ， $n = 34$ であり(図8)両者の相関関係は、濾紙血を用いた測定が実用可能であることを示した。また補体での検討では、 $C_3$  の場合で  $r = 0.87$ ， $y = 0.85x - 0.59$ ， $n = 28$ であり(図9)， $C_4$  の場合で  $r = 0.81$ ， $y = 1.2x - 8.7$ ， $n = 30$ であり(図10)，免疫グロブリンと同様両者の相関は濾紙血を用いた測定が実用可能であることを示した。

IgG の測定限界は  $0.4 \text{ mg/dl}$ ，IgA では  $0.1 \text{ mg/dl}$ ，IgM では  $0.1 \text{ mg/dl}$  であったことから、抽出液換算値の信頼限界は IgG で  $0.4 \times 66.6 = 26.6 \text{ mg/dl}$ ，IgA では  $6.7 \text{ mg/dl}$ ，IgM では  $6.7 \text{ mg/dl}$  であった。マス・スクリーニングに応用する場合、血清異常値の絶対限界を IgG で  $200 \text{ mg}$ ，IgA で  $5 \text{ mg}$ ，IgM で  $20 \text{ mg}$  とすると、抽出液換算値の血清値に対する比はそれ

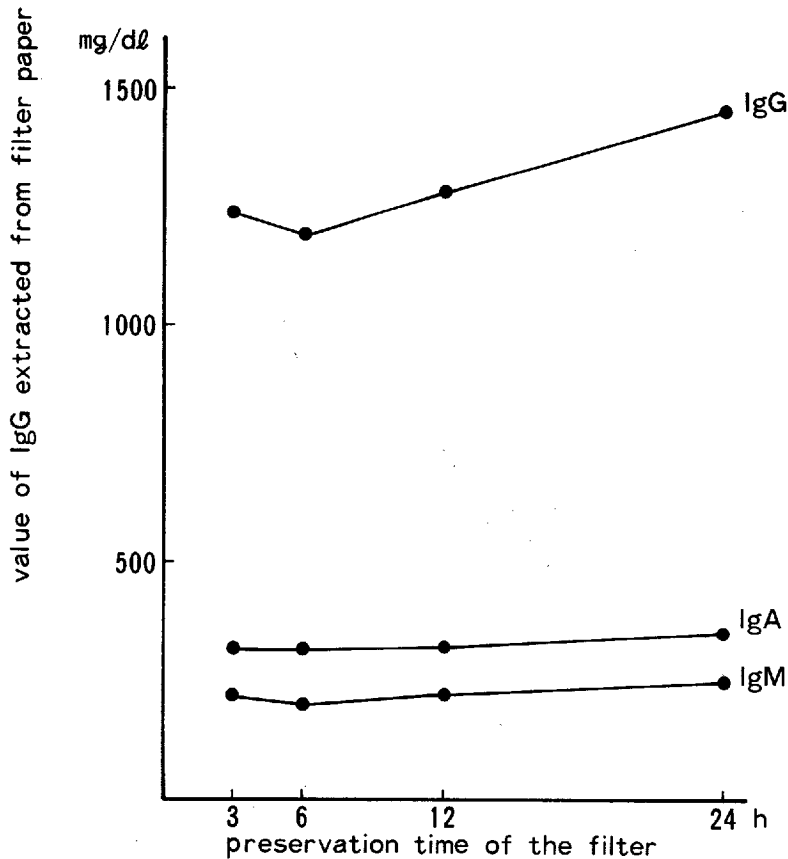


図5 Relationship between extract time and extract rate  
 IgA and IgM show no difference of extract rate between 3 hours and 24 hours, although IgG shows lower extract rate by 3 hours than by 24 hours.

それ、 $107.0 \pm 21.1$  (SD) %、 $90.5 \pm 27.3$  (SD) %、 $93.2 \pm 18.3$  (SD) %であったことから仮に平均値+3 SD %までを絶対限界値と考えることにすると抽出液換算値の絶対限界値はIgGで $340 \text{ mg/dl}$ 、IgAで $7.5 \text{ mg/dl}$ 、IgMで $35 \text{ mg/dl}$ であると考えられた。これらの値は抽出液換算値の信頼限界の範囲内にあることから、低免疫グロブリン血症のスクリーニングに応用する場合、それぞれ $340 \text{ mg/dl}$ 、 $7.5 \text{ mg/dl}$ 、 $35 \text{ mg/dl}$ 以下の症例が異常症例と判定できると考えられた。

