

蛍光偏光解消法によるSLE患者の Circulating Immune Complex の測定

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/10.15017/135>

出版情報 : 九州大学医療技術短期大学部紀要. 10, pp.35-41, 1983-02-28. 九州大学医療技術短期大学部
バージョン :
権利関係 :

螢光偏光解消法による S L E 患者の Circulating Immune Complex の測定

山田 巖*, 澤江 義郎**

Studies on circulating immune complexes in SLE by the
fluorescence depolarization method

Iwao Yamada and Yoshiro Sawae

はじめに

最近, 各種疾患における病因的意義としての血清中免疫複合体 (Circulating Immune Complexes: CIC) の存在が注目されている。とくに自己免疫疾患においては CIC の検出が臨床診断上や治療経過を観察する上で有力な情報を提供するといわれており, 必要不可欠な検査となってきた。

CIC の測定方法にはクロマトグラフィーなどを用いる物理化学的方法, 補体成分や細胞レセプターなどを用いる免疫生物学的方法など,²⁾⁵⁾ 数多くの方法が試みられているが, いずれも臨床検査, とくにルーチン検査方法として一長一短があり, 未だ確立された方法は見当たらない。

今回, 著者らは理論的には 1960 年代に確立されている螢光偏光解消法による, 抗原抗体反応系の測定を利用した C1q binding assay (IBF) 法による CIC の測定を試みた。また, 同時に測定したポリエチレングリコール沈澱物補体消費試験 (PEG-CC 法) による CIC 値と比較するとともに, 抗 DNA 抗体, 補体価 (CH50) との相関を検討したので報告する。

実験対象および方法

血清: 全身性エリテマトーデス (SLE) の患者血清 159 検体と, 健康人血清として九大歯学部学生より採取した 31 検体を用いた。

IBF-129 システム (抗体化成工業製) : 螢光偏光解消法を用いて, Primary Association をブラウン運動の変化としてとらえるものである。すなわち, 光源からの光は 490 nm のフィルターを通過し, さらに偏光子により直線偏光となり, これがサンプル中の螢光色素 (FITC) を励起し, これより発せられた螢光は回転偏光子および 520 nm のフィルターを通過して螢光偏光となり, 光電増幅管に入り電気信号に変換され, 最終的には螢光偏光度値としてデジタル表示される。

IBF 法による CIC の測定方法: CIC 定量法は表 1 のごとく PEG 沈澱法と C1q binding assay の併用による方法にて実施した。すなわち, 被検血清に EDTA 溶液を加えて 37°C に 30 分間放置し, PEG 溶液を加え 4°C にて 2 時間反応後, 遠心により得られた沈澱物をリン酸緩衝液 (pH 7.5) で溶解し, FITC 標識 C1q 試薬を加え 4°C で 30 分間反応後, C1q の結合する割合をみる。なお, 標準曲線は aggregated IgG を 0, 100, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に希釈したものを同様に測定し作成した。

FITC 標識 C1q 試薬: Yonemasu¹⁷⁾ らの方法に準じてヒト血清より精製した C1q に,¹⁰⁾ Marshall¹⁰⁾ らの方法により FITC を標識したもので, 三光純薬研究室で試作されたものを用いた。

3)

PEG-CC 法: Harkiss³⁾ らの方法に基づく,

*・** 九州大学医療技術短期大学部

蛍光偏光解消法によるSLE患者の Circulating Immune Complex の測定

表1 IBF法によるCICの測定方法

	Standard		Sample	
Sample	St	0.4 ml	Serum	0.2 ml
Saline		—		0.2 ml
EDTA solution		1.0 ml		1.0 ml
Incubation 37 °C, 30 min.				
Precipitative PEG solution		3.0 ml		3.0 ml
Incubation 4 °C, 2 hr. Centrifugation at 3500 rpm 20 min. Precipitates				
Saline		0.2 ml		0.2 ml
Incubation 37 °C, 10 min.				
Buffer I		0.1 ml		0.1 ml
FITC C1q solution		0.1 ml		0.1 ml
Incubation 4 °C, 30 min.				
Buffer II		2.0 ml		2.0 ml
Keep at room temperature 10 min. Measurement P value by IBF-129				

