

間接蛍光抗体法に退色防止効果のある封入剤作成と有用性の検討

平 桃子¹⁾、岡田 恵実¹⁾、川村 宏樹¹⁾

1) 新潟医療福祉大学 臨床技術学科

【背景・目的】 抗核抗体とは細胞核の構成成分に対する自己抗体の総称で、SLEなどの膠原病で高率に出現する。核の染色型から対応する抗原を推測することが可能である¹⁾。現在は核の大きいHep2培養細胞を基質に用いた間接蛍光抗体法が主流である。

間接蛍光抗体法は、細胞や菌体の標本に被検血清を反応させ、洗浄後、蛍光色素を標識した抗ヒト免疫グロブリン抗体を二次抗体として反応させる。その後、再び洗浄を行い、蛍光顕微鏡下で蛍光発色を観察することにより目的とする抗体の有無を判定する方法である。蛍光発色は時間とともに退色するため、長時間するには蛍光退色防止封入剤を使用する必要がある。しかし、市販の封入剤は高価であり、コストを考えると汎用は難しい。そこで本研究では、蛍光染色の退色防止効果が報告²⁾されているパラフェニレンジアミン(PPD)を添加した封入剤を作成し、濃度別に退色の減衰率を求め、その効果を検討する。

【方法】

1. 試薬の調整

抗核抗体検査キットはフルオロHEPANATEST(MBL)、陽性検体は抗核抗体管理血清HEPASERA-1(MBL)、p-フェニレンジアミンはSigma-Aldrich社の製品を用いた。また陰性検体は5倍に、その他は40倍に希釈して使用した。封入剤はPBSとグリセリンを1:9混ぜた封入剤をベースとし、パラフェニレンジアミンを20mg/dL、50mg/dL、100mg/dLの濃度になるように添加し、4種類の封入剤を作成して使用した。

2. 染色操作

間接蛍光抗体法による抗核抗体の染色は、MBL社の定法に従いおこなった。なお蛍光像はOLYMPUS社製のBX53FとCCDカメラシステム(OLYMPUS IK-TU51CU-A)を用いて撮影した。

3. 統計処理法

検定はMann-Whitney U-testを実施して、 $p > 0.05$ 以下を有意差有りとした。 $p > 0.05 = *$ 、 $p > 0.01 = **$ 。

なお、本研究は関連する利益相反はない。

【結果】

1. PPD濃度別蛍光の経時変化

初めに、PPDを各濃度に設定して、PPD濃度による蛍光の経時変化を比較した。その結果、5分後に着目すると、PPD無添加群とPPD20mg/dL群では蛍光がほぼ認められなかった。一方PPD50mg/dL群、100mg/dL群では、照射直後よりは暗いが、蛍光が観察できた。これらのことから、PPD無添加群と添加した群では陰性検体に自家蛍光などの変化は見られなかったため影響はないと示唆さ

れる。また、照射直後の蛍光の発色を比べると、PPDの添加濃度が高くなるほど発色が強くなっている。これは、PPDを加えることで、封入剤を滴下してから、遮光し観察するまでの手順の間に蛍光灯の光などによる蛍光の減衰を抑えられていると推測される。

2. 減衰率の経時変化

次に、蛍光の輝度から減衰率を求めた。その結果、PPD無添加群とPPD20mg/dL群では、有意な差は認められなかった。一方、PPD50mg/dL群、PPD100mg/dL群では無添加群に比べ有意な減衰抑制能が認められた。

3. 陽性検体別の蛍光の経時変化

PPDを100mg/dL添加した場合の5分後の蛍光の減衰を陽性検体別に比較した。その結果、均質型、斑紋型に比べ、セントロメア型では蛍光が弱いことが示唆される。

次に、斑紋型、セントロメア型の減衰率をグラフにした。どちらも均質型と同様、PPD50mg/dL、100mg/dL添加することで蛍光の減衰を有意に抑制された。5分後の減衰率を比較すると、斑紋型ではPPD無添加群は99.7%、PPD20mg/dL群は95.5%、PPD50mg/dL群は66.4%、PPD100mg/dL群は50.9%となった。セントロメア型ではPPD無添加群は101.9%、PPD20mg/dL群は99.2%、PPD50mg/dL群は79.8%、PPD100mg/dL群は67.4%となった。以上のことから、セントロメア型では他の検体に比べて減衰が早いことが示唆される。

【考察】 セントロメア型で均質型、斑紋型に比べ、減衰率が高くなっていた。これは、セントロメア型は均質型、斑紋型に比べ、もともと蛍光に染まる部分が少なく、輝度が弱いため、他よりも蛍光の減衰が早くなったことが考えられる。

PPD50mg/dLを添加した群と100mg/dL添加した群では、1年間使用した場合でもコストにおいて大きな差はみられない。また、同様な検討を計3回繰り返したところ50mg/dL群では減衰を優位に抑制したが抑制率が各検討で変動がみられた。以上のことから、PPD100mg/dL群が減衰率が最も抑えられ、安定していることが示唆された。したがって、PPD100mg/dL添加封入剤を使用したほうが安定した結果を得ることができると考える

【結論】 PPDを添加した封入剤は、作成方法が簡便であり、写真撮影を行う時間が十分に確保できたため、有用性があると考えられる。

【文献】

- 1) 新版 臨床免疫学 第3版:山田俊幸, 大戸齊, 渥美達也, 三宅幸子, 山内一由 : p.86-87,262、2016。
- 2) :宮原行雄, 浜口欣一, 藤井春男, 宍戸英雄, パラフェニレンジアミンによるFITC蛍光の退色防止効果、:病理と臨床 2 : 987-989、1984。