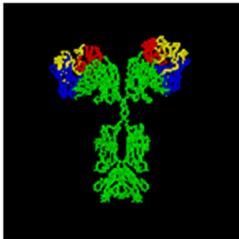


『基礎から学ぶ臨床化学』

異常反応（非特異反応）の原因と対処法



 栄研化学株式会社
マーケティング推進室
阿部 雅仁
(長尾 章子・齊藤 智博・高島 睦輝)

生化学検査と免疫血清検査

<生化学検査 (臨床化学検査)>

化学反応や酵素反応を用いて測定する検査

検査項目例：GLU、BUN、CRE、TP、ALB、HDL-C、LDL-C、AST、ALT etc...

<免疫血清検査>

抗原抗体反応を用いて測定する検査

検査項目例：CRP、ASO、RF、免疫グロブリン、PSA、hCG、HCV抗体 etc...

生化学検査と免疫学的検査の測定上の違い

生化学 色調（極大吸収波長）の変化を捉える！

◎ ランベルト・ベールの法則に従う

→ 吸光度は、濃度と光路長の積に比例

★☆☆吸光度と濃度は「直線的」な関係☆☆★

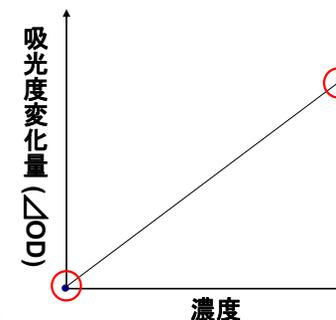
免疫 濁り具合の変化を捉える！

◎ ランベルト・ベールの法則に従わない

★☆☆吸光度と濃度は「曲線的」な関係☆☆★

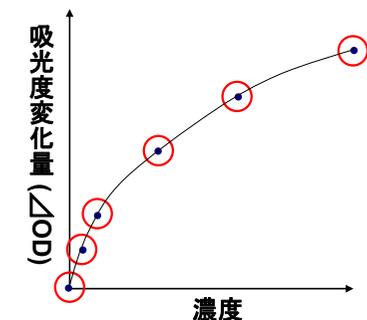
直線検量線と曲線検量線の比較

<生化学検査項目>



・直線で示される関係性
