

ウケミセツケツキュウギョウシュウハンノウニヨル コウENAコウタイノケンサク

山田, 巖
九州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

澤江, 義郎
九州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

<https://doi.org/10.15017/152>

出版情報：九州大学医療技術短期大学部紀要. 13, pp.7-13, 1986-02-28. 九州大学医療技術短期大学部
バージョン：
権利関係：



受身赤血球凝集反応による抗 ENA 抗体の検索

山田 巖* 沢江 義郎*

Detection of Anti-ENA Antibodies by Passive Hemagglutination Reaction

Iwao Yamada and Yoshiro Sawae

まえがき

抗核抗体 (ANF)あるいは抗 DNA 抗体, 抗 Extractable Nuclear Antigen 抗体 (抗 ENA 抗体) といった自己抗体は, 全身性エリテマトーデス (SLE) をはじめとする種々の自己免疫疾患において検出されることから, その診断や治療効果および予後の判定の指標として利用されている。

その中で抗 ENA 抗体は等張緩衝食塩液で抽出される可溶性の核抗原に対する抗体で, 抗 RNP 抗体, 抗 Sm 抗体, 抗 SS-A 抗体, 抗 SS-B 抗体, 抗 Scl 70 抗体といった多くの抗体が含まれていて, 疾患との関連が注目されている⁵⁾。抗 ENA 抗体の検出法としては, 二重免疫拡散法を利用したものや, 固定したヒツジ赤血球に ENA 抗原を吸着させた, いわゆる受身赤血球凝集反応 (ENA-PHA 法) が実用化されている⁴⁾。そのほかに補体結合反応, Counter immunoelectrophoresis 法, 感作ラテックス光散乱法などもある。

今回, われわれは ENA-PHA 法による ENA 検査試薬を使用する機会を得たので, 二重免疫拡散法と比較検討することにより, その有用性について検討を試みたので報告する。

実験材料および方法

材料: SLE 46 例 (100 検体), 混合性結合組織病 (MCTD) 7 例 (16 検体), シェグレン症候群 (SjS) 2 例 (4 検体) の計 55 例 (120 検体) の患者血清を用いた。

ENA-PHA 法 (カイノス社): 固定したヒツジ赤血球に家兎胸腺より抽出した ENA を吸着させたものを ENA 感作赤血球とし, この ENA 感作赤血球をリボヌクレアーゼ (RNase) で処理したものを Sm 感作赤血球 (RNase 抵抗性 ENA 感作赤血球) として用いた。

測定法は被検血清の 100 倍より 0.025 ml の倍数希釈列をつくり, これに感作赤血球浮遊液を 0.025 ml ずつ添加後室温に静置し, 翌日赤血球の管底凝集像により判定し, 凝集を示した最高希釈倍数を抗体価とした。

ENA-1 テスト (MBL 社): 二重免疫拡散法を利用した方法で, ゲルプレート中央の穴に抗原を, 周囲の穴に被検血清と陽性コントロール血清を交互にそれぞれ注入し, 湿潤箱に入れ室温で 24 時間反応後, 沈降線の有無により判定した。

ANF: ヒト喉頭癌由来細胞 (HEp-2) を核材とするセロフル ANA キット (富士レビオ) を用い, 被検血清を 20 倍より倍数希釈し, 間接蛍光抗体法により抗体価を測定した。

抗 DNA 抗体: Immunoelectrosyneresis 法¹²⁾ により測定した。

*九州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

補体価(CH 50)：Mayerの50%溶血法²⁾にしたがい、1/2.5量法により測定した。

C₃ C₄ 値：血漿タンパク質定量用免疫拡散プレート(MBL社)を用いて測定した。

成 績

1) 疾患別 ENA-PHA 価の分布

図1のごとく、SLEではENA-PHA価が100倍以上の陽性のものは46例中29例(63.0%)で、その抗体価は3,200倍から819,200倍の間に分布していた。とくに陽性を示した29例中6例(20.7%)のものは819,200倍といった高値を示していた。

