

概言

人體防禦系統大略可分為兩類，一為 non-specific resistance，一為 specific immunity。當微生物第

# 血中 Immune Complex 的測定

一次侵入個體時，主要是靠 non-specific resistance，將之清除，包括

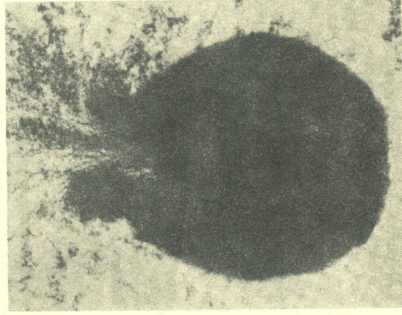
① Phagocytosis 由 neutrophil 及 macrophage 將微生物吞入並消化，

② inflammation 使血管遇透性增加，利於血液中 Phagocytes 抵達微生物入侵部位；以及③一些 humoral factors 如 lysozyme, properdin, B-lysin, 及 protamine 之 bactericidal effect 等。而當微生物侵入血行時，經過 macrophage 的 processing，再由 T lymphocyte 及 B lymphocyte 的作用，能產生抗體，但需時較長且量少，此為 primary immune，此時體內已有 immune lymphocyte 存在，當同樣的微生物再次侵入時，會產生 secondary immune response，而使 specific immunity 能力大為提高。首先可使 macrophage 活化，變成 Activated macrophage，使 Phagocytosis 功能大增，且可分泌一種 Lymphocyte activating Factor (Interleukin 1, IL1)，能促進 Lymphocyte 大量增殖。IL1 在 T helper cell 幫助 F，可使 B cell 產生大量的 specific immunoglobulin

Antibody Discovery",  
2, Scientific  
posium on Quantitative  
pp. 879-896, 1980.  
lobulin Heavy Chain  
286, pp. 657-659,  
J. C. Seidman et  
, pp. 11-17, 1978.  
recombination are  
ration of complete  
chain genes", H.  
Vol: 286, pp. 676-  
n of Antibody  
lliamson, Annual  
, Vol: 45, pp. 467-

(antibody), 而能與入侵物形成immune complex (Ag-Ab complex), 而增強 Phagocytosis。(因 Phagocyte 表面有 F. receptor, 可與 I<sub>g</sub> 的 F. portin 結合, 此即 opsonization), 另外補體也會附在 immune complex 上, 使吞噬作用更為增加 (phagocyte 表面亦有 C3 receptor, 故 Immune complex 內含有補體時, 易於附到 Phagocyte 上而被吞噬, 此為 immune adherence)。假如是 bacterial cell, 則補體附上後, 被活化而直接將此 cell 溶解, 且一些活化後的補體成份 (如 C3a, C5a) 具有 chemotaxis 性質, 能吸引 neutrophil 前來, 還可使 mast cell 放出 histamine, 增加血液通透性, 使更多的抗體及補體到達發炎部位, 此上即為 humoral immunity 作用的情形。另外, T cell 受到 IL1 的刺激後, 一些 T cell 可分泌出 T cell growth factor (interleukin 2, IL2), 它的功能是維持 T 及 B lymphocyte 的繼續增殖, 成熟, 一些則成熟為具毒殺能力的 cytotoxic T lymphocyte, 還有的 T cell 則分泌一些其他的 lymphokines (如 MIF, LAF 等), 作用在不同的 leukocyte, 並可促進 macrophage 的活化, 以上即為 cellular immunity 或是 cell mediated immunity 的作用情形。雖然為了便於敘述, 而將之分類, 實際上, 免疫力是整個現象的總和表現。譬如 ADCC (Antibody Dependent cell mediated cytotoxicity) 即高 humoral 及 cellular

immunity 共同參考與。而人體對於不同微生物的免疫力作用方式, 有不同的效果, 譬如對於能分泌 toxin 而造成 systemic acute infection 微生物, 則 humoral immunity 作用較好, 因 Ab 能迅速與之結合, 而中和毒素。而對於 Chronic disease, 如 TB, B, 則有賴於 cellular immunity 了。以上是人體對抗外侵物的防衛情形, 任一方面有缺失, 則易造成疾病, 倘個體完全喪失了免疫力, 必定無法生存。但在一些特殊的個體, 可能經過同樣的機轉, 所產生的免疫力, 不但對人體無益, 反而有害, 這種情形, 叫做過敏 (hypersensitivity)。過敏反應可分為 5 種類型, 由 immune complex 引起的過敏, 屬於其中一種 (Type III hypersensitivity)。本文將就各種測定 immune complex 的方法, 加以討論。另外, 體內如有 immune complex 存在, 那麼可經由血液循環而致在不同的組織器官, 導致過敏反應, 而造成 tissue damage, 這些是屬於 solid phase immune complex, 可由活體組織切



