九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

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

山田, 巌
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ＳＬＥ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ている。

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，数多くの方法[2)5)]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短大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℃に３０分間放置し，ＰＥＧ溶液を加え４℃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℃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 aggragated IgG を０，100,250 500, 750, 1000 μg/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：Yonemasu[17)]らの方法に準じてヒト血清より精製した C1q に，Marshall[10)]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。

ＰＥＧ－CC法：Harkiss[3)]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 ℃, 30 min.		
Precipitative PEG solution	3.0 ml	3.0 ml
Incubation 4 ℃, 2 hr. Centrifugation at 3500 rpm 20 min. Precipitates		
Saline	0.2 ml	0.2 ml
Incubation 37 ℃, 10 min.		
Buffer I	0.1 ml	0.1 ml
FITC C1q solution	0.1 ml	0.1 ml
Incubation 4 ℃, 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, 50μl 1.2 M EDTA, 50μl borate buffer and 0.1ml 12.5 per cent PEG are mixed and incubated at 4 ℃ for 90 min.

2) After centrifugation at 1700 G for 90 min at 4 ℃, the precipitations are washed in 1.0ml 2.5 per cent PEG (below 4 ℃). Remove the supernatant by centrifugation at 1700G for 15 min, at 4 ℃.

3) The precipitations are dissolved in 30μl GVB (37℃). 10μl pooled NHS are added and incubation carried out at 37 ℃ for 30min.

4) 1.0ml of 1.5×10^8 per ml EA are added and incubation carried out for 60min. at 37 ℃.

5) 6.5ml saline (4℃) 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.

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

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４１４ nm 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。まず健康人血清３１検体のＣＩＣ値は０ μg/ml から115 μg/ml の間に分布しており，平均値は４5.2 ±３3.9 であり，２標準偏差値を加えた上限値１１３μg/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±１25.5であり，１１３μg/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。

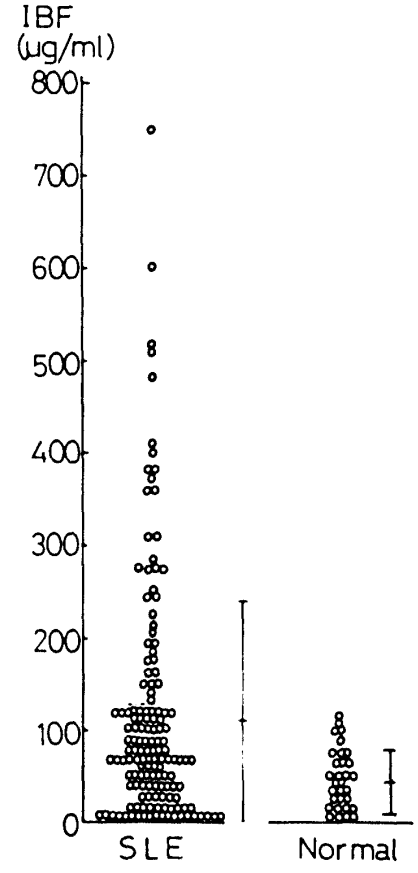

図１　ＩＢＦ法によるＣＩＣの検出

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１１３μg/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，１１３μg/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 μg/ml以上であり，２０％以上の２３検体中２１検体（91.3％）はＩＢＦ法で１１３μg/ml 以下で，２検体が１２５μg/ml と２５０μg/ml といったやや高値を示していた。また，PEG－ＣＣ値が２０～５０％の間のものは，ＩＢＦ法では１４検体（26.4％）が１１３μg/ml 以下であり，なかには７５０ μg/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 Immunoelectrosyne-resis 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１１３μg/ml 以下で，６検体（5.6％）が１１３μg/ml から１５０μg/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 μg/ml 以上であり，１５０ μg/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）。