MCTDの7例はすべて抗ENA抗体陽性で、その抗体価は204,800倍以上と非常に高値であった。また、蛍光抗体法によるANFの染色型はspeckled patternであった。

RNase 抵抗性 ENA 抗体はSLEの46例中9例(19.6%)に認められたが、MCTDやSJSでは検出されなかった。

2) ENA-PHA法とENA-1テストの相関
ENA-PHA法による抗ENA抗体価が100倍以上のものは、すべてENA-1テストによる抗RNP抗体が陽性であり、ENA-PHA価が100倍以下のものにはENA-1テストで陽性のものは認められず、両者の陽性例は完全に一致した成績であった(図2)。

また、ENA-PHA法によるRNase抵抗性ENA抗体は55例中9例(16.4%)に認められ、ENA-1テストでも同じ症例に抗Sm抗体が検出されており、両者がまったく同一の成績であった(図3)。

3) ENA-PHA法とENA-1テストの検出率

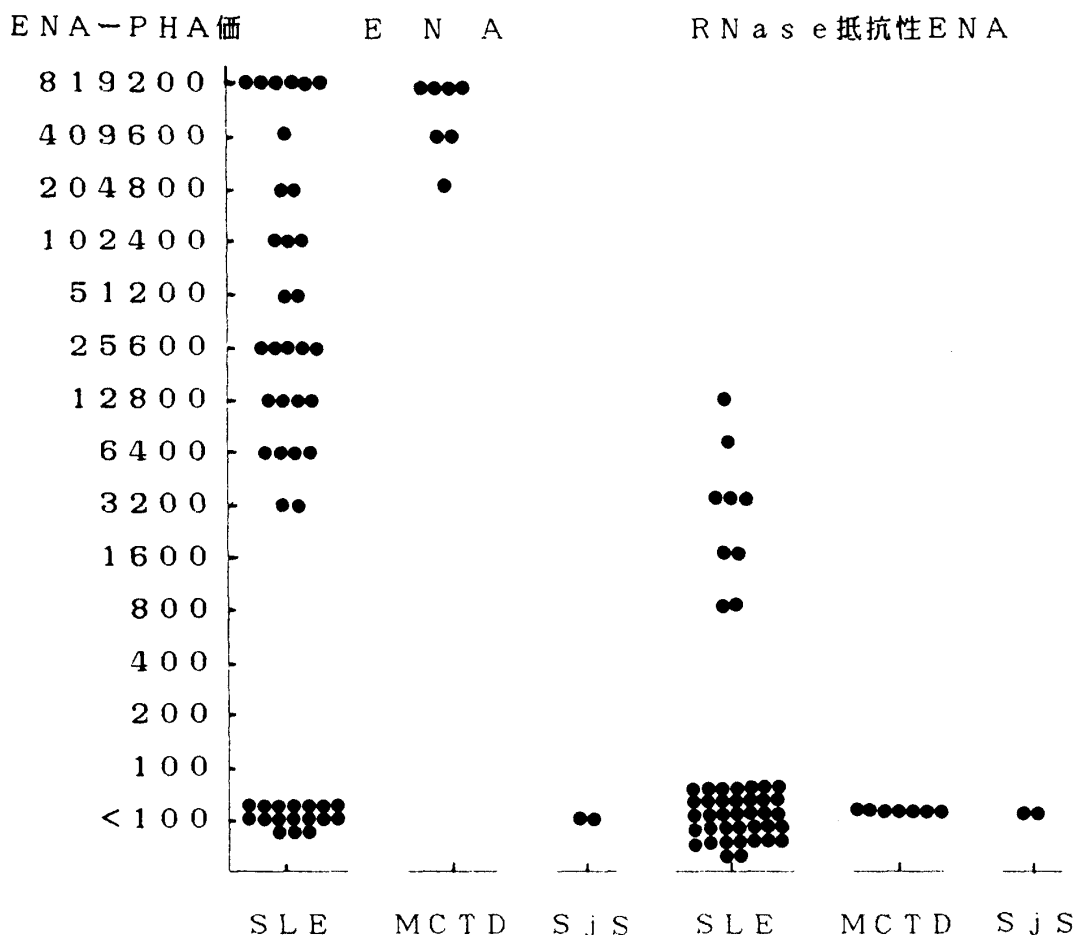


図1 疾患別 ENA-PHA 価の分布 (55例)