片 (biopsy) 作免疫螢光染色而測得。但此處所要介紹的是在血液中的 F. fluid phase circulating immune complex 的測定。

Immune complex 中的抗體成份可以是免疫球蛋白中的任一種, 所以不同的免疫球蛋白構成的 immune complex 就有不同的生理特性使表現出來的 immunity 就有不同。而 immune complex 中抗原的成份, 來源更為複雜, 可以是細菌, 病毒, 或是寄生蟲, 也可能是吃入的食物, 甚至是在體內的組織, 細胞被當作抗原 (autoantigens) 而造成自體免疫疾病 (autoimmune disease)。換言之, 任何外來異物侵入體內, 或體內自有的組織成份如與免疫球蛋白結合, 均可形成 immune complex。由於 Ag 與 Ab 的性質不同及兩者間結合比例的差異而形成不同 size 的 immune complex, 另外 immune complex 能與補體結合, 或再繼續發的與 rheumatoid factor, immunoglobulin 等特性, 均使其更為複雜。由於這些原因, 使測定的方法, 超過 30 種以上。這麼多的方法, 正表示沒有一種方法能完全測出各種類型的 immune complex 因此, 同時採用不同的方法, 對於 immune complex 的確定, 以及與其種特定疾病的相關性, 是非常必

Staphylococcus 在免疫反應之下凝聚

免疫螢光染色而測得  
的是在血液中屬於  
circulating immune

complex中的抗體成份  
中的任一種，所以  
由構成的 immune c-  
的生理特性便表現出  
有不同。而 imm-  
抗原的成份，來源更  
菌，病毒，或是寄  
入的食物，甚至是  
被當作抗原 ( auto-

成自體免疫病 ( auto-  
)。換言之，任何  
，或體內自有的組  
蛋白結合，均可形  
ex。由於 Ag 與 Ab  
間結合比例的差異  
immune complex  
omplex 能與補體結  
與 rheumatoid f-  
conglutinin 等特性  
。由於這些原因，  
過 30 種以上。這  
示沒有一種方法能  
的 immune com-  
採用不同的方法，  
plex 的確定，以及  
相關性，是非常必

在一些 Chronic allergic dise-  
ses (如 SLE, RA ) , immune c-  
的檢出率相當高，但僅測出  
有 immune complex，並不一定  
精確，因為在正常的懷孕婦女甚  
說了些些食物的正常人，也可能測  
，所以當 immune complex 的檢查  
時，還須和臨床症狀配合，才  
診斷病變是否由其肇成。

測定 immune comp'x 的原理如  
圖所示。(後詳)

由上表可知，依據 immune co-  
plex 不同的特性，而有不同的方法  
測定。以下將就這六類方法，詳加  
論。

### <1> Morphology

Ab 和 virus 形成的 immune c-  
plex，由 electron microscopy 可直  
觀察而且可知 Ag 的種類。方法是  
離心後的沉澱物，以 phosphotun-  
stic acid 作 negative stain，在暗  
顯下，可看到 virus 的構造，此法  
簡便，但一來 immune complex  
分子量龐大 ( $> 1 \times 10^6$  dalt-  
on)，再者要有複雜的立體結構，這  
限制了它的使用範圍，目前只應用  
於研究範圍。血清中 B 型肝炎病毒所  
形成的抗原體複合物 ( HBV - Imm-  
complex ) 可以此法鑑定。除了

EM 能直接觀察 morphology 而得知  
抗原外，其他的方法，均屬排異性  
，並且檢體內如有 aggregated imm-  
unoglobulin 時，會造成 False po-  
sitive，故除非在 immune comple-  
x 內的 Ag 被鑑定出，只能稱為 "p-  
resumed immune complex"。

