

補体結合反応による抗RNA抗体の検討(続報)

山田, 巖
九州大学医療技術短期大学部

澤江, 義郎
九州大学医療技術短期大学部

<https://doi.org/10.15017/128>

出版情報 : 九州大学医療技術短期大学部紀要. 9, pp.25-28, 1982-03-25. 九州大学医療技術短期大学部
バージョン :
権利関係 :

補体結合反応による抗RNA抗体の検討（続報）

山田 巖* 澤江 義郎**

A Study of the Anti-RNA Antibodies
by Complement Fixing Reaction

Iwao Yamada and Yoshiro Sawae

まえがき

近年、全身性エリテマトーデス（SLE）においては、各種の自己抗体の存在が認められている。また、それらを血清学的に検出することが複雑な病態を把握するうえで不可欠なものになっている。

われわれはさきに補体結合反応（CF法）による抗RNA抗体の検出を試み、その臨床的意義について報告した¹¹⁾

今回、CF法で検出された抗RNA抗体が、特異的な抗原抗体反応に基づいているのかを確認するために可溶性DNA添加による中和抑制試験および牛豚臓より抽出精製したRNA分解酵素（RNase）で処理したRNA抗原（RNase処理抗原）による抗RNA抗体の検出を試み、さらにCF法に用いる緩衝液について検討したので報告する。

実験対象および方法

材料：九州大学医学部附属病院検査部に、抗核抗体の検査のために提出されたSLE患者血清41検体を用いた。

CF法：Kolmerの少量法に従い⁴⁾ マイクロタイター法にて実施した。

中和抑制試験：検体血清に可溶性DNAを100 μ g/dlの割合に添加し、3000 rpmで10分間遠心後、その上清についてCF法を実施し、添加前後の抗体価の変動をみた。

RNA抗原：牛肝臓より抽出精製されたRNA

* ** 九州大学医療技術短期大学部

（Sigma製）を生理食塩水に10 μ g/dlの割合に溶解したものをを用いた。

DNA抗原：仔牛胸腺由来のDNA（Sigma製）を生理食塩水に10 μ g/dlの割合に溶解し、100 $^{\circ}$ Cで10分間煮沸後、氷水中で急冷したものをを用いた⁹⁾

RNase処理抗原：リン酸緩衝液に50mMの割合にRNaseを溶解した溶液の5mlに、RNA抗原を0.1ml加え、37 $^{\circ}$ Cに60分間放置後、4 $^{\circ}$ Cにて1昼夜反応させ、さらに37 $^{\circ}$ Cに2時間静置し、加水分解処理を施したものをを用いた³⁾¹⁰⁾

RNase作用の確認：RNA抗原をRNaseで加水分解処理する過程で、任意の時期に抽出剤の過塩素酸を加え、90 $^{\circ}$ Cで30分間反応後、3000 rpmで30分間遠心し、その上清を260nmの波長で吸光度を測定し、RNaseの効果のみ¹⁾

緩衝液⁴⁾⁵⁾⁸⁾：CF法の血清、補体の希釈、赤血球浮遊液の作製にグラチンペロナル緩衝液（精製水2000mlに塩化ナトリウム85g、ペロナル5.75g、ペロナルソーダ3.75g、1M塩化マグネシウムと0.3M塩化カルシウムをそれぞれ5ml、0.01%の割合にグラチンを含む、pH7.5、GVBと略す）とトリス-HCl-NaCl緩衝液（0.01Mトリスアミノメタン、0.15M塩化ナトリウム、0.0005M塩化マグネシウム、0.00015M塩化カルシウム、0.1%牛血清アルブミンを含む、pH7.5、Tris緩衝液と略す）を用いる方法を検討した。

実験成績

1) 可溶性DNAの添加による中和抑制試験
抗RNA抗体価の高かった血清に可溶性DNA

添加後の抗DNA抗体価および抗RNA抗体価を添加前の抗体価と比較したのが表1である。抗RNA抗体価はNo.26と34の2検体では添加前の抗体価より1管低下していたが、抗DNA抗体価は8倍から32倍を示していた検体が、添加後にはすべて4倍以下となり、No.3の検体では64倍が16倍に、No.8の検体では64倍が8倍にそれぞれ低下しており、抗DNA抗体のみが可溶性DNAにより中和され抑制されていた。

表1. 可溶性DNA添加による中和抑制試験

検体 No.	DNA		RNA	
	前	後	前	後
3	64	16	32	32
8	64	8	16	16
12	16	<4	8	8
26	16	<4	16	8
30	32	<4	8	8
32	16	<4	16	16
34	32	<4	16	8
35	8	<4	8	8