ENA-1テスト

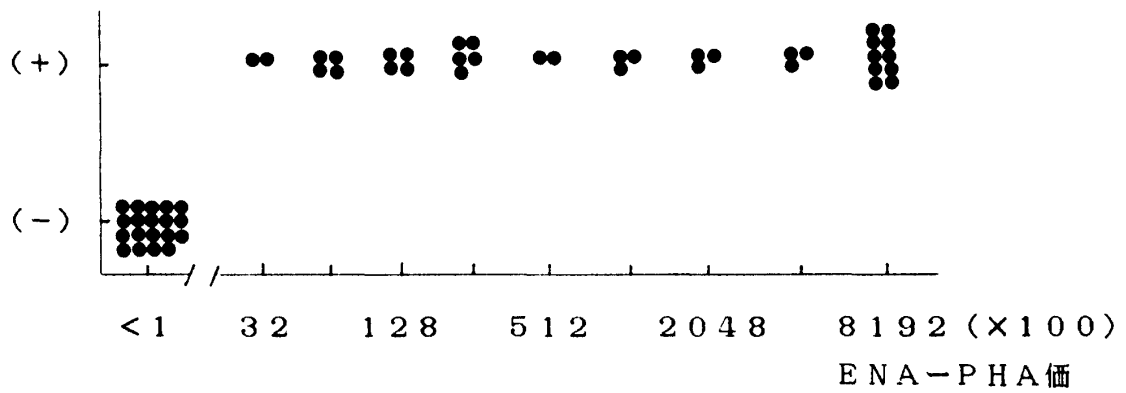


図2 ENA-PHA法とENA-1テストの相関 (55例)

ENA-1テスト

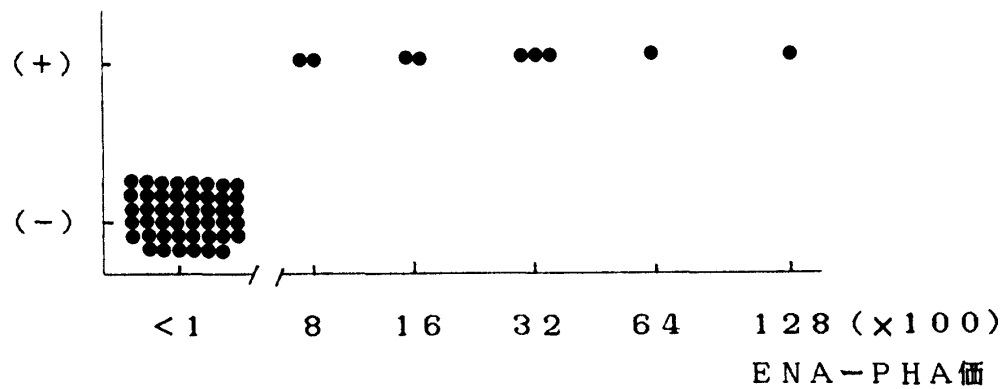


図3 ENA-PHA法とENA-1テストの相関 (55例)

方法 抗体	ENA-PHA価		ENA-1テスト	
	100倍以上	100倍以下	+	-
ENA (RNP)	36 (65.5)	19 (34.5)	36 (65.5)	19 (34.5)
Sm (RNase 抵抗性ENA)	9 (16.4)	46 (83.6)	9 (16.4)	46 (83.6)

() : %

表1 ENA-PHA法とENA-1テストの検出率 (55例)

ENA-PHA 法による抗ENA抗体は表1のごとく、55例中36例(65.5%)に認められ、ENA-1テストでも同一症例に抗RNP抗体が検出された。

また、ENA-PHA 法によるRNase 抵抗性ENA抗体は55例中9例(16.4%)に検出され、抗ENA抗体陽性例の36例中の25.0%に認められた。ENA-1テストでの抗Sm抗体はENA-PHA 法によるRNase 抵抗性ENA抗体陽性例に検出された。