### <2> size separation

利用 ultracentrifugation 或 gel  
chromatography 來分離不同的 i-  
mmune complex 是常用的初步分離  
方法，但還須進一步做免疫化學分析  
。Sucrose density gradient ultra-  
centrifugation 是目前測定 IgE C-  
omplex 的唯一方法。取過敏病患者的  
血液，經超高速離心後，分離 "he-  
avy fraction" 部份，即可得到 Ag  
- IgE Complex，另外，如以 gel  
chromatography 來分離時，則將血  
清加入含 gel 的圓柱中，以補體溶液  
(C3) 緩慢沖洗，然後測定洗出液，  
如洗出液沒有補體，表示已與血清中  
的 immune complex 結合，即為 po-  
sitive。反之，則表示血清內沒有 i-  
mmune complex，此為間接測定的  
方法。但此法的缺點是並非所有的補  
體均能結合上 immune complex 所以  
會有假性結果出現。而且在分離過程  
中，Ag 與 Ab 之間的關係，不可避  
免的會有改變，故可能使原有的 im-  
mune complex 破壞，造成 False n-

egative，或是形成人為的 immu-  
ne complex 而變為 False positive，  
這是主要的缺點。

### <3> Physicochemical reaction

① 沉澱法 ( Cryoprecipit-  
ation ) :

有一些 immune complex 在 4°C  
時會沉澱，但於 37°C 時又再溶解，  
所以可利用這種特性來分離。此為最  
簡便的方法，但費時較久，且採血量  
多 (約 20 - 50 me ) 為其缺點。作  
法是抽血後，立即置於 37°C 溫箱中  
，使其 clot，並於 37 C 離心機內離  
心以分出血清，如此可保持 cryopr-  
ecipitate 於溶液狀態。然後將血清  
4°C 冰箱中，連續觀察七天，如有沉  
澱物產生，助為 positive，但其他蛋  
白質如 fibrinogen，及 multiple m-  
yeloma 患者血中大量的 monoclon-  
al immunoglobulin，也會在低溫沉  
澱，所以還須進一步純化並作免疫化  
學分析，加以區別。

② Polyethylene glycol 沉澱法  
Polyethylene glycol (MN 6000  
) 為中性水溶性聚合物，能使溶液中  
的蛋白質沉澱下來。它的作用機轉仍  
未明瞭，可能是由於 protein 表面上  
的 Solvent exclusion 的作用或是 P-  
rotein 與此聚合物結合而導致 Prot-  
ein surface charge 的改變，使溶解  
度降低之故。分子量愈大的蛋白質，

沉澱的速率也愈大，而分子量較小，構造較簡單的蛋白質如 monomeric  $I_g G$ ，則需要濃度較高的 PEG。故通常採用 2~3% 的濃度，使沉澱物儘量不含 monomeric  $I_g G$ 。此外，低溫會使沉澱物增加，且補體亦沉澱亦有關連，故如將血清加熱處理，以去除補體活性時，沉澱量減少。常用 PEG borate buffer (PH8.4)，將血清稀釋 20 倍，然後置於冰箱過夜，使其沉澱，再以 cold buffer 離心清洗，洗去其餘 Protein，調回中性 PH，再分析其內容物及 Protein 含量。此法也為常用方法之一，且不必大量抽血，但在 hypergammaglobulinemia 的病人，可能會造成偽陽性，因為大量的免疫球蛋白易於沉澱之故。不過如在沉澱過程中，另外加入經 radioactive isotope 記的  $C_{1g}$ ，bovine conglutinin 或 monoclonal rheumatoid factor，會使得特性大增。

#### <4> Complement binding

利用補體與 immune complex 用的特性來測定方法，包括 anti complementary method 及 bovine conglutinin method。前兩種方法是經由 classical complement pathway 與 immune complex 中  $I_g M$  或  $I_g G$  ( $I_g G_1, I_g G_2$ ) 上的 FC receptor 結合，而後者則可經由 classical

或 alternative complement pathway 與 immune complex 中的  $C_3b_1$  (activated  $C_3$ ) 作用。

#### ① anticomplementary method

此法是将血清以  $56^{\circ}C$ ，30 分鐘加熱處理，去除本身的補體活性，再加入已知量的補體，如血清中有 immune complex，則會與之結合，而消耗補體，最後加入 Ab coated sheep red cells 當作 indicator cell 作用一般時間後，以光電比色計，可知道 indicator cell 被破壞的情形。溶血能力愈低，表示補體破壞的愈多，也就表示血清中 immune complex 的含量愈高。但此法的缺點，是在加熱過程中，可能使 monomeric  $I_g G$  變成 aggregated  $I_g G$  造成 False positive 而有些 immune complex 則可能被破壞，造成 False negative，故而限制此法的廣泛應用。