表2 PEG-CC法によるCICの測定方法

- 1) 0.3ml sample, 50 μ l 1.2 M EDTA, 50 μ l borate buffer and 0.1ml 12.5 per cent PEG are mixed and incubated at 4 °C for 90 min.
- 2) After centrifugation at 1700 G for 90 min at 4 °C, the precipitations are washed in 1.0ml 2.5 per cent PEG (below 4 °C). Remove the supernatant by centrifugation at 1700 G for 15 min, at 4 °C.
- 3) The precipitations are dissolved in 30 μ l GVB (37°C). 10 μ l pooled NHS are added and incubation carried out at 37 °C for 30 min.
- 4) 1.0ml of 1.5 \times 10⁸ per ml EA are added and incubation carried out for 60 min. at 37 °C.
- 5) 6.5ml saline (4°C) are added and the tubes centrifuged. The supernatant fluids are estimated for haemoglobin in a spectrophotometer at 414 nm.
- 6) PEG-CC per cent is calculated as follows.

$$\text{PEG-CC\%} = \left(1 - \frac{\text{haemolysis of sample (OD414)}}{\text{haemolysis of control (OD414)}} \right) \times 100$$

15) 手嶋ら¹⁵⁾の方法で実施した。すなわち、被検血清にEDTA溶液とホウ酸緩衝液を加えて攪拌し、12.5%のPEGを加えて4℃で90分間反応後、遠心により得られた沈澱物をゼラチンベロナール緩衝液に溶解し、補体源として健康人血清を加えて37℃で30分間反応させたのち、感作赤血球を加えて残存補体による溶血反応を414nmの吸光度で測定し、補体消費率を求める。

抗DNA抗体の検出方法：補体結合反応およびImmunoelectrosyneresis法にて測定した。¹⁶⁾

CH50：Mayerの50%溶血法に従い、¹¹⁾1/2.5量法により測定した。

成 績

1) IBF法によるCICの検出

SLE患者血清と健康人血清のIBF法によるCIC値は図1のようになった。まず健康人

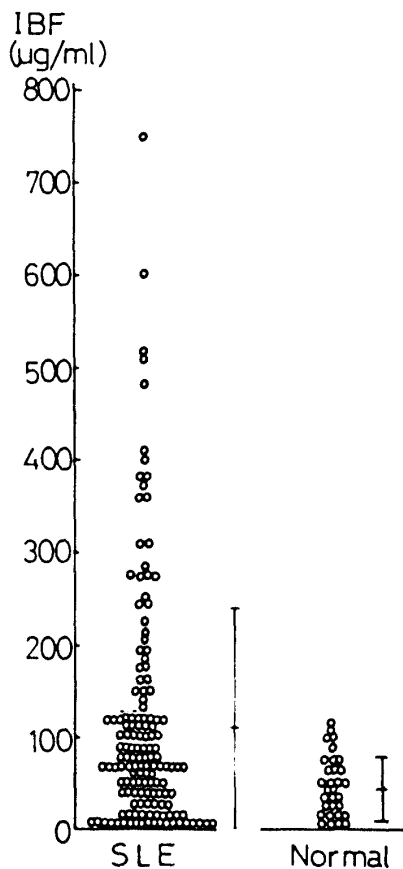


図1 IBF法によるCICの検出

血清31検体のCIC値は0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から115 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間に分布しており、平均値は45.2 \pm 33.9であり、2標準偏差値を加えた上限値113 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下を正常値と設定した。一方、SLE患者血清159検体における平均値は112.4 \pm 125.5であり、113 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のものは50検体(31.4%)あり、明らかに健康人の値よりも高値を示すものが多かった。