一方、ENA-PHA 法陰性のものにはRNase 抵抗性ENA抗体は認められず、ENA-1テストでも抗RNP抗体、抗Sm抗体のいずれも認められなかった。

4) 各種抗体と補体系の経時的変動

図4に示したように、6例について経時的に各種抗体、補体系の変動を観察したところ、ENA-PHA 価の変動が著しく、C₃、C₄ 値の動きと比較的一致していた。しかし、ANF 価、抗DNA抗体の有無、CH50の値はENA-PHA 価の変動と無関係に一定の測定値が持続していた。

考 察

蛍光抗体法によるANFの染色型においてspeckled型を示すものについては、その臨床的意義に不明の点が多かった。しかし、1966年Tanら¹⁰⁾による抗ENA抗体の一つである抗Sm抗体の発見をかわきりに、1971年Mattioliら¹⁾により抗RNP抗体が発見された。時を同じくしてSharpら⁸⁾⁹⁾が抗ENA抗体の概念を提唱し、さらに抗RNP抗体が高値を示すMCTDという新しい疾患について発表したのを契機に、抗ENA抗体の性状、分類が明確になりつつあり、臨床的意義づけも次第に確立されてきた。

検出方法としてはTanら¹⁰⁾あるいはMattioliら¹⁾は免疫拡散法を、Sharpら⁹⁾はENA-PHA法を使用しており、今日でもこの二法が主に利用されている。しかし、ENA-PHA法については特異性などについての問題点が東條ら¹¹⁾により指摘されてきた。

今回、われわれはカイノス社により開発され

たENA-PHA法試薬の日常臨床検査法としての有用性について検討を試みた。ENA-PHA法による抗ENA抗体と、ENA-1テストによる抗RNP抗体の検出率は、著者らの成績では55例中36例(65.5%)に検出され、両反応間で完全に一致していた。陽性率についてみると、宮脇ら³⁾はENA-PHA法で66.2%、ENA-1テストで67.6%と著者らの成績と同様であった。また、千田ら⁷⁾はENA-PHA法が42.5%、ENA-1テストが37.7%で、著者ら、宮脇ら³⁾の成績に比べると低率であった。これは非活動期のSLEのほかにはリウマチ様関節炎、強皮症、SJSなど陽性率の低い疾患が多数含まれていることが影響していると考えられる。また、宮脇ら³⁾や千田ら⁷⁾の成績では両反応間に3%から5%の不一致症例が認められ、とくにENA-1テストが陰性でENA-PHA法が陽性を示すものが多くなっている。これがSharpら⁹⁾がENA-PHA法を発表して以来指摘されてきた非特異反応¹¹⁾のあらわれであるかも知れない。しかし、われわれの成績では両者はよく一致しており、今回使用した試薬による検査法では問題ないものといえる。

つぎに、SLEに特異的で、とくに活動期の症例に高頻度に認められるといわれている抗Sm抗体は、1966年Tanら¹⁰⁾により発見された抗ENA抗体の一つである。この抗体はRNaseにより処理しても抗原性が失われぬSc170,PM-1の抗原に対する抗体とともにRNase 抵抗性ENA抗体で、この三者の中ではもっとも高い力価をもつ抗体である。著者らの成績ではENA-PHA法によるRNase 抵抗性ENA抗体およびENA-1テストによる抗Sm抗体は、55例中9例(16.4%)に、抗ENA抗体陽性36例中の25%に認められ、検出例は両者間で一致していた。しかも、すべてSLEに認められ抗RNP抗体と共存していた。宮脇ら³⁾の成績ではENA-1テストによる抗Sm抗体陽性例は、136例中18例(13.2%)で、抗RNP抗体陽性の92例中の19.6%に検出されており、著者らの成績の方がわずかに高率であった。ま