高免疫グロブリン血症を示す症例についても、(抽出率平均値-3 SD)を限界値として考えれば、異常限界値が判定できるものと考えられた。

実際に低免疫グロブリン血症の4症例についての検討を加えたところ、抽出液換算値から認められた低免疫グロブリン値の異常は、血清中の免疫グロブリン値の異常と一致していた(図6、図7、図8)。

補体の異常値の基準は、健康小児の平均値 $\pm 2$  SD以上および以下を定めれば適当と考えら

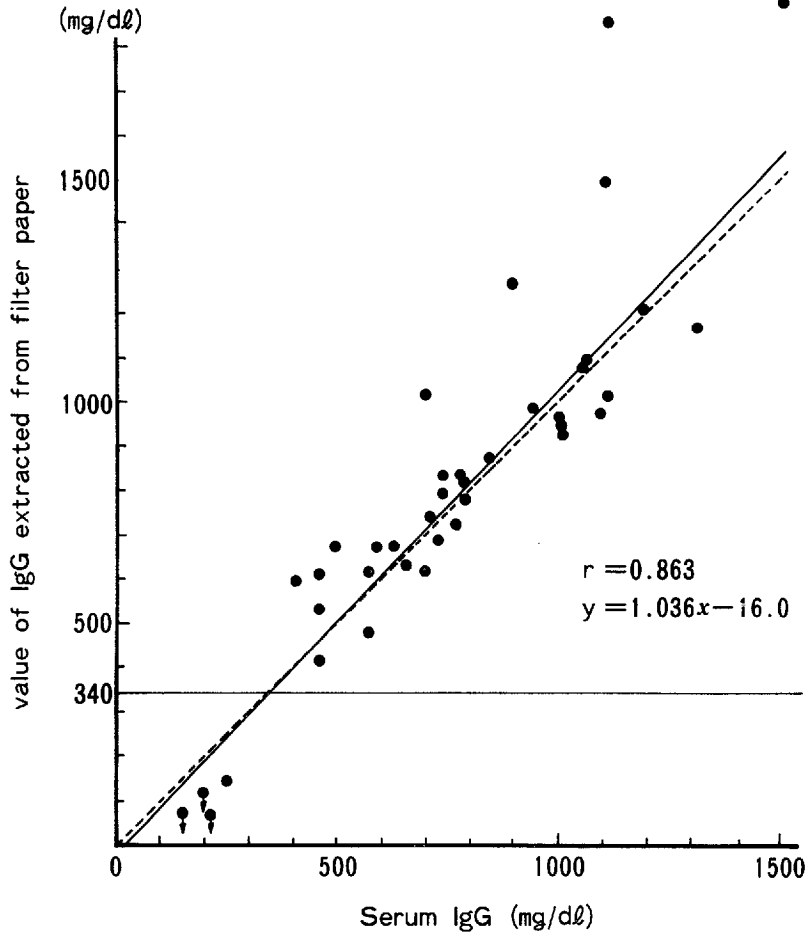


図6 Relationship between serum IgG value and value of IgG extracted from filter paper

れる。今回は症例数が少なかったことから、今後症例を重ねてゆくことが必要であると考えられた。

## 考 案

小児先天性免疫不全症は厚生省免疫不全症研究班の報告<sup>2)</sup>では604例が登録され、そのうち免疫グロブリン低下症は約190例であり、補体成分の欠損症はわずか12例である。

その実態についての正確な把握はいまだ十分でなく、現在のところ疫学的アプローチとして大病院医師に対するアンケート調査<sup>2)</sup>や、慢性疾患給付台帳に基づく厚生省小児慢性疾患に関する研究班の資料<sup>3)</sup>以外に確立された方法はない。著者らの開発した沱紙血による免疫グロブリンおよび補体の測定は、採血法、搬送、保存法が容易であり、小児免疫不全症の実態についていまだ正確に把握されていない現在、疫学的アプローチとしてのマス・スクリーニングに応