2) IBF法とPEG-CC法の相関

SLE患者血清53検体におけるIBF法とPEG-CC法のCIC値を比較検討してみると図2のようになり、両者間には $Y = 14.85 + 0.13X$ の相関式が得られ、相関係数0.62と比較的良好な相関が存在した。IBF法で113 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を示した18検体中13検体(72.2%)は、PEG-CC法の測定値が50%以上の高値を示していた。また、113 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のものには50%以上のものは認められなかった。一方、PEG-CC法の測定値が50%以上のものはすべてIBF法で113 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であり、20%以上の23検体中21検体(91.3%)はIBF法で113 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で、2検体が125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ といったやや高値を示していた。また、PEG-CC値が20~50%の間のもは、IBF法では14検体(26.4%)が113 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であり、なかには750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高値のものが認められた。

3) IBF法によるCIC値と抗DNA抗体

IBF法によるSLE患者血清のCIC値と補体結合反応およびImmunoelectrosyneresis法による抗DNA抗体の有無を比較検討してみると図3のようになった。抗DNA抗体陰性の108検体のうち大部分は113 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で、6検体(5.6%)が113 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示していた。抗DNA抗体の存在が認められた51検体中45検体(88.2%)はCIC値が113 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であり、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のものは39検体(76.5%)であった。すなわち、抗DNA抗体陽性群は抗DNA抗体陰性群に比べて明らかに高いCIC値を示していた($P < 0.003$)。

