

Immunolectrosyneresis 法による抗DNA抗体の検索

山田, 巖

澤江, 義郎

<https://doi.org/10.15017/114>

出版情報 : 九州大学医療技術短期大学部紀要. 7, pp.39-43, 1980-03-25. 九州大学医療技術短期大学部
バージョン :
権利関係 :

Immunolectrosyneresis法による抗DNA抗体の検索

山田巖、沢江義郎

Detection of Anti-DNA Antibodies by Immunolectrosyneresis

Iwao Yamada and Yoshiro Sawae

はじめに

近年、抗核抗体 (ANF) の検索は、全身性エリテマトーデス (SLE) の診断のために必要欠くことのできないものとなり、ルーチンワークとして普及してきている。しかも、難病としての SLE は、日常診療の上でもしばしば経験されるものとなっている。

われわれは過去に各種の検査方法を用いて、ANF、抗 DNA 抗体、抗 RNA 抗体の検出を試みてきた。¹⁰⁾¹¹⁾しかし、今日の臨床検査室では特異性、鋭敏度ともに良好で、しかも技術的に簡単で、短時間に多数の検体を処理可能な方法の出現が望まれる。

そこで、われわれはこれらの条件にかなう検査方法として Immunolectrosyneresis 法 (IES 法) に着目し、native DNA (n DNA) 抗原と denatured DNA (d DNA) 抗原を用いて抗 DNA 抗体の検出を試み、体内での Immune Complex 形成に関連していると思われる補体結合抗体の検出法 (CF 法) と比較することにより、その有用性について検討したので報告する。

対象および方法

九州大学医学部附属病院検査部に ANF 検査のため提出された 62 症例、75 検体を用いた。すなわち、SLE 45 症例、52 検体、SLE 以外の疾患群 17 症例、23 検体で、すべて ANF 陽性の血清であった。SLE 以外の疾患群は表 2 に示すような疾患であった。

性別では大部分が女性で、SLE では 20 才

表 1 実験対象の疾患別、性別、年齢別分布 (62例)

年 令	性 別		SLE 以外の疾患群	
	♂	♀	♀	♀
10 ~ 15		1		
16 ~ 19		2		1
20 ~ 25	2	8		3
26 ~ 29		6		1
30 ~ 35		9		
36 ~ 39		3		
40 ~ 45		7		2
46 ~ 49		2	1	1
50 ~ 55		3	1	
56 ~ 59				1
60 ~ 65		1	2	3
66 ~ 69				1
70 ~ 75		1		
計	2	43	4	13

表 2 SLE 以外の疾患群 (17例)

リウマチ様関節炎	2例
シェーグレン症候群	2例
甲状腺疾患	1例
皮膚筋炎	1例
ルポイド肝炎	2例
腎疾患	3例
悪性リンパ腫	2例
不明熱	1例
その他	3例

から 39 才の青壮年層が過半数を占め、SLE 以外の疾患群では 40 才以上の高年層が多かった。

ANF:LE 蛍光スライドキット (和光) を用い、8 倍からの被検血清の希釈列をつくり、抗体価を測定した。

CF 法: Kolmer の少量法にしたがい³⁾、マイクロタイター法にて実施した。DNA 抗原は生理食塩水に仔牛胸腺由来の DNA (Sigma 製) を、10mg/dl の割合に溶解したものを nDNA 抗原として用いた。さらにこの nDNA 抗原液を 100°C で 10 分間煮沸後、氷水中で急冷したものを dDNA 抗原として用いた⁹⁾。

IES 法: 本問らの方法を改良した方法で実施した。すなわち、バルビタール緩衝液 (pH 8.6 イオン強度 0.06) に 1% の割合に溶解したアガロースで寒天板を作成した。

本問らの方法では直径 3mm の穴を 30mm の間隔であけると述べているが、著者らは直径 3mm の穴を 7mm の間隔にあけた。陽極側の穴に被検血清を、陰極側の穴に nDNA、dDNA 抗原液をみだし、2mA/cm の定電流で 60 分間通電後、沈降線の有無を観察した。さらに陽性例については被検血清を希釈して抗体価を測定した。

補体価 (CH50): Mayer の 50% 溶血法⁵⁾ に従い、1/2.5 量法にて測定した。

成 績

1) SLE における IES 法による抗 DNA 価と ANF 価 (図 1)

IES 法による抗 dDNA 抗体は SLE 45 例中 23 例 (51.1%) と高率に認められ、その抗体価は 1~4 倍で、半数は 1 倍であった。しかし、ANF 価が 128 倍以上の症例では、18 例中 17 例 (94.4%) と高頻度に検出され、しかも 11 例 (61.1%) では抗体価が 2 倍以上であった。