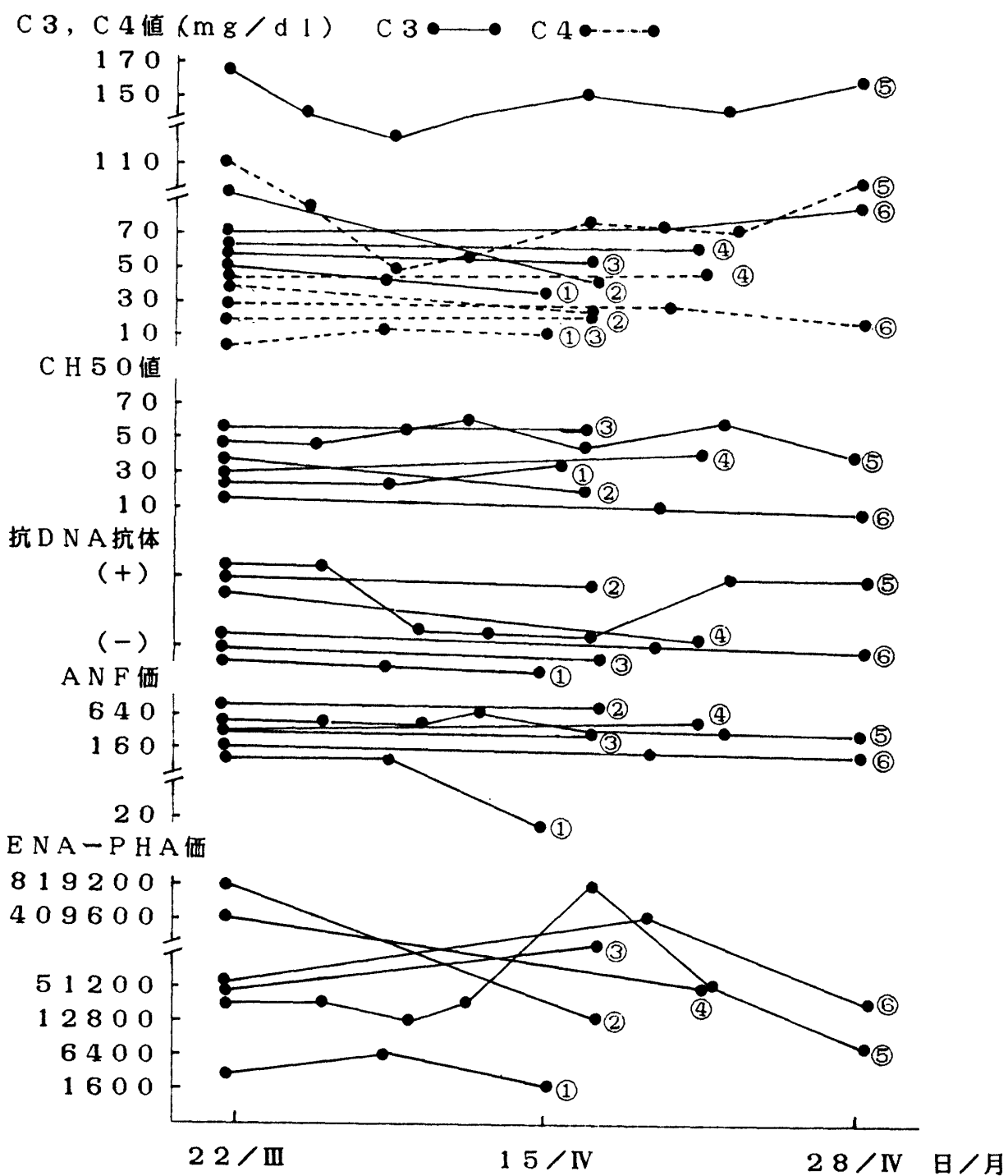


図4 各種抗体と補体系の経時的変動 (6例)

た、SLE以外の疾患で5.6%のものに抗RNP抗体と抗Sm抗体が共存しており、特異性に問題があるとしているが、今回、著者らが用いたENA-PHA法試薬ではENA-1テストと一致した成績であり、非特異反応は認められなかった。