・0濃度と任意の1点を結ぶ直線で表す

<免疫血清検査項目>



・曲線で示される関係性
・0濃度と任意の複数点を結ぶ曲線で表す

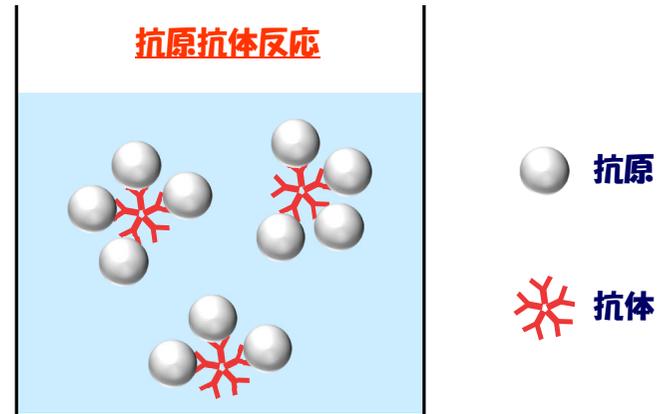
免疫学的検査の原理とは？

免疫反応 (抗原抗体反応)
 = 「抗原」と「抗体」が「特異的」に結合する反応

- ・抗原・・・細菌やウイルスなど体外から侵入した異物(=非自己)
- ・抗体・・・「抗原」に対して反応する免疫グロブリンの総称

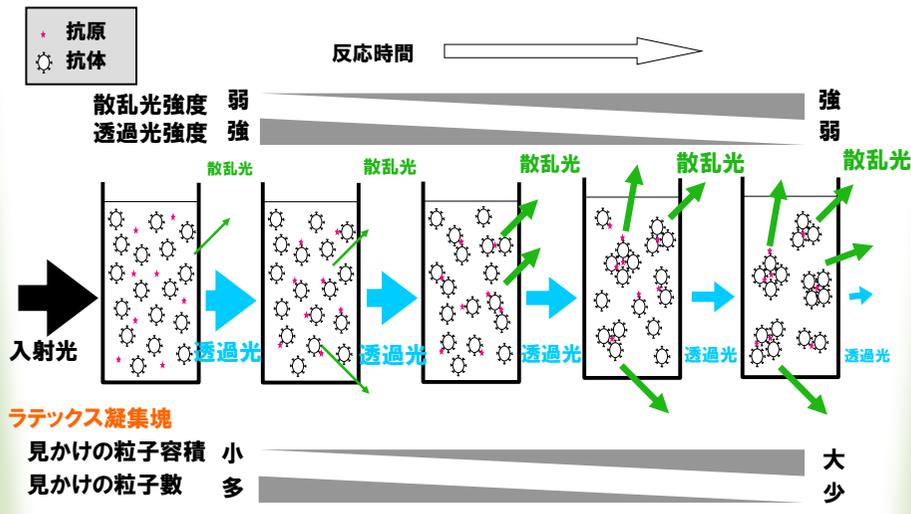


臨床検査への抗原抗体反応の応用

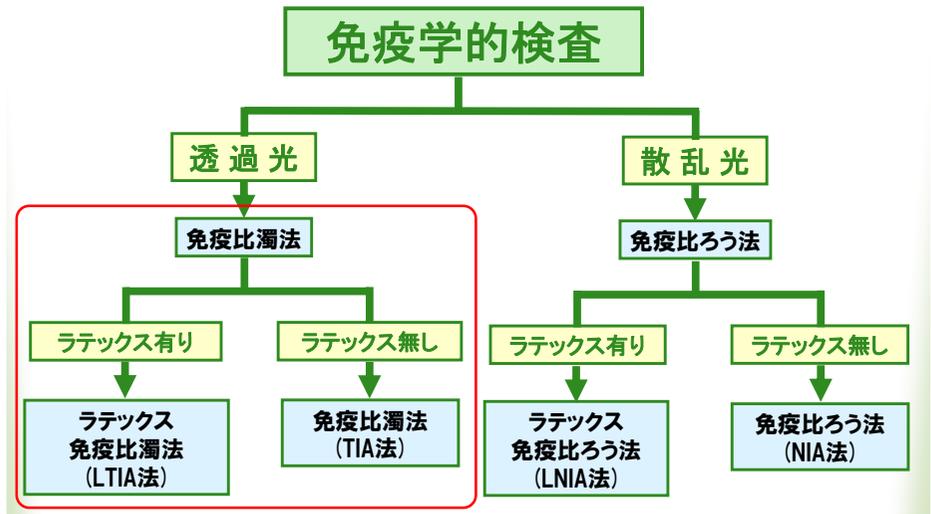


抗原抗体反応が進むにつれて凝集塊が巨大化

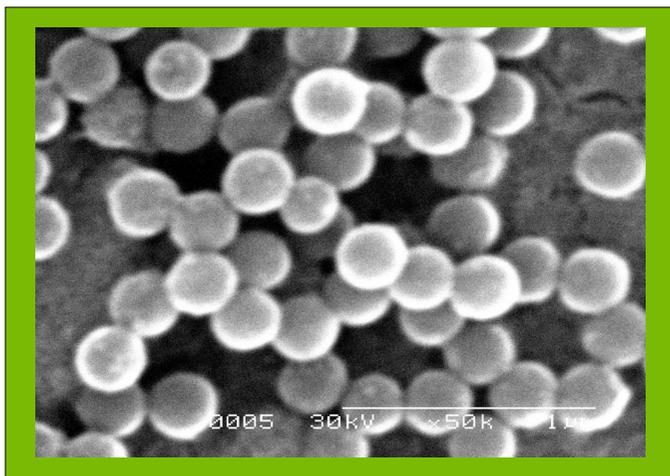
抗原抗体反応の光学的測定



光学的免疫化学法



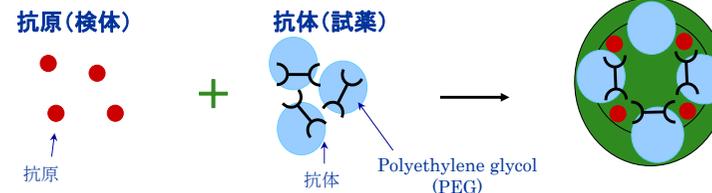
ラテックス粒子の電子顕微鏡像



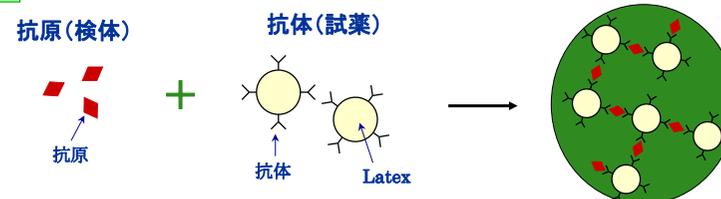
栄研化学㈱ 社内資料より

TIA 法と LTIA 法の反応（抗原測定）

TIA法 抗原と抗体との反応



LTIA法 抗原とラテックスが結合した抗体との反応