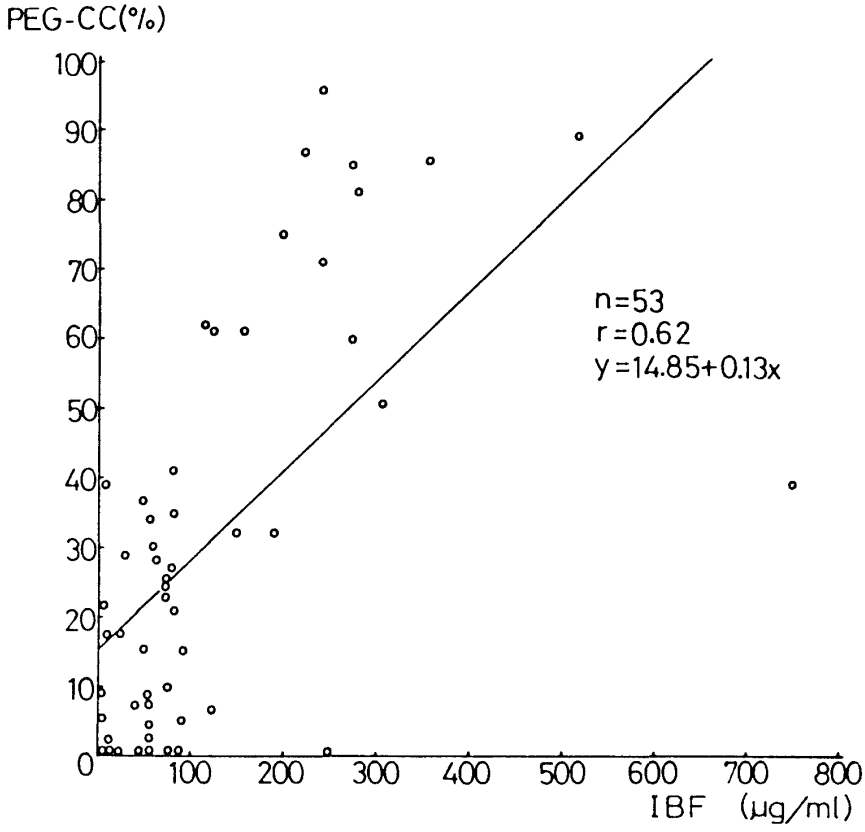

図２　ＩＢＦ法とＰＥＧ－ＣＣ法の相関

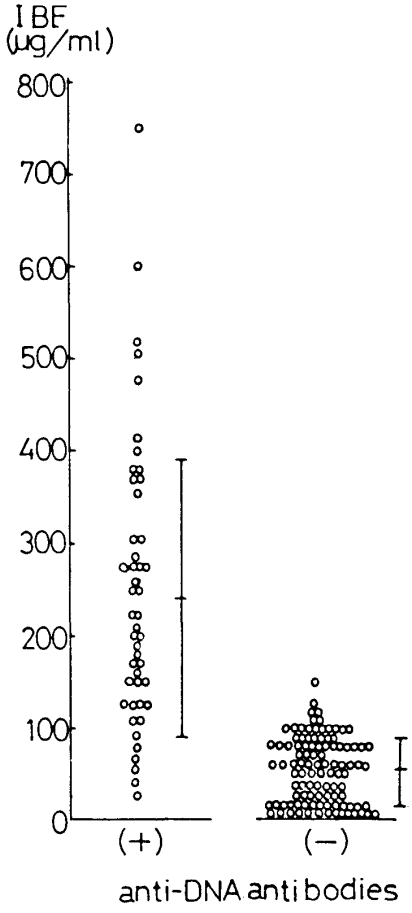

図３　ＩＢＦ法によるＣＩＣ値と抗DNA抗体

４）ＩＢＦ法によるＣＩＣ値とＣＨ５０

図４に示したように，ＣＩＣ値が１１３μg/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１１３μg/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 価が認められた（Ｐ〈0.００３）。この両者間にはＹ＝４１.１－0.０５Ｘ，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[2)5)]が利用されている。今回，著者らは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 Perrin[13)] が最初に研究報告し，１９５０年代後半より Dandliker[1)] 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

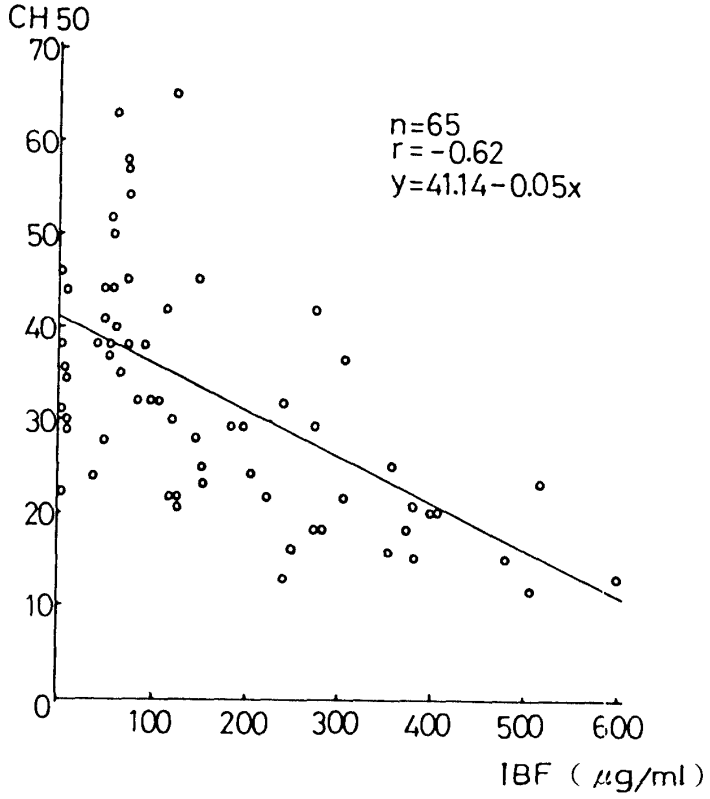

図4　ＩＢＦ法によるＣＩＣ値とＣＨ５０

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いる。[8)9)]

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 以上を陽性とすると，ＳＬＥ患者血清１５９検体中５０検体（３1.4％）が陽性となり，粕川ら[6)]の血小板凝集法での５７％，手嶋ら[15)]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，これが本症の主要な原因であると Kofflerら[7)]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に関与していることに否定的意見を述べているものもいる。[4)]

ＳＬＥの活動性とＣＨ５０の間に関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。粕川ら[6)]も逆相関が得られたと報告している。鈴木ら[14)]の成績では有意の相関関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関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値との間には，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

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成分が含まれており，このような成分が反応系に加えられ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±3 3.9μg/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[12]，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ない。
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うけ易い。

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±33.9μg/ml であったのに対して，ＳＬＥでは１１2.4 ± １２5.5μg/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１５０μg/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.

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 radioimmunological 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，吉田赳夫：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, 2 nd, Springfield Ⅲ, Charles, C., Thomas pub, 1961.

12）荻良晴：私信

13）Perrin, M. F.：Polarization de la lumiére de fluorescence vie moyenne des molécules dans létat excité, J. Phys. rudium. 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，鳥巣要道：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：Immunoelectrosyneresis 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.