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

# 螢光抗体法による抗DNA抗体の検討

山田, 厳

澤江, 義郎

https://doi.org/10.15017/76

出版情報：九州大学医療技術短期大学部紀要. 3, pp.75-80, 1976-03-10. 九州大学医療技術短期大学部
バージョン：
権利関係：

# 螢光抗体法による抗DNA抗体の検討

山田　巖，　沢江義郎

## A Study of Anti-DNA Antibodies Using Fluorescent Antibody Techniques

Iwao Yamada and Yoshiro Sawae

### まえがき

膠原病の代表的疾患である全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）の血清学的診断法として，抗核抗体（ＡＮＦ）の検出が広く普及し，ルーチン検査法として欠くことのできないものとなっている。しかし，ＡＮＦはＳＬＥのみでなく，いろいろの疾患にも認められることが明らかとなっており，また，その抗体価は必ずしも病勢を表現してないように考えられる。

1957年にＳＬＥ患者の血清中に，抗核抗体の一つの因子として抗ＤＮＡ抗体の存在が報告され[1)2)3)]，ＳＬＥの活動期にのみ出現するといわれている。

著者らは変性ＤＮＡを抗原としたＤＮＡスポットテスト（スポット法），受身赤血球凝集反応（ＨＡ法），補体結合反応（ＣＦ法）により抗ＤＮＡ抗体の検出を試み，ＳＬＥにおける抗ＤＮＡ抗体の存在およびそれぞれの方法の比較を報告してきたが[4)]，さらに，抗ＤＮＡ抗体の免疫グロブリンクラス分類と，その臨床的意義を検討したので報告する。

表1　　ＳＬＥ以外の疾患

| | |
|---|---|
| 慢性関節リウマチ | 12 例 |
| 肝　疾　患 | 4 例 |
| 血　管　炎 | 2 例 |
| 強　皮　症 | 2 例 |
| 肺　線　維　症 | 1 例 |
| 自己免疫性溶血性貧血 | 1 例 |
| 赤血球形成不全症 | 1 例 |
| 皮　膚　筋　炎 | 1 例 |
| 橋　本　病 | 1 例 |

### 実験材料

九州大学医学部附属病院検査部血清検査室に，ＡＮＦ検査のため提出された62例，134検体を実験材料とした。ＳＬＥは37例，102検体であり，その他は表1に示すようないろいろの疾患であった。

### 実験方法

1）ＡＮＦ：抗原としてヒト白血球を用いる螢光抗体間接法により測定した。まず被検血清の8倍と32倍希釈血清によりスクリーニングを行い，陽性を示したものについては被検血清の倍数希釈列をつくり抗体価を測定した。

2）スポット法：抗原にはSigma製の仔牛胸腺から精製抽出されたＤＮＡを，リン酸緩衝食塩水で10mg/dl溶液とし，100℃で10分間煮沸後，氷水中にて急冷した変性ＤＮＡ溶液を用いた[5)]。

無螢光スライドグラスをゼラチン膜で被覆し抗原液を滴下して乾燥，固定後，被検血清をのせ，螢光抗体間接法により測定した。

ＦＩＴＣ標識抗血清は栄研製の螢光抗体法用抗ヒトガンマグロブリンウサギ標識抗体(γ-グ)と，医学生物学研究所製の抗IgG，抗IgM，抗IgAの標識抗体を用いた。

抗体価の測定には倍数希釈血清について同様の操作を行った。

判定はスポット全体に均等に特異螢光を発するものを陽性，周辺部のみに螢光を発するもの，無螢光のものを陰性とした。また，判定を一定にするために，とくに特異螢光が弱く，陽性，陰性の区別の困難なものについてはＦＴＡ用螢光強度判定装置（ＢＮＤ）を用いて1＋以上

のものを陽性とした。

3）CF法：抗原はスポット法で用いた変性DNA溶液を用い，松本の方法に準じて[6]，Box titrationにより測定した。

4）補体価：Mayerの50%溶血法により補体価（$CH_{50}$）を測定した[7]。

## 実験成績

1）ANF価とスポット価（図1，図2）

SLE37例のすべてがANF陽性で，そのうちスポット法による$\gamma$-グ型抗DNA抗体（$\gamma$-グ型）は29例（78.4%）に検出された。ANF価が高くなるにつれて$\gamma$-グ型抗体価も高値を示した。とくにANF価128倍以上のものは4倍以上の抗体価であった。

IgG型抗DNA抗体（IgG型）は，$\gamma$-グ型陽性の29例中，21例（72.4%）に検出され，ANF価128倍以上のすべてと，64倍の3例に陽性であり，その抗体価はANF価，$\gamma$-グ型抗体価の高いものほど高力価であった。

IgM型抗DNA抗体（IgM型）は，$\gamma$-グ型陽性の29例中，6例（20.7%）に検出され，ANF価が256倍以上，$\gamma$-グ型抗体価が16倍以上のものに陽性で，その抗体価はすべて1倍にすぎなかった。

