

1. 寒冷凝集反応 (Peterson OL, et al : Science 97 : 167, 1943)

マイコプラズマ肺炎は**原発性非定型肺炎**の約 30%を占めるとされているが, Peterson らは, 本症の患者血清中に寒冷凝集素の出現することを見出し, これによってほかの型の肺炎と鑑別できることを報告した.

寒冷凝集素は自己免疫性溶血性貧血の一病型である**寒冷凝集素病** (CAD) に出現する冷式抗体で, 通常 IgM 抗体で**I または i 血液型特異性**を示す. マイコプラズマ感染や伝染性単核球症などの続発性 CAD では I, i 特異性の多クローン性 IgM 抗体が多く出現するが, 特発性 CAD の凝集素のほとんどは抗 I, IgM- κ 型の抗体である.

準備 ① **血清**: 血液約 5 mL をとり, インキュベータ内で凝固させて血清を分離する. 血液を分離するまで 20℃以上で操作することが必要である. 20℃以下では寒冷凝集素は自己の血球と結合し凝集素価が低下する. 血清は, 4℃前後の冷蔵庫に保存し, なるべく早く検査する (力価が漸次低下する).

② **血球浮遊液**: **O 型ヒト血液**または患者血液を抗凝固剤を加えて無菌的に採取し, 生理食塩水で 3 回洗う. 最後に 3,000 rpm, 5 分遠心し, 生理食塩水で 0.25%血球浮遊液をつくる.

実施 表 9-48 参照

判定 翌朝冷蔵庫から取り出し, 温まらないうちに試験管を軽く振って肉眼で観察し, 凝集の程度により次のように判定する. +の凝集を示す最高希釈倍数をもって凝集素価とする. **基本範囲**は 64 倍未満である.

4+: 赤血球が緊密に膜状に凝集するもの, 3+: 前者より凝集が幾分弱いもの, 2+: +より幾分強いもの, +: 細かい顆粒状に凝集するもの, -: 対照とまったく変わらないもの

臨床的意義 寒冷凝集素は**健康人血清**にも多少は認められる. 通常, 32~64 倍以上の凝集素価を示す場合は異常である.

マイコプラズマ肺炎での陽性率は重症例の 75~90%, 軽症例の 30%程度で, 寒冷凝集素価は発病第 1 週の終わりから第 2 週に現れ, 2~4 週で最高となり, 6 週ごろまでに低下

表 9-48 寒冷凝集反応の実施法										
試験管 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
血清希釈倍数	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	対照
生理食塩水 (mL)	0.75	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清 (mL)	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血球浮遊液 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
振とう混和し, 0~4℃氷室内に一晩おく										

表 9-49 マイクロプレート寒冷凝集反応の実施法								
試験管 No.	1	2	3	4	5	6	7	8
血清希釈倍数	×4	×8	×16	×32	×64	×128	×256	×512
緩衝液 (μL)	75	25	25	25	25	25	25	25
被検血清 (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25
血球浮遊液 (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25
50 μL 捨てる								

または消失するとされるから, 経過を追って抗体価の動きを観察する必要がある.

注意 ① 寒冷凝集反応は温度の影響を受けやすいため, 反応試験管をラックごと氷水に入れたバットに浸したまま氷室に置き, 判定時には氷水につけたまま各試験管を取り出し, 素早く判定するのがよい (藤岡, 他: 臨床検査 22 : 648, 1988).

② 反応陽性の場合, 37℃, 30 分加温して凝集が消えることを確かめる. もし消えなければ寒冷凝集素以外の抗体の存在を考えなければならない.

③ 寒冷凝集素は悪性リンパ腫, 自己免疫性溶血性貧血, レイノー症候群, 発作性寒冷色素尿症, 伝染性単核球症, 耳下腺炎性睾丸炎, 肝硬変, トリパノゾーマ症などでも認められるが, これらとマイコプラズマ肺炎との臨床的鑑別は困難ではない.

●**マイクロプレートによる寒冷凝集反応**

小児のように血清量の少ない検体の実施法にマイクロプレート法がある.

器具 マイクロプレート U 型, ダイリユータ (25 μL), ドロPPER (25 μL), トレイミキサー, 判定用ビュアー, ピペット

試薬 緩衝液: ゼラチンペロナル緩衝液 (ペロナルソーダ 0.75 g, ペロナル 1.15 g, NaCl 17.0 g, CaCl₂ 0.034 g, MgCl₂ 0.96 g, ゼラチン 3 g, 全量を 2 L)

血球浮遊液: 上述の緩衝液で O 型血球を洗浄後, 0.2%血球浮遊液を作製し, ウシアルブミンを 0.1%になるように加える.

実施 表 9-49 参照

判定 マイクロプレートを冷蔵庫の中でほぼ垂直に立て 10 分間放置する. 凝集のあるものはプレートの底に沈むが, 凝集のないものは, 彗星のように尾をひくので判別が可能である. **基準範囲**は 64 倍未満である.