LTIA法普及に伴う異常反応への遭遇

LTIA法は汎用機における免疫検査の主流！

- ・ 抗原抗体反応を用いた特異性に優れた測定系
- ・ 安定した精確性
- ・ 迅速かつ大量検体の処理



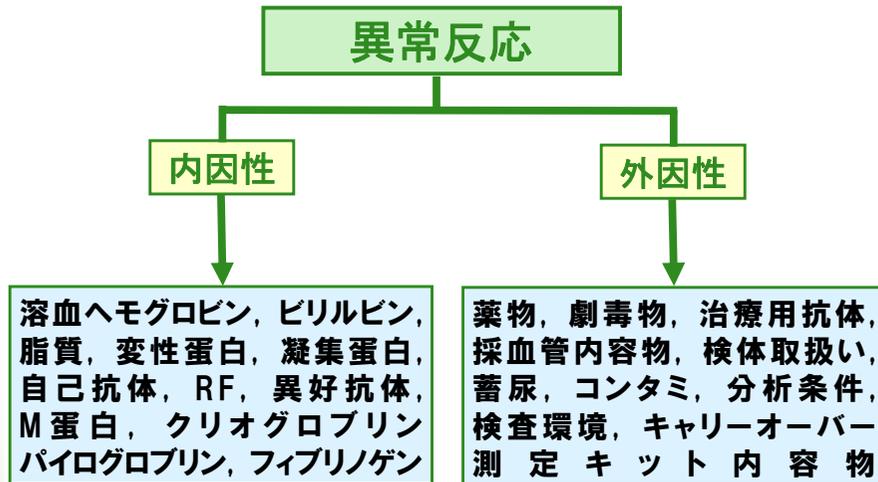
LTIA法の普及に伴う異常反応症例の報告数増加

- ① 免疫測定における利点欠点の表裏一体性
- ② ホモジニアスアッセイによる干渉反応のリスク
- ③ 自動分析装置のブラックボックス化

異常反応発見の糸口

- ・ 異常値の出現
 - ◆ 異常低値・マイナス打ち
 - ◆ 異常高値（極外値）
 - ◆ 装置エラーフラグ
 - ◆ プロゾーンチェック
- ・ データのデルタチェック
 - ◆ 項目間チェック
 - ◆ 前回値チェック
- ・ 病態との不一致（臨床側からの指摘）
- ・ 別法との乖離
- ・ 確認試験
 - ◆ 希釈整合性の確認
 - ◆ タイムコース異常

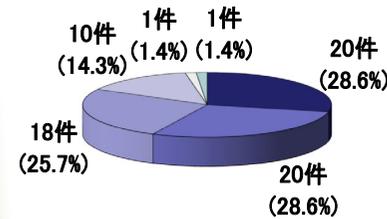
異常反応を惹起する要因



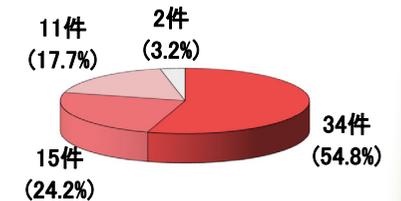
異常データを引き起こし得る要因

異常データに関するアンケート結果 (68施設132件)

i) 単項目で異常の場合(70件)