2) 未処理RNA抗原とRNase処理抗原による抗RNA抗体価

図1に示すごとく29検体中4検体(13.8%)に、RNase処理抗原での抗体価が未処理RNA抗原による抗体価より1管低下していたにすぎなかった。

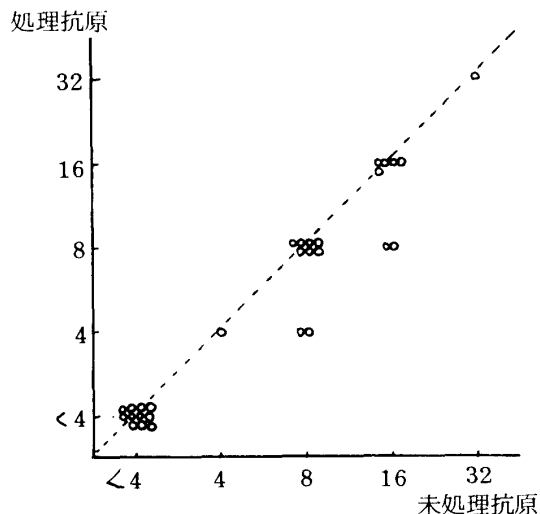


図1. 未処理抗原と処理抗原による抗RNA抗体価(29検体)

3) RNaseによるRNA抗原の消化

RNA抗原にRNaseを作用させたときの溶液における260nmでの吸光度の変化は図2のごとくであった。すなわち、RNaseの効果は37°Cで1時間の加水分解処理で明らかに認められたが、さらに処理時間を延長してもその効果に大きな変化はみられなかった。

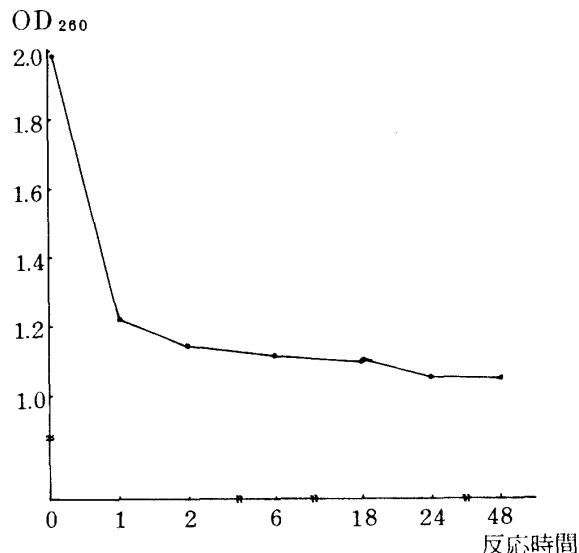


図2. RNaseによるRNA抗原の消化

4) CF法に用いる緩衝液と抗RNA抗体価

CF法をGVBとTris緩衝液とを用いて抗RNA抗体を測定してみると、図3のごとく41検体中18検体(43.9%)は両者の抗体価が一致していたが、23検体(56.1%)はGVBを用いた場合の方が高

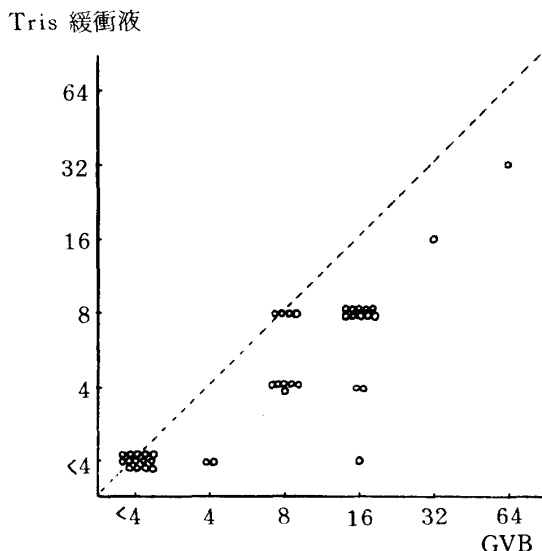


図3. GVBとTris緩衝液による抗RNA抗体価(41検体)

値であった。そのうちの3検体(13.0%)には2管以上の差が認められた。また、GVBで16ないし4倍を示していた検体が、Tris緩衝液では4倍以下となったものが3検体(13.0%)認められた。

考 察

血清学の分野における抗原抗体反応は、一定の条件のもとでは特異的に反応する特徴がある。しかし、抗原あるいは抗体には交差反応や類属反応の存在することが知られている。とくにCF法のように反応に関与する因子が多くなると、その傾向が一層強められるのはさげられない。

CF法で検出された抗RNA抗体の特異性を確認することも必要であり、さきの報告¹¹⁾では可溶性RNA添加による抗RNA抗体価、抗DNA抗体価の変動をみたが、今回は可溶性DNAを検体血清に添加し、抗DNA抗体価、抗RNA抗体価の変動をみた。

まず可溶性DNAを添加した場合、抗DNA抗体価は添加前の抗体価の1/4ないしそれ以下に低下していたが、抗RNA抗体価は1管低下した検体が一部にみられたのみであった。可溶性RNAを添加した場合には、抗RNA抗体価は添加前の抗体価の1/8ないしそれ以下に低下していたが、抗DNA抗体価は1管低下した検体が一部にみられたのみであった。¹¹⁾

この2つの中和抑制試験の結果より、抗RNA抗体と抗DNA抗体は別のものであり、しかもそれぞれに特異的な抗原抗体反応であるといえる。そこで抗DNA抗体価とともに抗RNA抗体価を測定する意義が十分にあるといえる。

