

間接蛍光抗体法における没食子酸プロピルの退色防止効果と有用性の検討

長谷川直緒¹⁾、石川日菜¹⁾、鈴木茜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などの自己免疫疾患で高い頻度で出現する。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で、核の染色型から対応する自己抗体を推測することが可能である。

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、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、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、長時間観察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。昨年度の卒業研究で退色防止封入剤として使用していたパラフェニレンジアミン(PPD)は、市販の封入剤と比較して退色を遅延することができ、退色防止封入剤として有用性が認められた。そこで私たちは、PPDの他に、退色防止効果のある封入剤を製作することはできないかと考え、食品の酸化防止剤に使用される没食子酸プロピル(PG)の退色防止効果やコストを比較し有用性を検討した。

【方法】PG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。また市販の封入剤、PG、PPDを添加し作製した封入剤のコストを比較し、有用性を検討する。

1. 試薬の調整

陰性検体は5倍に、その他は40倍に希釈する。PBSとグリセリンを1:9に混ぜた封入剤をベースとし、没食子酸プロピルを20mg/dL、30mg/dL、40mg/dLの濃度になるように添加し、4種類の封入剤を作成する。

2. 染色操作

抗核抗体検出キットはMBL社製を用いた。

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。 $p>0.05=*$ 、 $p>0.01=**$ 。

【結果】1. PG濃度別蛍光の経時変化

初めに、PGを各濃度に設定して、PG濃度による蛍光の経時変化を比較した。その結果、1分後に着目すると、PG無添加群は蛍光がほぼ認められなかった。

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、PG30mg/dL群、PG40mg/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

PGを各濃度で添加した場合の蛍光の減衰を陽性検体別に比較した。次に、検鏡5分後の斑紋型、セントロメア型の減衰率を検討した。どちらも均質型と同様、PG30mg/dL、40mg/dL添加することで蛍光の減衰を有意に抑制した。5分後の減衰率を比較すると、均質型ではPG無添加群は100%、PG30mg/dL群は67%、PG40mg/dL群は57%、となった。斑紋型ではPG無添加群は103%、PG30mg/dL群は73%、PG40mg/dL群は57%、となった。セントロメア型ではPG無添加群は101%、PG30mg/dL群は90%、PG40mg/dL群は62%、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。

4. PGとPPDの比較

次にPGとPPDの有用性を比較した。検鏡5分後の均質型、斑紋型、セントロメア型の陽性検体の減衰率を図4に示した。3つの陽性検体いずれでもPPDはPGに比べ、減衰率が低い傾向があったが有意な差は認められなかった。以上のことから、PGとPPDには減衰効果に差がないと示唆される。

5. コストの比較

1日あたりスライドを10枚使用し、1か月間検査を行うと仮定した。市販の25mL、14,000円の蛍光退色防止用封入剤を購入した場合と今回自作した封入剤を比べた。その結果、スライド1枚当たり140 μ Lを使用する場合、封入剤は月に2.8mL、1年では33.6mL使用する。1ヶ月使用した場合、PG30mg/dL添加封入剤では約0.9円、PG40mg/dL添加封入剤では約1.3円、市販の封入剤では、1,568円となった。1年使用した場合、PG30mg/dL添加封入剤では約10.8円、PG40mg/dL添加封入剤では約15.6円、市販の封入剤では、18,816円となった。以上のことから、1年間で比べると大きくコストが削減されると推測される。これは1/4のコストに抑えられると示唆できる。

【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った。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。PG30mg/dLを添加した群とPG40mg/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PG30mg/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、PG40mg/dL群の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、PG40mg/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】PG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。