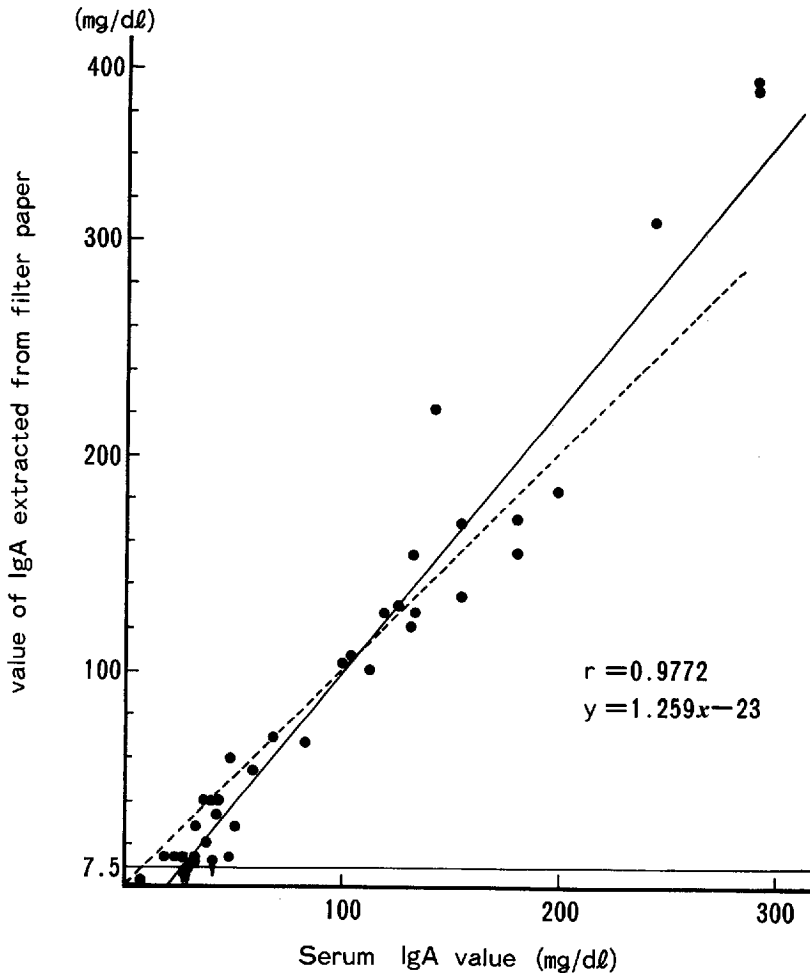


図7 Relationship between serum IgA value and value of IgA extracted from filter paper

用可能であると考えられる。

また新生児・乳児期は一般に生理的免疫不全の状態にあることで知られ、新生児・乳児の重症感染の原因となる。また免疫グロブリン低下症児の予防接種、特にポリオの生ワクチンの摂取は、それと気がつかないで投与されると、重篤な副作用を引き起こす。小児の免疫状態の把握はこれらの重症感染症や予防接種の重篤な副作用の予防と対策を知る上で重要なことと考えられる。沓紙血による免疫グロブリンおよび補体の測定のマス・スクリーニングはこれらの問題の解決策の一つとして役立つものと思われた。

理論値より換算した Ig および補体の抽出率は、血清値と比較した場合、十分な値を示し、沓紙血中のほとんどの Ig が抽出しているものと考えられた。検体の搬送は郵便を用いて可能であるがこの場合、検体採取から Ig および補体測定開始の抽出まで約 1 週間あれば十分であ