抗 nDNA 抗体の出現頻度は SLE 45 例中 12 例 (26.7%) と低く、抗体価もすべて 1 倍と低値であった。これら 12 例中の 11 例 (91.1%) の ANF 価は 128 倍以上であ

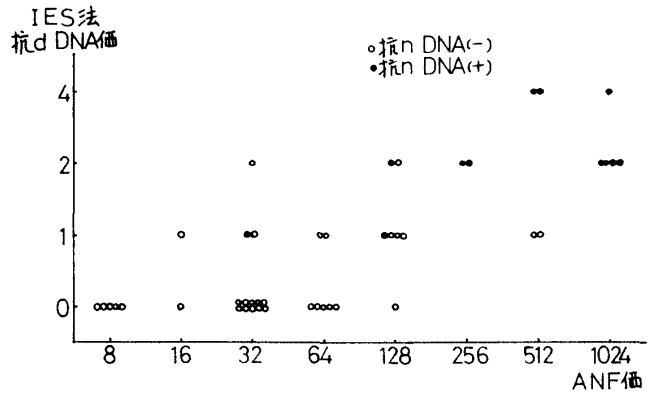


図 1 SLE における IES 法による抗 DNA 価と ANF 価の相関

た。抗 dDNA 抗体の方が、抗 nDNA 抗体よりも約 2 倍陽性であった。

2) SLE 以外の疾患群における IES 法による抗 DNA 価と ANF 価 (図 2)

SLE 以外の疾患群 17 例では、ルポイド肝炎とシェーグレン症候群の各々 1 例と、腎疾患の 2 例の計 4 例 (23.6%) に、抗 dDNA 抗体価の 1 倍陽性がみられたが、抗 nDNA 抗体は検出されなかった。しかも、ANF 価とよく関係は認められなかった。

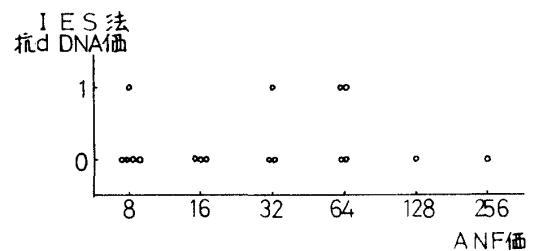


図 2 SLE 以外の疾患群における IES 法による抗 DNA 価と ANF 価

3) SLE における IES 法と CF 法による抗 DNA 価 (図 3)

SLE の 45 例中 26 例 (57.8%) は抗 dDNA の CF 価が 4 倍以上で、そのうちの 23 例 (88.5%) は IES 法による抗 dDNA 抗体も陽性で、しかも 12 例 (52.2%) は抗体価が 2 倍以上であった。しかし、CF 価が 8 倍の 2 例と 4 倍の 1 例が IES 法では陰性であった。

抗 nDNA 抗体は抗 dDNA 抗体価が IES 法で 1 倍以上、CF 価が 8 倍以上の 23 例中 12 例 (52.2%) に検出され、抗 dDNA 抗体価

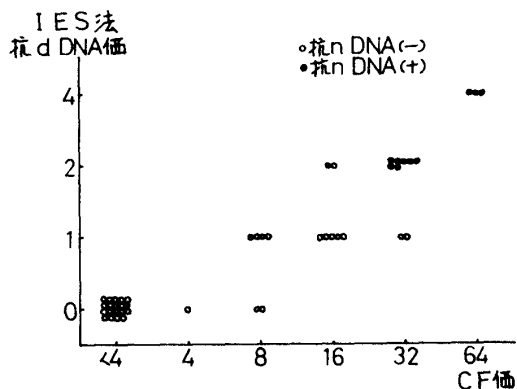


図3 SLEにおけるIES法とCF法による抗DNA価の相関の上昇にともない抗nDNA抗体の存在がみられた。また、抗dDNA抗体が陰性で、抗nDNA抗体が陽性のものはみられなかった。
4) IES法とCF法による抗nDNA抗体価(図4)

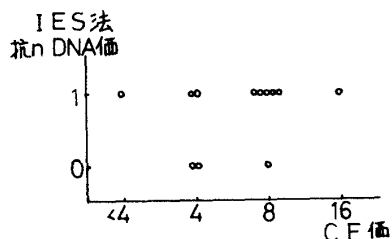


図4 SLE12例におけるIES法とCF法による抗nDNA抗体価

CF法が陽性にもかかわらず、IES法が陰性となった症例は12例中3例(25.0%)、逆にIES法が陽性にもかかわらず、CF法が陰性であった症例は1例(8.3%)で、計4例(33.3%)が両反応の間に関連性がみられなかった。