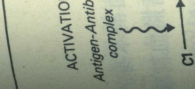
#### ② $C_{1q}$ binding :

使用單向免疫擴散法 (Single radial immunodiffusion method) 是 pure  $C_{1q}$  混入 agarose gel 中，倒入 plate 使其凝固，然後挖洞，加入血清，如有 immune complex，會與 gel 中的  $C_{1q}$  作用，形成沉澱環。此法雖操作簡單，但敏感度很差。不過，從此法開始應用以來，各種利用與  $C_{1q}$  結合的直接方法，

或是抑制與  $C_{1g}$  結合的間接測定，相繼而出。這些方法均需將血清事先處理，以避免加入的  $C_{1g}$  變成  $C_{1q}$  complex ( $C_{1g}$ rs)，而干擾測定。以前是以加熱法除去血清中的補體活性，但容易形成 aggregated  $I_g$ s，而造成 False positive。現多採用在 buffer 中加入 EDTA 的方法，EDTA 為 chelating agent 能與西價陽離子結合，而將之去除。在  $C_{1g}$  變成  $C_{1q}$  complex 的過程，需要  $Ca^{++}$  的參與，以 EDTA 除去  $Ca^{++}$  即可避免形成  $C_{1q}$  complex。此法雖可避免加熱造成的 False positive 但血清中原有的 free  $C_{1q}$  會與加入的  $C_{1q}^{1,125}$  競爭 immune complex 結合，故 sensitivity 仍然不高。

#### a. PEG 與 $C_{1q}$ binding 兩種方法合併使用

此法可測出  $I_g M$  及  $I_g G$  complex 且分子量愈大，愈易測出，先將血清加 0.2M EDTA, PH7.6 的溶液中，於  $37^{\circ}C$  溫箱 30 分鐘，然後加入定量的  $C_{1q}^{1,125}$  及 3% PEG, PH8.6 之 borate buffer 使之沉澱，將此混合物在  $4^{\circ}C$  下靜置 1 hr 後，於  $4^{\circ}$  下離心，倒掉上清液，將 PRP (Immune complex -  $C_{1q}^{1,125}$ ) 在 gamma counter 中算出放射量 (counts per minute, cpm)。另外將 control tube (除未加血清外，其他步驟均與 test tube 相同) 作 trichloroacetic acid 將  $C_{1q}^{1,125}$  完全沉澱，以得到的 cpm 當作 100%，即可求得 test tube 的百分比，即已知濃度的標準液的放射量相比，即

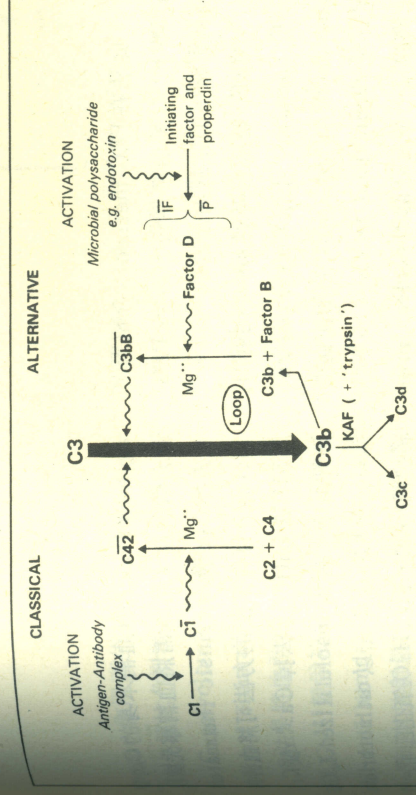


immune complex  
b. Solid  
首先將  $C_{1q}$   
tube 或 plate  
二次 wash 後  
albumin 125, 作  
置於 gamma  
即得如操  
與 human  
1% gelatin  
再次與之  
specific  
Anti-  
Protein A 來  
staphylococ  
物質在體  
結合  
)，不過  
及 1,6,4 的  
有一種方法