蛍光偏光解消法による SLE 患者の Circulating Immune Complex の測定

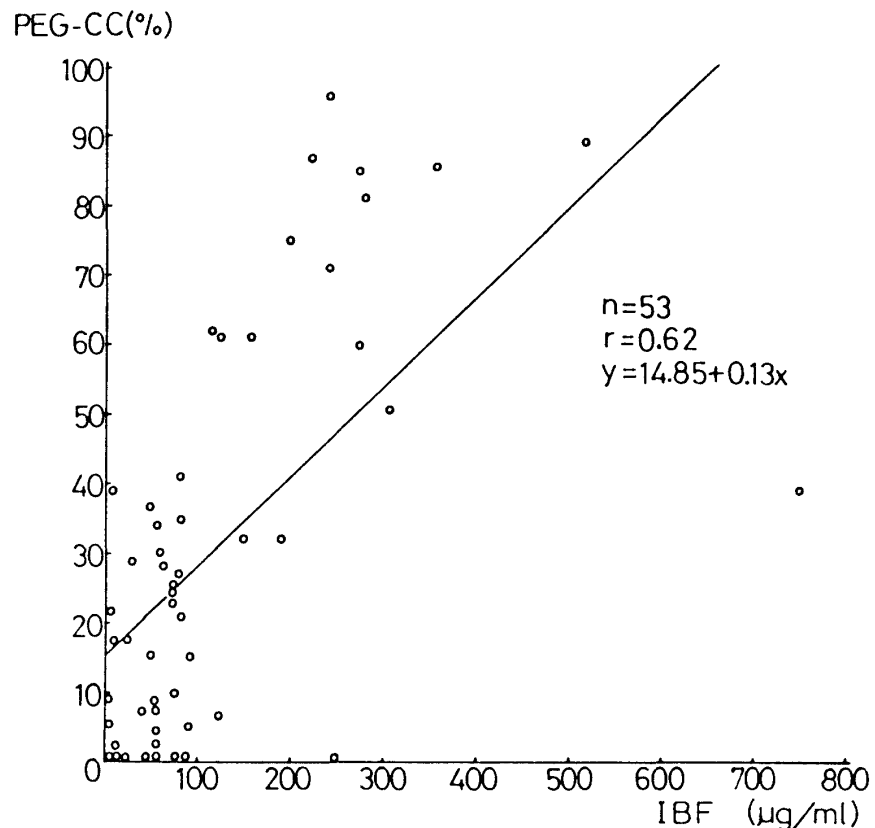


図2 IBF法とPEG-CC法の相関

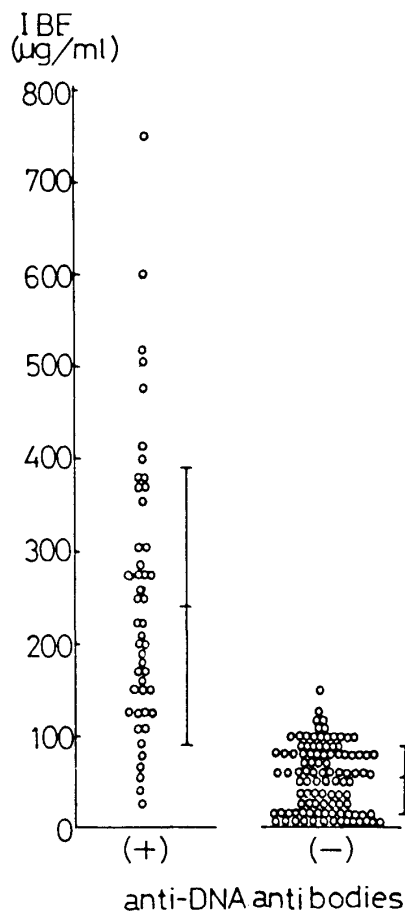


図3 IBF法によるCIC値と抗DNA抗体

4) IBF法によるCIC値とCH50
 図4に示したように、CIC値が $113\mu\text{g/ml}$ 以下の30検体中26検体(86.7%)ではCH50が正常域か、または40以上であった。一方、CIC値が $113\mu\text{g/ml}$ 以上の35検体中28検体(80%)はCH50が30以下であり、低補体価のものに有意に高いCIC値が認められた($P < 0.003$)。この両者間には $Y = 4.11 - 0.05X$, $r = -0.62$ と比較的良好な逆相関が認められた。

考 察

現在、CICの測定には多数の方法が利用されている。今回、著者らは²⁾⁵⁾ 蛍光偏光解消法に基づくIBF法によりCICの測定を試みた。

蛍光偏光解消法は1920年代に Perrin¹³⁾ が最初に研究報告し、1950年代後半より Dandliker¹⁾らを中心とした基礎的研究により確立された方法であるが、この間操作の煩雑さをはじめ多くの問題点⁹⁾があり、実用化されなかった。しかし、急速な電子工学の進歩により種々の問

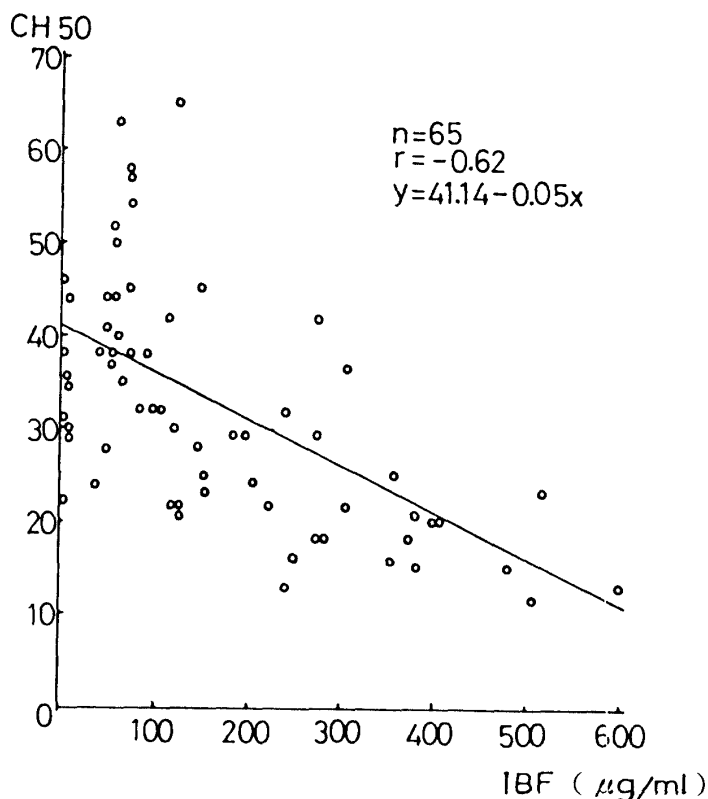


図4 IBF法によるCIC値とCH50

題点は改善され、高感度の測定方法として今日ではいろいろの研究面に応用されはじめて⁸⁾⁹⁾いる。

IBF法によるCIC値は健康人における平均値が45.2μg/mlであったのに対して、SLE患者では112.4μg/mlであり、この両者間には明らかな差異が認められた。健康人の平均値に2標準偏差値を加えた上限値113μg/ml以上を陽性とする、SLE患者血清159検体中50検体(31.4%)が陽性となり、粕川⁶⁾らの血小板凝集法での57%、手嶋¹⁵⁾らのPEG-CC法での48.6%に比べるとやや低率であった。これらの数値はSLEの活動期とも関連しており、一概にこの数値を比較することはできないと思われる。そこで抗DNA抗体の有無、CH50との間の相関を調べた。