現在、ENA-PHA法のENA感作赤血球を作製する場合、ENA抗原の固定赤血球への感作量あるいはRNase処理の条件などが研究者により異なっており、基礎的研究がもっと必要であろう。しかし、抗体価の定量ができ、臨床的経過観察にも適しているなどの臨床検査法としての有用性が示唆された。

MCTDにおいては抗RNP抗体が特異的に、しかも単独で検出されるといわれてきた。著者らの成績ではENA-PHA法による抗ENA抗体は全例に検出され、その抗体価はすべて204,800倍以上の高値であり、RNase抵抗性ENA抗体は認められなかった。同時にENA-1テストでも抗Sm抗体は認められず、抗RNP抗体のみが検出された。しかし、この抗体はSLEでも63.0%に認められている点が特異性の上で問題となる。同様の成績は千田ら⁷⁾、宮脇ら³⁾、Munvesら⁶⁾の報告にもみられることから、抗RNP抗体はMCTD以外の疾患、とくにSLEに多数検出され、MCTDにのみと必ずしもいえない。しかし、抗体価が高値を示しSm抗体が陰性ということで、他の疾患と鑑別できるかも知れない。いずれにしても抗RNP抗体は自己免疫疾患で広く認められる抗体と考えるべきであろう。

今回、開発されたENA-PHA法試薬による成績では、過去に指摘されてきた単一抗原を得にくいことや、RNase処理の方法、条件によっては分解されない抗原があるなどの影響はみられなかった。

ENA-PHA法は抗ENA抗体の検出法として、感度、特異性および定量性にもすぐれており、有用な検査法と考える。

結 語

新たに開発されたENA-PHA法試薬により

抗ENA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) ENA-PHA法による抗ENA抗体が、ENA-1テストによる抗RNP抗体と同様に55例中36例(65.5%)に検出された。

2) ENA-PHA法によるRNase抵抗性ENA抗体が、ENA-1テストによる抗Sm抗体と同様に55例中9例(16.4%)に検出され、すべてSLEに認められた。

3) ENA-PHA法とENA-1テストの陽性例は完全に一致していた。

文 献

- 1) Mattioli, M. and Reichlin, M.: Characterization of a soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with SLE sera, *J. Immunol.* 107:1281~1290, 1971
- 2) Mayer, M. M.: *Experimental immunochimistry*, Chaptor 4.2nd ed. 133~240, Springfield III Charles, C., Thomas pub. 1961
- 3) 宮脇昌二, 坂本賢司, 小野寺英明: 抗RNP, Sm抗体検出のための二重免疫拡散法(ENA-1テスト)の検定, *臨床病理*, 33: 1025~1030, 1985
- 4) 宮脇昌二: 抗ENA抗体, *検査と技術*, 10: 868~873, 1982
- 5) 諸井泰興: 抗核抗体の診断的意義, *内科*, 51:410~414, 1983
- 6) Munves, E. F. and Schur, P. H.: Antibodies to Sm and RNP. Prognostications of disease involvement, *Arthritis Rheum.* 26:848~853, 1983
- 7) 千田靖子, 高村利治, 山岸幸造: 自己免疫疾患における抗ENA抗体の臨床的意義, *衛生検査*, 33:785~788, 1984
- 8) Sharp, G. C., Irvin, W. S., Laroque, R. L., Velez, C., Daly, V., Kaiser, A. D. and Halman, H. R.: Association of autoantibodies to different nuclear antigens with clinical patterns of rheumatic disease and

- responsiveness to therapy, J. Clin. Invest. 50: 350~359, 1971
- 9) Sharp, G.C., Irvin, W. S., Tan, E M, Gould, R.G., Halman, H. R.: Mixed connective tissue disease an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen(ENA), Am. J. Med. 52:148 ~159, 1972
- 10) Tan, E. M. and Kunkel H.G.: Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus, J. Immunol. 96: 464~471, 1966
- 11) 東條 毅, 早川正勝: 抗ENA抗体(抗RNP, 抗Sm), Medical Technology, 9:222~224, 1981
- 12) 山田 巖, 沢江義郎: Immuno-electrocytometry法による抗DNA抗体の検索, 九大医短部紀要, 7: 39~43, 1980