5) SLE以外の疾患群におけるIES法とCF法による抗DNA価(図5)

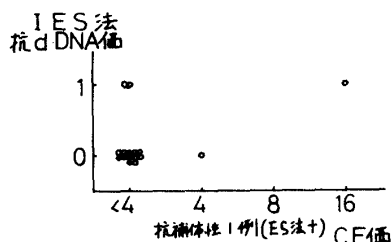


図5 SLE以外の疾患群におけるIES法とCF法による抗DNA価

SLE以外の疾患群ではCF価が4倍以上の2例のうち、ルポイド肝炎の1例がIES法で陽性となり、またCF価が4倍以下にもかかわらず、IES法で陽性を示した症例がシェーグレン症候群と腎疾患で1例ずつ認められた。

6) IES法とCF法による抗DNA抗体の検出率(表3)

表3 IES法とCF法による抗DNA抗体の検出率

検査方法		SLE				計	
		CF法		計			
		+	-	+	-	nDNA	dDNA
I	+	nDNA 8 (17.8)	dDNA 0	nDNA 1 (2.2)	dDNA 0	9 (20.0)	0
	-	dDNA 0	23 (51.1)	0	0	0	23 (51.1)
E	+	nDNA 3 (6.7)	0	nDNA 33 (73.3)	dDNA 0	36 (80.0)	0
	-	dDNA 0	3 (6.7)	0	19 (42.2)	0	22 (48.9)
S	+	nDNA 11 (24.5)	0	nDNA 34 (75.5)	dDNA 0	45 (100)	0
	-	dDNA 0	26 (57.8)	0	19 (42.2)	0	45 (100)

検査方法		SLE以外の疾患群			計	
		+	-	抗補体性(%)		
		I	+	1 (5.9)	2 (11.8)	1 (5.9)
E	-	1 (5.9)	12 (70.5)	0	13 (76.4)	
S	計	2 (11.8)	14 (82.3)	1 (5.9)	17 (100)	

抗dDNA抗体の検出率は、IES法が51.1%、CF法が57.8%であった。抗nDNA抗体の検出率は、IES法が20.0%、CF法が24.5%で、抗dDNA抗体陽性症例の約25%に検出された。

SLEの場合、IES法とCF法の検出率には有意の差は認められなかった。SLE以外の疾患群の場合、抗補体性の1例を除き、IES法陽性でCF法陰性の2例、CF法陽性でIES法陰性の1例に両反応の結果の不一致がみられた。

7) SLEにおけるIES法による抗DNA抗体価とCH50(図6)

抗dDNA抗体価が1倍以上の症例では、CH50が35以下であり、とくにCH50が30以下の症例では抗dDNA抗体価が2倍以上

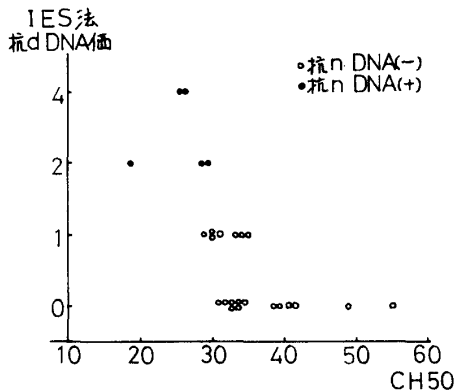


図6 SLE25例におけるIES法による抗DNA抗体価とCH50

のものが多くみられ、しかも抗nDNA抗体も検出された。また、これらはCF法による抗dDNA、抗nDNA抗体も検出されていた。

考 察

SLEの活動性の血清学的診断法として、抗DNA抗体の検出が有意義であるとされている。とくに補体結合性の抗体については、その病因的意義も明らかであると考えられる。

ここでは、手技の簡便性という面からIES法による抗DNA抗体価の測定を行い、CF法によるものと対比を試みた。その際、抗原としてnative DNAとdenatured DNAを用いた。

抗dDNA抗体はSLEの場合IES法で51.1%に、CF法で57.8%に検出され、奥田のOuchterlony法では7.7%ないし8.6%、CF法では22.9%ないし30.8%、KusabaらのIES法では25.4%、CF法では49.0%に比べると、著者らの成績がもっとも高率であった。しかも両反応の成績には他の報告にみられたような著明な差はみられなかった。