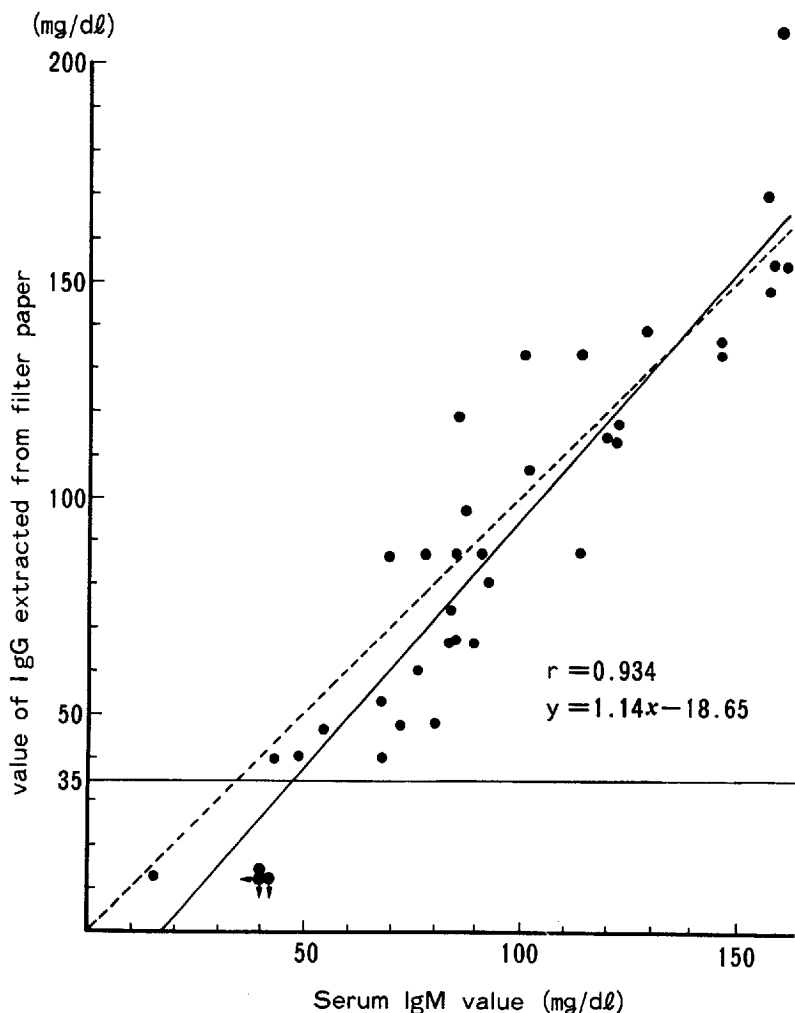


図8 Relationship between serum IgM value and value of IgM extracted from filter paper

ると考えられるが、著者らの方法は、7日間乾燥検体も十分の抽出率を示し、1日間乾燥検体と大差なく、検体保存という点で優れていると考えられた。

免疫グロブリン異常値をどこで切るかという検討に関しては、結果に述べた通り、絶対限界を IgG の場合で340 mg/dl, IgA で7.5 mg/dl, IgM で35 mg/dl と定めたが、さらに比較的限界値とより正確な絶対的限界値を定めるためには、今後症例を重ねていく必要があると考えられる。著者らが実際に検討した免疫グロブリン低下症4例については、著者らの定めた異常値の規準にあてはまることが判明したが、今後はさらに限界値付近の Ig 値を示す症例を集積し、マス・スクリーニングの絶対的異常値と比較的異常値の検討を加えていくことが必要と考えられた。

補体の異常値の検討では、検討した健康小児全例から得られた平均値±2 SD 以下および以

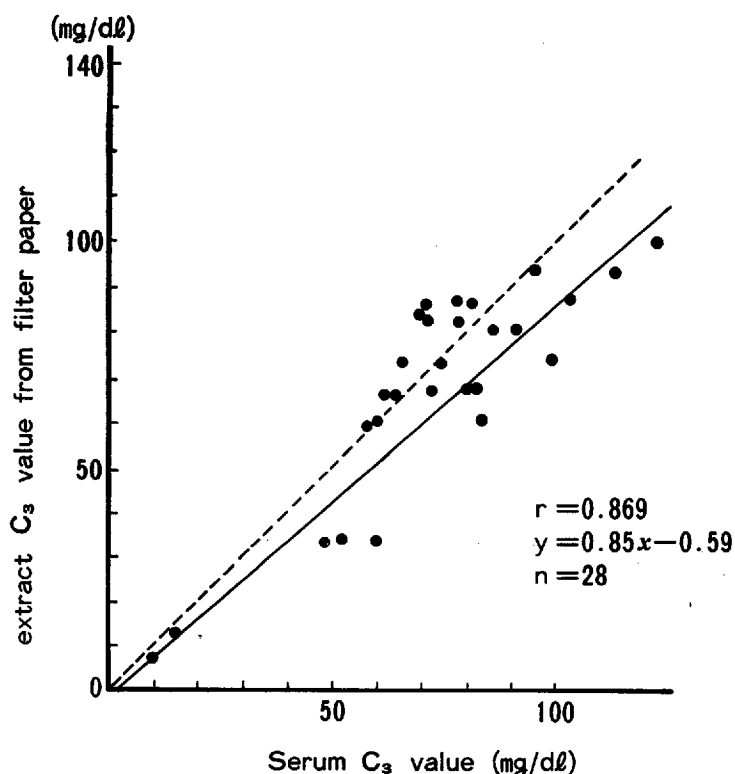


図9 Relationship between serum C<sub>3</sub> value and extract C<sub>3</sub> value from filter paper

上を異常値としてスクリーニングをしていくことが適当であると考えられるが、今回の調査では症例数が十分でないので正確な基準は定められないと考えられた。今後症例を重ねていくことで、絶対的異常値および相対的異常値の基準の検討を加えてゆきたい。

## 結 語

乾燥濾紙に吸収される微量の血液を用いて血中免疫グロブリンおよび補体の測定を可能にした。

小児免疫不全症の実態についてはいまだ正確に把握されていない現在、採血法、搬送法、保存法の容易な本法は疫学的アプローチとしてのマス・スクリーニングに応用可能であり、また新生児・乳児期の重症感染や予防接種の重篤な副作用の予防と対策を知る上で有用な方法であると考えられた。