つぎにRNAの抗原性の特性をみるためにRNaseで加水分解処理³⁾¹⁰⁾した、いわゆるRNase処理抗原を用いて抗RNA抗体価を測定し、未処理RNA抗原に対する抗体価と比較検討したところ、RNase処理抗原による抗体価に1管の低下が認められたのは13.8%の検体にすぎなかった。このことは血清学的検査における誤差範囲内であり、両者の抗体価に有意の変動は認められないといえる。

そこでRNaseによるRNA抗原の加水分解処

理が現実におこっているのか確かめるために、260nmの吸光度の変化をみたが37°Cで1時間の処理で明らかに吸光度の低下が認められた。したがってRNA抗原をRNaseで加水分解処理しても、その抗原性は保持されていると考えられた。抗DNA抗体価の測定ではDNAそのものの抗原での反応は比較的弱く、加熱処理した抗原では明らかになるが、RNAでは加熱処理抗原による反応と、RNAそのものによる反応にはまったく相違が認められなかった¹²⁾ことと何らかの関連があるのかも知れない。

CF法とくにKolmerの少量法⁴⁾は、各種のウイルスやマイコプラズマなどの血清学的診断法として現在多用されている。その際の希釈液としてはGVBがもっぱら用いられており、われわれも好んで用いてきた。しかし、DNAやRNAなど核酸を抗原としてCF法を実施する時には、核酸の構成成分として含まれているピリミジン塩基がGVB中にも存在するため不适当で、その代りにTris緩衝液の使用が望ましいという指摘がある。⁵⁾そこでGVBとTris緩衝液を用いて抗RNA抗体価を測定してみると、GVBを用いた場合の方が56.1%のものに高値を示し、そのうちの13.0%のものには2管以上の差が認められ、3検体(13.0%)はTris緩衝液を用いた場合に4倍以下となった。緩衝液の違いによる検出率は明らかにGVBの方が高く、しかも特異性に問題がないとするとGVBを用いてもよいものと思われる。しかし、GVBの場合には感作赤血球の溶解が十分でなく、溶血度の判定でTris緩衝液の場合に比べ困難なことがしばしば経験された。

また、RNAを抗原としたときは検体血清中のRNaseの存在が特異的な抗原抗体反応に影響するとPhilipson⁶⁾は述べており、Sela⁷⁾は精製したRNase抗体で吸収して、Garrett²⁾はペントナイト処理でRNaseを除去することをすすめているが、RNase処理抗原を用いてもとくに抗体価に変動がなかったことから問題はないものと思われる。しかし、RNAが高分子強電解質であることから、非特異反応の引き金になりやすいことも考慮すべきであろう。

結 語

CF法による抗RNA抗体の検出を試み、つぎの成績を得た。

1) 可溶性DNA添加による中和抑制試験により、抗RNA抗体の特異性が再確認された。

2) RNaseによりRNA抗原を加水分解処理しても、その抗原性は保持されていた。

3) 核酸を抗原とするCF法の場合に、グラチンベロナル緩衝液を用いた方が、トリス-HCl-NaCl緩衝液を用いたときより、溶血の判定がやや困難であるが、抗体価も検出率も高値であった。

文 献

1) Crook, E. M., Mathias, A. P. and Rabin, B. R.: Spectrophotometric assay of bovine pancreatic ribonuclease by the use of Cytidine 2':3'-phosphate, *Biochem. J.* 74: 234~238, 1960

2) Garrett, C. T., Wilkinson, D. S. and Pitot, H. C.: Preparation of ribonuclease free DNase I and α -amylase, *Anal. Biochem.* 52: 342~348, 1973

3) Harbeck, R. J., Bardana, E. J., Kohler, P. F. and Carr, R. I.: DNA:anti-DNA Complexes: their detection in systemic lupus erythematosus sera, *J. Clin. Invest.* 52: 789~795, 1973

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

5) 宮崎正澄: 核酸に対する抗体の作り方, 蛋白質 核酸 酵素, 11: 1452~1457, 1966

6) Philipson, L., Kaufman, M.: The efficiency of ribonuclease inhibitors tested with viral ribonucleic acid as substrate, *Biochim. Biophys. Acta.* 80: 151~154, 1964

7) Sela, M., Ungar-Waron, H., Shechter, Y.: Uridine-specific antibodies obtained with synthetic antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 52: 285~292, 1964

8) 進藤宙二監修: 免疫学 アレルギー学実験法, 文光堂, 東京, 1971

9) Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I., Kunkel, H. G.: Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patient with SLE, *J. Clin. Invest.* 45: 1732~1740, 1966

10) 山村雄一監修: 医化学実験法講座1A, 中山書店, 東京, 1971

11) 山田巖, 澤江義郎: 補体結合反応による抗RNA抗体の検討, 九大医短部紀要, 8: 29~33, 1981

12) 山田巖, 澤江義郎: 補体結合反応による抗RNA抗体の検討 第2報, 臨床病理(補冊), 27: 331, 1979