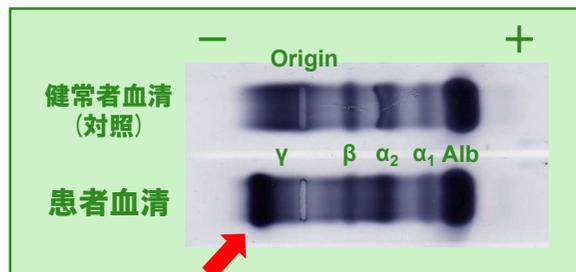
ii) 複数項目で異常の場合(62件)



平成17年日臨技プロジェクト研究報告より

異常反応を引き起こす検体 ①

— M蛋白 —



- ・ 量的および質的異常を伴う免疫グロブリンの異常産生
- ・ 試薬との接触により濁りを生じた場合、急激な吸光度の変化による異常高値またはマイナス打ちの要因となる
- ・ 動物蛋白、酸性緩衝液など多様な反応性を示す

異常反応を引き起こす検体 ②

— 異好抗体 —

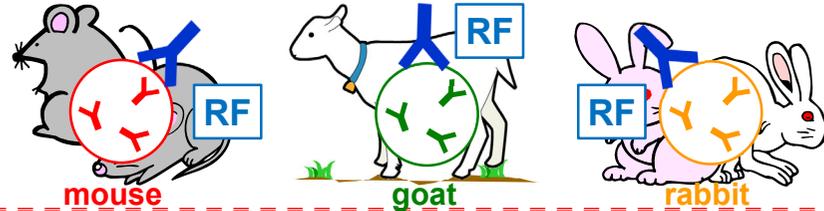


- ・ 異種動物蛋白に対する抗体活性を持った免疫グロブリン
- ・ 測定対象となる物質 (または活性) の有無に関わらず、試薬中の動物抗体や蛋白質と反応して異常値を示す
- ・ 異好抗体による異常反応は多様性に富む機序を示し、**全ての異好抗体の影響を回避するのは極めて困難**

異常反応を引き起こす検体 ③

— リウマトイド因子 (RF) —

RFはヒトIgG-Fc部分に対する自己抗体の一種です
 → ヒトのみならず、ほ乳類動物に対しても反応!!



- ・ 異好抗体とは異なり、動物に対する特異性を持たない
- ・ **必ずしも異常反応を引き起こすとは限らない**
- ・ とりわけウサギIgGに対する反応性が強い事で知られる
- ・ RF活性を持つ免疫グロブリンは通常ポリクローナル性であるが、稀にモノクローナル性(M蛋白)のものもある

異常反応を引き起こす検体 ④

— その他の起因物質 —

○ 温度依存性蛋白 (クリオグロブリンなど)

- ・ 測定試薬中での混濁発生や、固相への吸着により影響
- ・ HCV抗体陽性検体で出現率が高い

○ フィブリノゲン

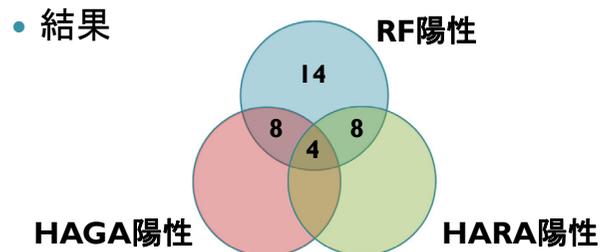
- ・ 非常に疎水性の強い蛋白質で、固相への吸着により影響
- ・ 血清と血漿で測定値が乖離する場合の原因の1つ

○ 各種妨害物質 (Hb, Bil, 脂質など)