検出率については、SLEの活動性との関連があり、未治療の時期には陽性率が高くなっており、必ずしも一概に判断できないと考えられる。いずれにしてもIES法による方法の方が、やや陽性率が劣ると考えられる。

抗nDNA抗体はIES法では20.0%に、CF法では24.5%に検出され、奥田のOuchter-

lony法による5.8%および11.4%より高率に検出され、KusabaらのIES法による16.1%よりもやや高率であった。CF法では奥田の21.1%と差異はなかった。

また、抗dDNA抗体が陰性で、抗nDNA抗体が陽性の症例は奥田、Kusabaらの成績では数例認められているが、著者らの症例では検出されず、今後さらに検討してみたい。

一方、SLE以外の疾患群において抗d-DNA抗体がCF法で4倍以下にもかかわらず、IES法で陽性を示した症例が2例認められた。このことは青塚らが述べているように特異性に問題があるのかも知れない。さらに本間ら、横張らが示唆しているように、抗体価が低値で定量性に乏しいことも検査法として問題となるかも知れない。また、Pincusによれば血清とDNAとの反応は温度、緩衝液の種類、pH、イオン強度、反応時間などに左右され、とくにイオン強度とpHの低下の影響が大とされている。どの程度これらの要因が影響するか今後の検討課題である。

つぎに技術的な面からみた場合、CF法は関与する反応因子が多く、手技が複雑であり、しかも結果を得るまでに長時間を要するなどの欠点がある。しかし補体結合性抗体の存在はImmune Complexとして、SLE腎症の発症と密接な関係があると考えられており、この抗体の検出は病因的意義を有するものと考えられる。IES法の場合、技術的には容易で、一度に多数の検体が処理可能であり、しかも短時間で結果を知り得るなどの特徴がある。

したがって、IES法は感度および特異性にやや問題があるが、スクリーニング検査法として十分使用できると考えられる。

結 語

IES法による抗DNA抗体の検出を試み、その有用性について検討した結果、つぎの成績を得た。

1) IES法による抗DNA抗体検出率は、SLE45例中抗dDNA抗体が51.1%、抗nDNA抗体が20.0%で、CF法による抗体検出率よりやや劣った。

2) SLE以外の疾患群では17例中IES法による抗-dDNA抗体が23.6%に検出され、CF法の成績との不一致例がみられた。

3) IES法による抗DNA抗体検出法は、CF法には劣るがスクリーニング検査として使用することも可能かと考えられる。

文 献

1) 青塚新一, 諸井泰興, 横張龍一: 抗核抗体, 特に抗DNA抗体の検出法と診断的意義, 最新医学, 31:61~68, 1976

2) 本間光夫, 富永教洋, 東篠毅, 宮地清光, 高野慎: 抗DNA抗体の検査法, 臨床病理(臨時増刊), 25:17~23, 1976

3) 国立予防衛生研究所学友会編: ウィルス実験学(総論), 丸善, 東京, 1973

4) Kusaba, T., Kodama, T., Hachimine, K. and Kisu, T.: Detection of Anti-DNA Antibodies by Electrosynthesis and Complement Fixation Technique in the Serum of Systemic Lupus Erythematosus, 福岡医誌, 67:319~325, 1978

5) Mayer, M. M.: Experimental Immunochemistry. Chapter 4, 2nd ed. Springfield III Charles, C., Thomas pub. 1961

6) 奥田正治: エリテマトーデス(SLE, cDLE)におけるDNA抗体の検索, とくにphoto-oxidized DNA抗体について, アレルギー, 19:260~266, 1970

7) 奥田正治: 全身性エリテマトーデスのDNA抗体, とくに, 新たな間接血球凝集法によるDNA抗体の検索と補体結合性DNA抗体との相関性について, 臨床と研究, 50:3611~3616, 1973

8) Pincus, T.: Immunochemical Conditions Affecting the Measurement of DNA Antibodies Using Ammonium Sulfate Precipitation, Arthritis Rheum. 14:623~630, 1971

9) Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I. and Kunkel, H. G.: DNA and

antibodies to DNA in the serum of patients with SLE, J. Clin. Invest. 45:1732~1738, 1966

10) 山田巖, 沢江義郎: 蛍光抗体法による抗DNA抗体の検討, 九大医短部紀要, 3:75~80, 1976

11) 山田巖, 沢江義郎, 森田耕作: 抗DNA抗体検出法の検討, 最新医学, 31:176~182, 1976

12) 横張龍一, 諸井泰興: 抗核抗体の種類と検査法, 内科, 34:755~760, 1974