SLE患者におけるCICはDNA・抗DNA抗体複合体であり、これが本症の主要原因であるとKoffler⁷⁾らはとなえている。著者らの成績でも抗DNA抗体が検出された群ではIBF法によるCIC値が、抗DNA抗体が検出されなかった群より明らかに高値を示しており、DNA・抗DNA抗体複合体の存在が示唆

された。しかし、一方でDNA・抗DNA抗体複合体がCICに關与していることに否定的意見を述べているものも⁴⁾いる。

SLEの活動性とCH50の間に關連のあることはよく知られており、活動性のSLEにおいてはCH50が低下する。このCH50とCICとの相関について著者らの成績ではr=-0.62とある程度の逆相関が認められた。粕川⁶⁾らも逆相関が得られたと報告している。鈴木¹⁴⁾らの成績では有意の相関關係は認められなかったものの、CICの存在群では低CH50を示していたと報告しており、この両者間には高度の關連性があると思われる。

IBF法によるCIC値と、これまでしばしば使用されているPEG-CC法によるCIC値の間には、r=0.62と比較的良好な相関が認められた。IBF法で113μg/ml以上のものは大部分がPEG-CC法で50%以上であったが、なかにPEG-CC値の低いものがあった。IBF法で113μg/ml以下でありながらPEG-CC法で20~50%を示した検体が53検体中14検体(26.4%)もあり、この境界域のもの

蛍光偏光解消法による SLE 患者の Circulating Immune Complex の測定

を PEG-CC 法で如何に取扱うものか明らかでない。この両反応とも PEG で沈澱させた CIC に補体成分を反応させて、抗原抗体複合体の存在を知る方法である。IBF 法ではヒト血清より精製した C1q のみを用いているので鋭敏に CIC をとらえることができる。しかし PEG-CC 法では健康人の血清を補体源として用いており、このヒト血清中には補体源以外に各種蛋白質成分が含まれており、このような成分が反応系に加えらる感作赤血球に影響を与えることが十分考えられる。その点 IBF 法の方が特異性が高くなると考えられる。しかし、IBF 法における健康人の CIC 値が $45.2 \pm 33.9 \mu\text{g/ml}$

と広範囲に分布していることは、健康人の血清中にもわずかな CIC が存在しているのか、単に C1q と反応するものがあるのか問題であり、PEG-CC 法でも 20% 前後のものがあることを考え合せて、今後更に検討を加える必要があろう。

以上、IBF-129 システムを用いて CIC の測定を試みてきたが、表 3 にかかげるような特徴、問題点が指摘されており、著者らも同様のことを経験してきた。従って、IBF 法による検査法の特徴、問題点を考慮し、安定した試薬の供給が可能であれば臨床検査方法として有用と考えられる。

表 3 IBF-129 システムの特徴と問題点

特 徴

- 1) 試薬より発せられる蛍光のみを情報としてとらえるので反応物と非反応物を分離する必要がない。
- 2) 蛍光測定のため非常に高感度である。
- 3) ラジオアイソトープの場合のようなわずらわしさが無い。
- 4) 抗原抗体反応を 1 分間でとらえられる。

問題点

- 1) 反応進行中に沈澱物が析出したり、白濁により測定不可能の検体がみられる。
- 2) 専用の試薬と機器が必要である。
- 3) 試薬はより高い純度のものが要求される。
- 4) CIC の濃度が高い検体では蛋白の影響を受け易い。