- ・ 各種物質の極大吸収波長と同じ波長での測定系で影響
- ・ 試薬検討時の妨害物質の影響データで予め確認可能

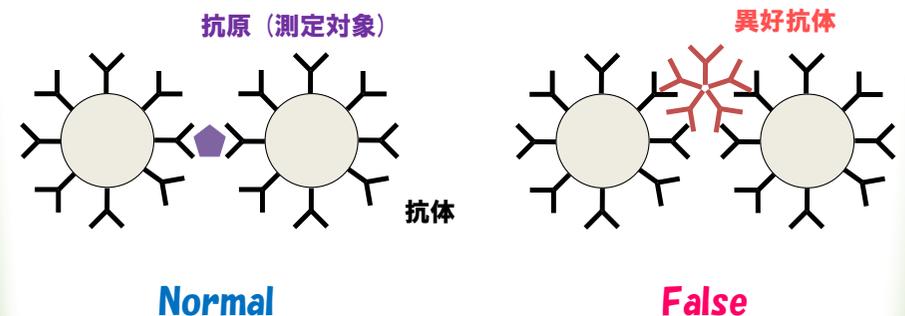
異常反応を惹起させる検体の頻度

- ・ 対象
 - RF陽性検体 254例
 - 高ガンマグロブリン血症検体 297例 (M蛋白血症51例を含む)
 - IgG : 187例、IgA : 71例、IgM : 39例



栄研化学㈱ 社内資料より

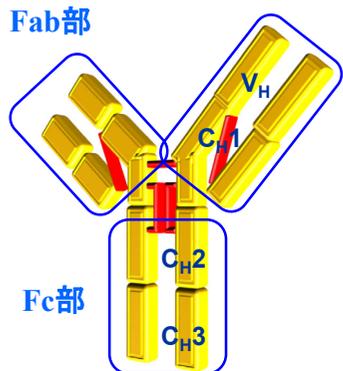
異好抗体による異常反応メカニズム



Normal

False

免疫グロブリンと異常反応



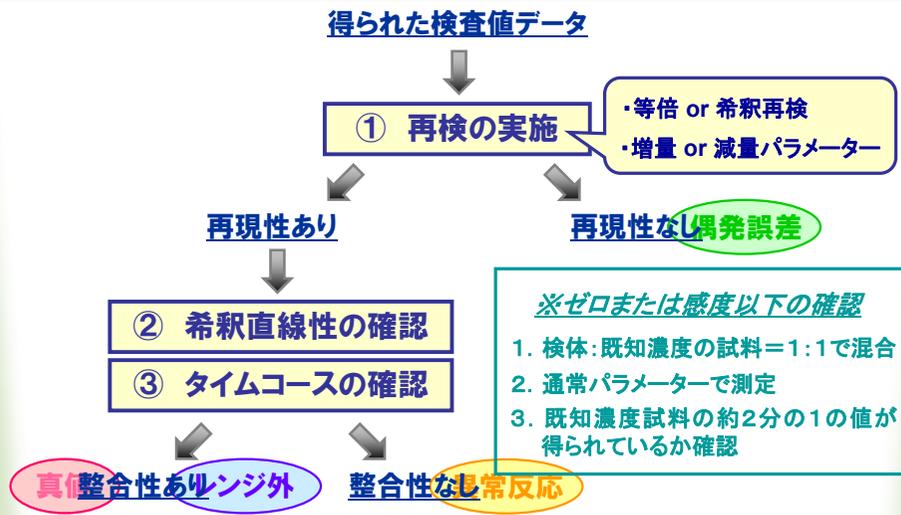
ヒトIgG 分子

- ① 抗原抗体反応
⇒ Fab部N末端より約110個のアミノ酸配列から構成される高次構造の変化
- ② ジスルフィド結合 (S-S結合)
⇒ V_H~C_{H3}の各ドメインにおける含硫アミノ酸同士の結合
- ③ 疎水結合
⇒ Fc部疎水性アミノ酸を介した結合
- ④ グリコシド結合
⇒ C_{H2}付近の糖鎖構造における結合
- ⑤ 各種化学結合
⇒ Fc部を中心に化学的性質で結合

免疫グロブリンクラス別の特性

動物種	IgG		IgA		IgM	IgD	IgE
ヒト							
重鎖	γ1	γ2	γ3	γ4	α1,2	μ	δ
軽鎖	κ / λ (67 / 33%)						
分子量 (kD)	150	150	170	150	160 (400)	970	180
濃度 (mg/mL)	5.0-9.5	2.2-4.8	0.4-1.0	0.1-0.6	0.4-3.0 0.1-0.5	0.2-2.8	<1.0
マウス							
重鎖	γ1	γ2a	γ2b	γ3	α	μ	δ
軽鎖	κ / λ (95 / 5%)						
分子量 (kD)	160	160	160	160	160, 400	900	180
濃度 (mg/mL)	0.3-5.0	0.1-4.0	0.1-5.0	0.1-0.2	<0.03	0.1-1.6	<0.01