合的間接測定，相  
需將血清先處理  
g 變成 C1 comp-  
而干擾測定。以前  
清中的補體活性，  
activated I<sub>g</sub>s，而造  
。現多採用在 buf-  
的方法，EDTA 為  
能與西價陽離子結  
在 C<sub>1</sub>g 變成 C<sub>1</sub> co-  
要 Ca<sup>2+</sup> 的參與，故  
即可避免形成 C<sub>1</sub> c-  
避免因加熱造成的  
血清中原有的 free  
-1,125 競爭與 i-  
結合，故 sensiti-

iq binding 兩種方

M 及 I<sub>g</sub>G comple  
大，愈易測出，先  
EDTA，PH7.6 的  
溫箱 30 分鐘，然  
125 及 3% PEG，  
buffer 使之沉澱  
eC 下靜置 1 hr 後  
倒掉上清液，將  
complex - C<sub>1</sub>q 125  
ter 中算出放射量  
ute, cpm)。另  
(除未加血清外，  
tube 相同)，<sup>125</sup>ws  
cid 將 C<sub>1</sub>q  
cpm 當作 100%，  
e 的百分比，再和  
的放射量相比，即



和 immune complex 的濃度。

b、Solid - phase C<sub>1</sub>q as-

say:

首先將 C<sub>1</sub>q 溶液附著於 polysty  
rene tube 或 Flexible microtitre  
plate 等 solid material 上，然後將  
以 EDTA buffer 稀釋，如血清中  
有 immune complex 存在，即加入些  
tube 或 plate 內時，會粘附上去，  
是二次 wash 後，再加入 Anti - g-  
lobulin 125，作用一段時間並 wash  
後，置於 gamma counter 中算出  
cpm 即得如操作此法前，先將 c<sub>1</sub>q  
tube 與 human serum albumin 或是  
是 1% gelatin 作用，則可減少此類  
物質再次與之結合，故能減少 no-  
n-specific binding 而提高此法  
的 specificity，假如放射性同位素  
不標記 Anti - globulin，也可標記  
protein A 來測定 (protein A 是  
Staphylococcus aureus 所分泌的  
一種物質在體內能與 I<sub>g</sub> G 上的 Fc  
site 結合，而干擾 phagocytos-  
is)，不過只能測出 I<sub>g</sub> G<sub>1</sub>, I<sub>g</sub> G<sub>2</sub>  
及 I<sub>g</sub> G<sub>4</sub> 的 immune complex  
有一種方法是將 Anti - globulin

conglutinin 是一種與 I<sub>g</sub> 無關的  
蛋白質，具有和 C<sub>3</sub> b<sub>1</sub> 反應的特性 (C  
C<sub>3</sub> b<sub>1</sub> 是 activated C<sub>3</sub> 中穩定的部份  
)。此 protein 很容易由牛的血清中  
分離。此法與 C<sub>1</sub>g solid phase test  
原理相同，只是附於管壁的是 conglu-  
tutin，而非 C<sub>1</sub>g。它與 C<sub>1</sub>g binding  
method 僅有的差別是需要 Ca<sup>2+</sup> 參與  
，所以不能使用 EDTA buffer，也因  
這個性質，使它成爲分離 immune  
complex 的優良方法。先是將血清與  
管中的 conglutinin 結合，再加入 E-  
DTA buffer，除去 Ca<sup>2+</sup>，而使 im-  
mune complex 與之分離。或者將 c-  
onglutinin 與 I<sub>125</sub> 結合，再與血清  
作用，最後加入 PEG buffer 使之沉  
澱，再測定其放射量。由於 congluti-  
nin 僅能與 C<sub>3</sub> b<sub>1</sub> 結合，故由其測出  
的 immune complex，必定已含有此  
種 activated complement，另外 C<sub>3</sub> b  
及 C<sub>3</sub> b 嵌入 immune complex 中，可  
使與細胞膜結合的 immune complex  
脫離，所以此法也許僅是測定由 solid  
phase 的 immune complex 轉成 Flu-  
ise phad 的 immune complex 的方法  
。

與 enzyme 結合，再

加入能和此 enzyme 作用的基質液，  
過程和上述方法相同。不過，最後的  
結果是由 enzyme 與 substrate 作用  
產生顏色變化，而以光電比色計來測  
得。此法稱爲 ELISA (enzyme L-  
inked immunosorbent assay) 其  
sensitivity 類似 RIA (radio i-  
mmunoassay)，但其安全性，穩定  
性及保存期限較長，不需昂貴的計數  
器等特點，均較 RIA 爲優。

C、C<sub>1</sub>q deviation:

這是利用 Ab coated sheep  
Rbc 與血清一起競爭與 C<sub>1</sub>g 125 結合  
，而推定血清中有無 immune comp-  
lex 的方法。將此混合物作用一段時  
間，然後倒入 40% sucrose soluti-  
ion 離心，如血清中 immune com-  
plex 含量很多，則附在 Rbc 上的 C<sub>1</sub>g  
125 相對減少，反之則管底 Rbc 上的  
C<sub>1</sub>g 125 就很多，也可用 I<sub>g</sub> G seph-  
aros 來替代 Rbc，原理及步驟完全  
一樣。

### <5> Antigllobulin binding

① Monoclonal rheumatoid fa-  
ctor binding

③ conglutinin binding:

Rheumatoid factor 爲一 macroglobulin (通常爲 19S)，但它具有和其他 Famma - globulin 結合的特性。在一些罹患 Lymphoproliferative disease 病人的體內，常可出現 monoclonal rheumatoid factor，雖然不同病人，其特异性不同，但通常均與 I<sub>g</sub>G 結合。

a. Solid phase monoclonal rheumatoid factor inhibition method:

是把 MRF 與 microcrystalline cellulose 結合，當作 solid phase，然後將血清與 heat - aggregated I<sub>g</sub>G<sup>125</sup> 加入與之作用，如血清中 immune complex 含量愈多，則 MRF - cellulose 與 heat - aggregated I<sub>g</sub>G<sup>125</sup> 結合愈少，可以離心後，測定沉澱物的放射量即知。

b. The inhibition of radiolabelled MRF binding to I<sub>g</sub>G sepharose, 此法以上述類似，只是將 MRF 與 isotope 結合，而把 I<sub>g</sub>G 與 sepharose 結合作爲 solid phase。判讀亦與上法相同。

c. polyethylene glycol precipitation of radiolabelled MRF。無法與隨後加入的 I<sub>g</sub>G latex 形成

此法在 PEG method 已介紹過，將 MRF<sup>11,25</sup> 與血清作用，再將 PEG 使其沉澱，測定放射量即知。

MRF 通常是測定 size 較小的 I<sub>g</sub>G complex，不像 Polyclonal rheumatoid factor (PRF)，即使血清原就是 rheumatoid factor，也不會干擾測定，但它可能與 nuclear protein 作用，而造成 False positive，此外，因爲它與 aggregated or complex I<sub>g</sub>G 結合較強，所以比 PRF 容易與 monomeric I<sub>g</sub>G 作用，False positive 機會較大，雖可以稀釋血清來避免，但如爲 hypergammaglobulin 病人的血清，仍會有偽陽性。並且，MRF 的來源較少，這也限制了它的廣泛使用。

② polyclonal rheumatoid factor binding

本法所用的 polyclonal rheumatoid factor (PRF) 是由 rheumatoid Arthritis 病人而來的 I<sub>g</sub>M Ab，雖然來源較多，但由不同病人而來的 PRF，其結合的特異性及區別 complexed I<sub>g</sub>G 與 monomeric I<sub>g</sub>G 有很大的差異。主要是和 I<sub>g</sub>G 結合，但也有一些是與 I<sub>g</sub>A 結合。

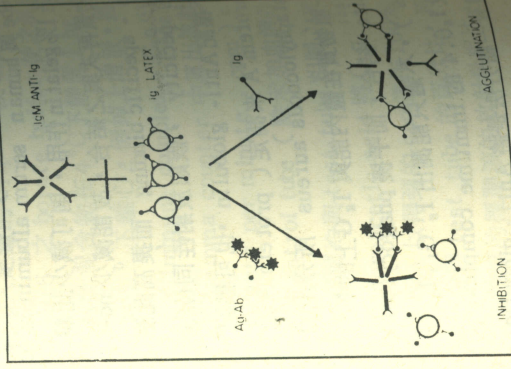
a. latex agglutination inhibition:

將血清與 PRF 作用，如有 immune complex，則 PRF 與之作用，而無法與隨後加入的 I<sub>g</sub>G latex 形成

agglutination。但血清本身的 C<sub>1</sub>q 會造成偽陽性，所以需將血清事先處理，去掉 C<sub>1</sub>q 及 intrinsic rheumatoid factor 才可。去除的方法可將血清加入 EDTA buffer，去掉 Ca<sup>2+</sup>，使 C<sub>1</sub>q 游離出來，再以 insolubilized I<sub>g</sub>G 去掉 C<sub>1</sub>q 及 RF，或者先以 dithiothreitol 將血清還原，再以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化即可。但若 immune complex 再發的與血清中 intrinsic rheumatoid factor 結合，則也會被上述過程所除去，而造成 false negative。

b. solid phase polyclonal rheumatoid factor binding:

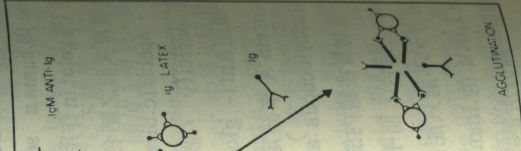
將 PRF 先與 solid matrix 結合，再與血清作用，如有 immune complex，則被吸附上，再加入 radiolabelled anti globulin，離心後，則沉澱的 solid matrix 所含之放射量即可。如以 enzyme 標記 anti globulin 亦同，只是最後加入 substrate，使與



血清本身的 C<sub>1</sub>q 會將血清事先處理成 rheumatoid factor 的方法可將血清加上去掉 Ca<sup>++</sup>，使 C<sub>1</sub>q 溶化，使 I<sub>2</sub> 氧化即可。但再繼續的與血清 factor 結合，而造

polyclonal rh binding:

id matrix 結合，有 immune complex 再加入 radiolabelled antigen，離心後，則沉澱之放射量即可已 antizlobulin 亦 substrate，使與



enzyme 作用產生 color reaction，所以不必担心因 aggregated protein 造成的 false positive。

C. polyclonal rheumatoid factor radioimmunoassay:

此法是将血清與 heat aggregated I<sub>2</sub>G 競爭被 PRF 結合，再以 rabbit anti human I<sub>2</sub>M 把 PRF 沉澱下來，測定其放射量，愈少則表示血清中 immune complex 愈多。

### ③ I<sub>2</sub>M antibody binding:

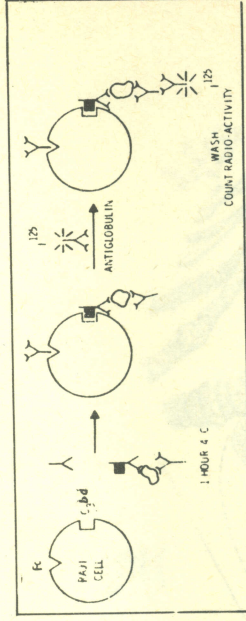
原理與 rheumatoid factor binding test 相同，只是它由人工製造，將 purified protein 加上 Freund's adjuvant，打入動物體內，經過 9~10 天後，再作 sephadex G200 chromatography 即可得到很純的 I<sub>2</sub>M reagent。作法是將 I<sub>2</sub>M Anti I<sub>2</sub> 與 latex 結合，再和血清作用，可直接觀察有凝集，即為陽性，也可作 inhibition test 無凝集則為陽性，此法較敏感，作用原理如附圖。

此法所用的材料，來源一定，特異性一致，為一較理想的方法，但其性質較不安定，不耐久存，為其缺點。

### ④ Anti - antibody:

這種 reagent 較為少見，主要來自於人體內，為天然的 I<sub>2</sub>M Ab，當 I<sub>2</sub>G 與 Ag 結合後，會使立體結構改變，此時 Anti - Ab 就可與 I<sub>2</sub>G 上的 Fab 結合。Anti - Ab 僅能與 Ag - Ab complex 作用，而不會與 aggregated pr-

Inhibition of Ig-coated latex agglutination by IgM anti-Ig reagents.



otein 結合，所以不必担心因 aggregated protein 造成的 false positive。 (將血清加熱去補體，或是將血清冷凍，解凍數次均易形成 aggregated protein)。作法是將 I<sub>2</sub>G (抗 Rbc 抗體) 與 Rbc 結合，當作 indicator cell，如血清有 immune complex 則會抑制 Anti-Ab 與 indicator cell 凝集。或者將 Anti-Ab 與 latex 結合，直接測定血中有無 immune complex，若有，則會形成 agglutination。

此圖相當理想，但缺點是 reagent 非常稀少，不易取得，而且無法進一步鑑定 immune complex 的特性。

## <6> Cell receptor binding

Raji cell binding:

Raji cells 是 human lymphoblastoid cells 由 Burkitt's lymphoma 病人體內取得，能於試管中，一直培養下去，而形成 cell line，它和一般的 B lymphocyte 不同的是表面缺乏 Ig，但有 receptors 能與 I<sub>2</sub>-Fc、C<sub>3</sub>b 及 C<sub>3</sub>b 作用；與 C<sub>3</sub>b 及 C<sub>3</sub>d 結合的能力比 I<sub>2</sub>G-Fc 約強 8 倍，所以 Raji cell 主要是和 immune complex 中的補體成份結合。最早是使用螢光染料與 anti-I<sub>2</sub> 結合，所以只能在螢光顯微鏡下，觀察有無螢光來推定有無 immune complex，無法定量，以後改

探 RIA 法，將血清與 Raji cell 作用，再以 radiolabelled Anti I<sub>2</sub>G 與之結合，離心沉澱後，取出算其放射量，即可定量，如附圖。

此法相當普遍應用於測定含補體的 immune complex 且易於鑑定 immune complex 中抗體的種類，因為 Raji cell 是來自人體的 lymphocyte，所以體內如有 anti-lymphocyte anti body 會與之作用而形成 false positive，不過因為此反應需在 37°C 下進行，故可以在 4°C 下進行測定而得以避免。

其他方法包括 platelet aggregation, inhibition of aggregated I<sub>2</sub>G uptake by guinea-pig macrophages, inhibition of antibody dependent cell mediated cytotoxicity, inhibition of neutrophil bactericidal activity, phagocytosis of immune complexes by neutrophils demonstrated by immunofluorescence 等在此就不一一介紹。以上這些方法均是利用活體細胞來操作，非常難以標準化，而使得再現性 (reproducibility) 很難令人滿意。

(Immune complex standard)

：必要和標準液比較，才能知道欲測血清 immune complex 的含量，但目前還沒有一種適合所有 immune complex 測定的標準液，所以不同的分析方法，師要有不同的標準液，其中最常用的是 heat aggregated I<sub>2</sub>G，

它的好處是容易製備，不過安定性較差為其缺點。但若在冷凍保存以前（ $-70^{\circ}\text{C}$ ）先加入一些蛋白質如 *Albumin*，則可提高其安定性。而且，加熱後形成的 aggregated  $\text{I}_g\text{G}$ ，size 差異很大，所以必需經過 ultracentrifugation 來選取 size 一致的凝集物，而使再現性 (reproducibility) 提高。另外，可採取檢查結果為陽性的病人血清，分製保存於  $-70^{\circ}\text{C}$ ，可作為 positive control serum。而實驗室製備的 Ag-Ab complex，如 (tetanus toxoid - anti tetanus Ab complex) 也可作為 standard。

檢體採集及貯存：

採取血液後要在  $37^{\circ}\text{C}$  使其凝固，以避免一些 immune complex 沉澱 (有些 cryoprecipitate 在室溫中即開始沉澱)，並且分製後於  $-70^{\circ}\text{C}$  貯存。

結語：

截至目前為止，還沒有一種測定 immune complex 的方法，能完全令人滿意，所以必需同時採用多種方法來作，以免漏失，並且最好針對不同疾病而採取不同方法，譬如 SLE 病人以 Raji cell 測定，效果最好，而 RA 病人則以  $\text{C}_{1g}$  binding method 較優。將來努力的目標，是採用更穩定的 reagent，並且使用更簡單，迅速的方法 (如 nephelometric reaction) 來測定並分析 immune complex。

Principles of immune complex detection.

Morphology:	Electron microscopy
Size separation	Ultracentrifugation
Physicochemical	Gel chromatography
Complement binding	Cryoprecipitation
	Polyethylene glycol precipitation
	Anticomplementary activity
Antiglobulin binding	$\text{C}_{1q}$
	Conglutinin
	Monoclonal rheumatoid factor
	Polyclonal rheumatoid factor
Cell receptor binding	IgM antibodies
	Anti-antibody
	Raji cells (IgG-Fc C3b C1q)
	Macrophages (IgG-Fc and C3b)
	B lymphocytes (IgG-Fc and C3b)
	K cells (IgG-Fc)
	Platelets (IgG-Fc)

References : ① Methods of detecting circulating immune complex  
 PP398-413, R. J. LEVINSKY, clinical Aspects of Immunology 4th Edition, 1982.

② Essential Immunology IVAN M. ROIT 2nd Edition  
 ③ Clinical serology CLOIS W BENNETT.

④ H. Hugh Fandenberg et al. Basic and clinical immunology, 1976.