結 語

IBF 法により CIC の測定を試み、つぎのような成績をえた。

1) 健康人における CIC の平均値が $45.2 \pm 33.9 \mu\text{g/ml}$ であったのに対して、SLE では $112.4 \pm 125.5 \mu\text{g/ml}$ であり明らかに高値のものが多かった。

2) IBF 法による CIC 値と PEG-CC 法による CIC 値との相関は $r = 0.62$ と比較的良好であった。

3) 抗 DNA 抗体陽性血清では CIC 値の $150 \mu\text{g/ml}$ 以上のものが 76.5% と多く、DNA・抗 DNA 抗体複合体の存在が示唆され

た。

4) IBF 法による CIC 値と CH50 の相関は $r = -0.62$ と比較的良好な逆相関であった。

5) IBF 法による CIC の測定は改善すべき問題点も残されているが、臨床検査法として利用可能と考えられた。

文 献

1) Dandliker, W. B. and Feigen, G. A.: Quantitation of the antigen-antibody reaction by the polarization of fluorescence, Biochem.

山田巖・澤江義郎

- Biophys. Res. Comm. 5:299 ~ 304, 1961
- 2) 浜島義博: Immune complex 検出法の歩み, 最新医学, 33:1295~1300, 1978.
- 3) Harkiss, G. D. and Brown, D. L.: Detection of immune complexes by a new assay, the polyethylene glycol precipitation-complement consumption test (PEG-CC), Clin. Exp. Immunol. 36:117~129, 1979.
- 4) Izui, S., Lambert, P. H. and Miesher, P. A.: Failure to detect circulating DNA-anti-DNA complexes by four radio-immunological methods in patients with systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 30:384~392, 1977.
- 5) 粕川礼司: 免疫複合体の証明法と臨床的意義, 臨床検査, 23:35~43, 1979.
- 6) 粕川礼司, 佐藤幹夫, 鈴木秀幸, 岡田満, 猪狩俊, 吉田浩, 吉田起夫: 血小板凝集法と C1qラジオイムノアッセイ固相法, 最新医学, 33:1301~1306, 1978.
- 7) Koffler, D., Agnello, V. and Kunkel, H. G.: Polynucleotide immune complexes in serum and glomeruli of patients with systemic lupus erythematosus, Am. J. Pathol. 74:109~122, 1974.
- 8) 前田浩: 蛍光偏光法: 原理と応用, 臨床病理, 27:777~783, 1979.
- 9) 前田浩: 蛍光偏光法の医学生物学への応用—抗原と抗体の定量, プロテアーゼ活性の測定—, 医学のあゆみ, 106:733~738, 1978.
- 10) Marshall, T. D., Eveland, W. C., Smith, C. W.: Superiority of fluorescein isothiocyanate for fluorescent antibody technique with a modification of its application, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98:898~900, 1958.
- 11) Mayer, M. M.: Experimental immunochemistry, Chapter 4, 2nd, Springfield III, Charles, C., Thomas pub, 1961.
- 12) 荻良晴: 私信
- 13) Perrin, M. F.: Polarization de la lumière de fluorescence vie moyenne des molécules dans l'état excité, J. Phys. radium, 7:390~401, 1926.
- 14) 鈴木秀幸, 渡辺一雄, 西間木友衛, 金子隆一, 大原守弘, 岡田満, 森藤隆夫, 吉田浩, 粕川礼司: SLE患者における血中 Immune Complex の研究—血小板凝集法と抗原の同定について—, 臨床免疫, 13:133~150, 1981.
- 15) 手嶋秀毅, 吾郷晋治, 友岡裕治, 宮崎澄雄, 平良雅裕, 重松信昭, 鳥巢要道: ポリエチレングリコール沈澱物補体消費試験 (PEG-CC) による Circulating Immune Complex (CIC) の定量と臨床応用, アレルギー, 30:59~67, 1981.
- 16) 山田巖, 澤江義郎: Immunoelectro-syneresis 法による抗DNA抗体の検索, 九大医短部紀要, 7:39~43, 1980.
- 17) Yonemasu, K. and Stroud, R. M.: C1q rapid purification method for preparation of monospecific antisera and for biochemical studies, J. Immunol. 106:304~313, 1971.