異常データの確認プロトコル例

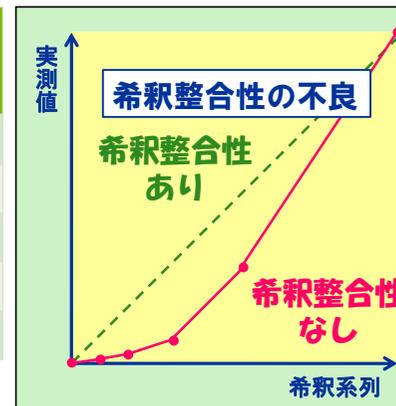


異常反応の確認・解析法 ①

— 希釈整合性の確認 —

CRP 初検値 40mg/dLの場合

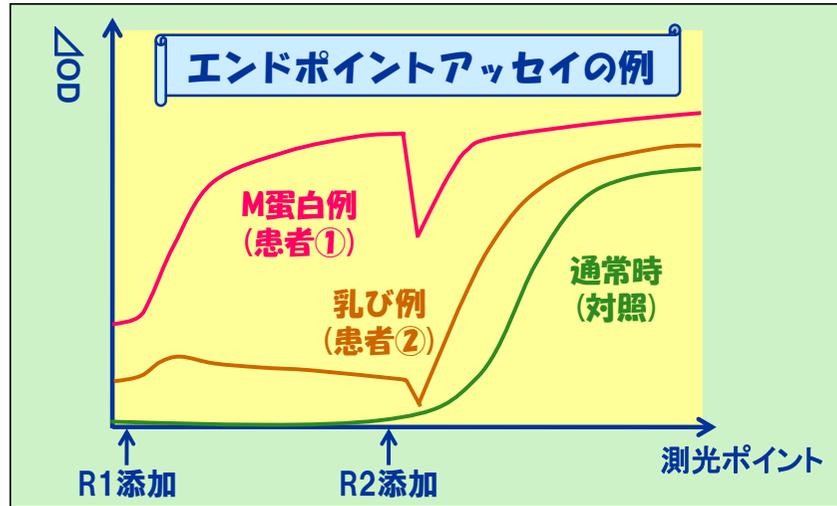
希釈倍率	整合性あり (mg/dL)	整合性なし (mg/dL)	左記の換算値 (mg/dL)
× 1	40	40	—
× 2	20	12	24
× 5	8	1.8	9
× 10	4	0.5	5
× 20	2	0.22	4.4



整合性がとれる濃度 = 真値と思われる濃度

異常反応の確認・解析法 ②

— 反応タイムコースの確認 —



異常反応の確認・解析法 ③

— Sia test (シアテスト) —

精製水1.0mL + 患者血清1滴 (約50 μ L)

白濁沈殿物の有無を観察

白濁沈殿物が生じたら...

Sia test 陽性

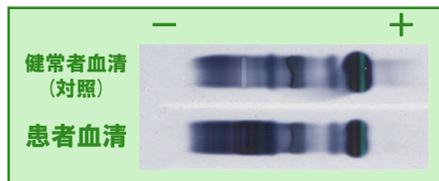
白濁沈殿物+



- ・ Sia test は、疎水性アミノ酸に富む蛋白を検出する
- ・ 異常反応の起因となる蛋白の多くは、疎水性が強い性質を持つため Sia test 陽性となりやすい

異常反応の確認・解析法 ④

— 電気泳動法・カラムクロマトグラフィー法 —

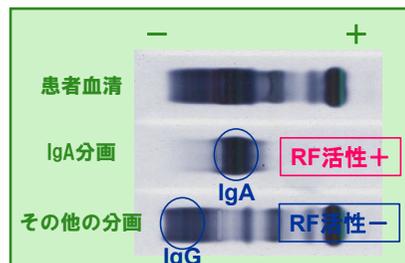
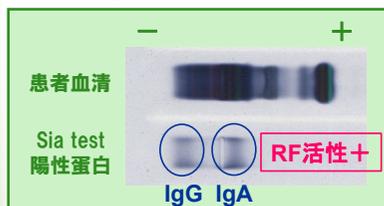