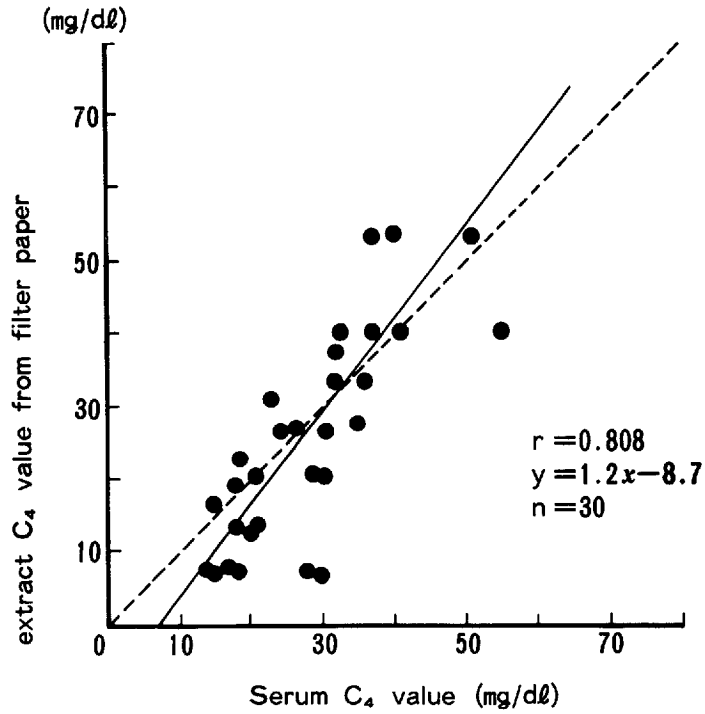
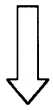


図10 Relationship between serum  $C_4$  value and extract  $C_4$  value from filter paper

## 文 献

- 1) Edit. Immunol. Travenol. Lab INC, Res. of Hyland : Technical Discuss. No. 32, May, 1976.
- 2) 小林 登, 他 : 原発性免疫不全症候群の全国調査登録について. 厚生省特定疾患「免疫不全症候群」の成因, 治療および予防に関する調査研究班, 矢田純一, 昭和55年度研究報告書, p. 7, 1980.
- 3) 矢田純一, 野間 剛 : 小児慢性疾患, 特に先天性代謝異常 および 先天性免疫不全症の疫学的研究. 厚生省小児慢性疾患に関する研究, 小児慢性疾患の実態, フォローアップに関する研究, 加藤精彦, 昭和55年度研究報告書, p. 61, 1980.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 要 旨

乾燥濾紙血を用いて IgG, IgA, IgM および補体値の測定を試みた。免疫グロブリン(Ig)抽出率は IgG で  $107.0 \pm 21.1$  (SD)% (n=37), IgA で  $90.5 \pm 27.3$  (SD)% (n=32), IgM で  $93.2 \pm 18.3$  (SD)% (n=34) であり, 補体抽出率は C3 で  $90.2 \pm 16.8$  (SD)% (n=28), C4 で  $96.3 \pm 20.4$  (SD)% (n=30) であり, 濾紙血中の Ig および補体がほとんど抽出されていると考えられた。濾紙乾燥時間 1 日と 7 日間では Ig および補体抽出率に有意差はなかった。濾紙浮遊時間を 7 日間乾燥濾紙血を用いて検討したところ, IgG では 24 時間浮遊は 3 時間に比較して抽出率がややよくなる傾向が認められたが, IgA, IgM では大差なく, 3 時間でほとんどの Ig が抽出されてくるものと思われた。C3, C4 についても同様であった。血清値と抽出液換算値についての相関関係は IgG で相関係数  $r=0.87$ , 相関式  $y=1.036x-16.0$  (x: 血清値, y: 換算値) (n=37) であり, IgA で  $r=0.98$ ,  $y=1.26x-23$  (n=32), IgM で  $r=0.93$ ,  $y=1.14x-18.7$  (n=34) であり, また C3 では  $r=0.87$ ,  $y=0.185x-0.59$  (n=28), C4 では  $r=0.81$ ,  $y=1.2x-8.7$  (n=30) であり両者の相関は濾紙血を用いた測定が実用可能であることを示した。本法は, 小児免疫不全症の疫学的アプローチとしてマス・スクリーニングに応用しうるものであり, また新生児・乳児期の重症感染や予防接種の重篤な副作用の予防と対策を知る上で有用な方法であると考えられた。