IgG 2,890 mg/dL
IgA 3,460 mg/dL
IgM 38 mg/dL
RF 6,680 IU/mL

Sia test 陽性蛋白

カラムを用いたIgAの分画操作

遠心・洗浄・可溶化



異常反応の確認・解析法 ⑤

— 異好抗体の光学的スクリーニング (弊社実施) —

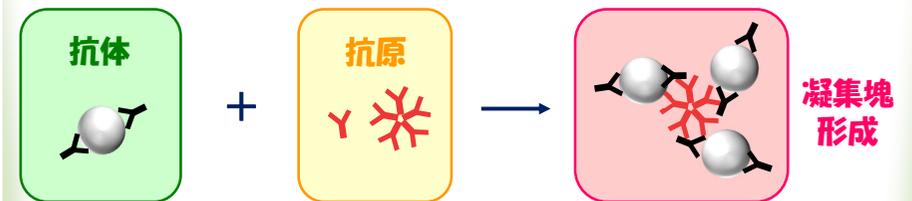
試薬成分：各種動物IgG感作ラテックス試液

+

検体中の異好抗体 (HAMA, HAGA, HARA etc...)

抗原抗体反応

ラテックス粒子の凝集塊形成 = 濁りの度合いを測定



異常反応解析の実例 (弊社での解析)

大学病院 様

測定項目 異抗体、RF、IgG、IgA、IgM

1. 異抗体の確認試験結果

異抗体	HAGA	HAHA	HAMA	HARA
検体	428	676	14	623

※50以上を陽性とする。 Dabs. (× 10000)

- 異抗体が複数陽性 (ヤギ・ウマ・ウサギ)
- リウマトイド因子が高力価
- ポリクローナル性のIg増加

2. RFの測定結果 (IU/mL)

希釈率	測定値	換算値
× 1	1,181.1	1,181
× 5	3,633.4	18,167
× 10	3,127.2	31,272
× 20	310.1	6,202
× 50	111.2	5,560
× 100	60.9	6,090

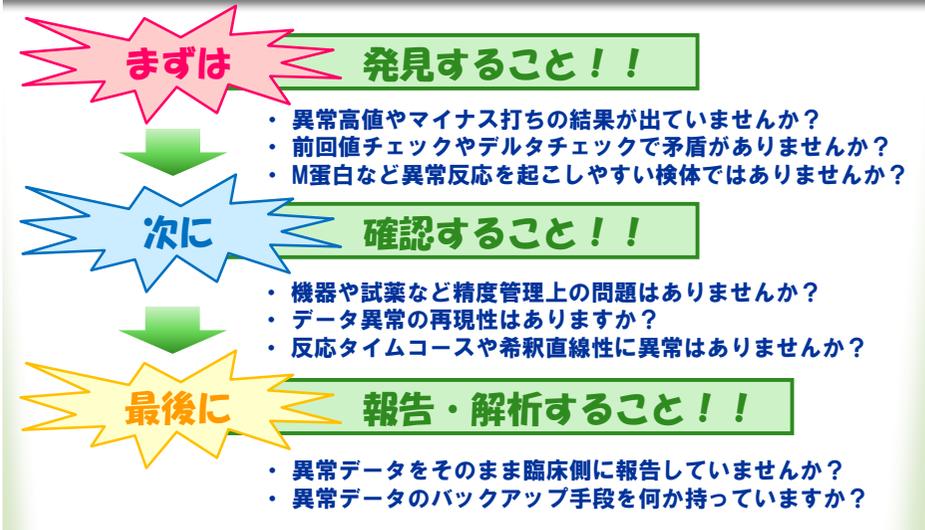
測定範囲 5.0~500.0 IU/mL

基準範囲 15 IU/mL以下

3. IgG、IgA、IgMの測定結果 (mg/dL)

測定項目	IgG	IgA	IgM
検体	1882	426	489
基準範囲	870~1700	110~410	35~220

異常反応のフォローアップ



栄研化学LTIA法試薬「LZテスト‘栄研’」シリーズ

- ラテックス免疫比濁法による測定
- 蓄積されたラテックス技術を応用
- 異常反応ゼロに向けての解析と対応
- 製品と技術を介した臨床へのフィードバック

ご清聴有難う御座いました



栄研化学株式会社