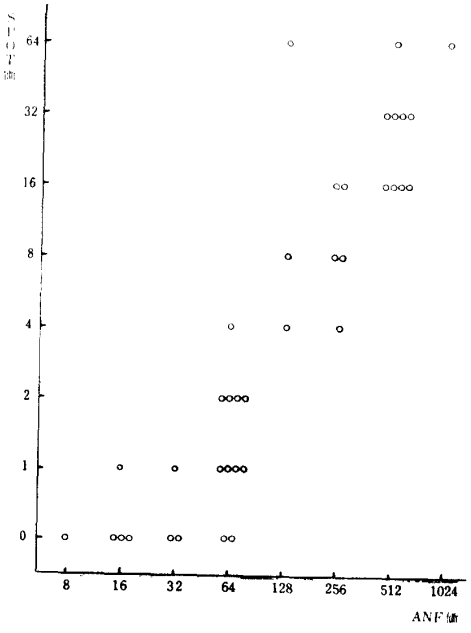


図1　ANF価とSPOT価
○$\gamma$-グロブリン

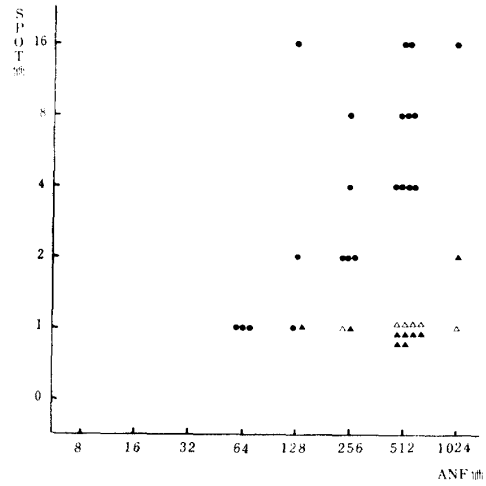


図2　ANF価とSPOT価
●IgG　△IgM　▲IgA

IgA型抗DNA抗体（IgA型）は，$\gamma$-グ型陽性の29例中，9例（31.0%）に検出され，ANF価が128倍以上，$\gamma$-グ型抗体価が16倍以上のものに限られ，その抗体価はANF価1,024倍，$\gamma$-グ型抗体価64倍の1例が2倍であったが，ほかはすべて1倍であった。

また，$\gamma$-グ型が検出されたにもかかわらず抗IgG，抗IgM，抗IgAのいずれの抗体とも反応してなかったクラス別不能のものが8例あった。

2）スポット価とCF価（図3，図4）

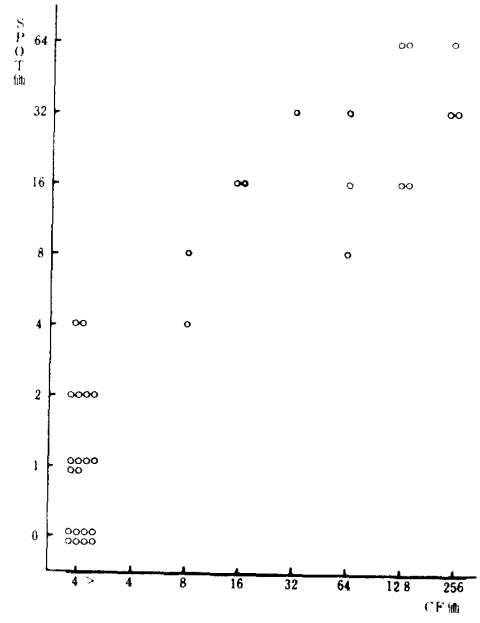


図3　SPOT価とCF価
○$\gamma$-グロブリン

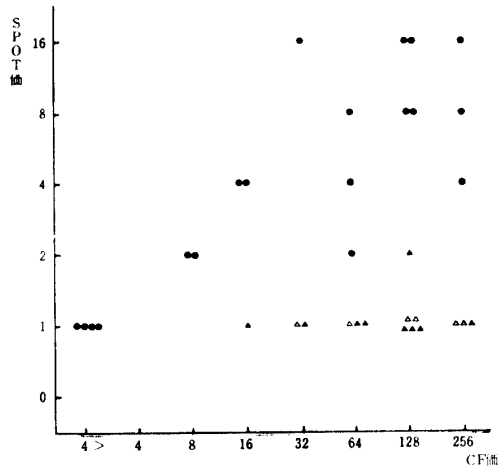


図4　SPOT 価 と CF 価
● IgG　△ IgM　▲ IgA

スポット法陽性の29例中，γ-グ型抗体価4倍以上，IgG型抗体価2倍以上の17例（58.6%）にＣＦ法による抗ＤＮＡ抗体陽性（抗補体作用の2例を含む）で，その抗体価は8倍以上で，IgM型，またはIgA型を含む症例はＣＦ法16倍以上の10例に認められた。ＣＦ価とスポット価の相関は比較的良好であった。

3）γ-グ型陽性例の免疫グロブリンクラス陽性率（表2）

IgG型はγ-グ型抗体価4倍以上のすべてと2倍のものの50.0%に陽性であった。

IgM型はγ-グ型抗体価64倍のものの66.7%，32倍のものの75.0%，16倍のものの16.7%に陽性で，γ-グ型抗体価16倍以上の13例中，6例（46.2%）に検出された。

IgA型はγ-グ型抗体価64倍のものの100%，32倍のものの50.0%，16倍のものの66.7%に陽性で，γ-グ型抗体価16倍以上の13例中，9例（69.2%）に検出された。

IgM型とIgA型はγ-グ型抗体価8倍以下のものには認められなかった。

表2　免疫グロブリンクラス陽性率

| γ | G | 免疫グロブリンクラス | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 抗体価 | 例数 | IgG | % | IgM | % | IgA | % |
| 64 | 3 | 3 | 100 | 2 | 66.7 | 3 | 100 |
| 32 | 4 | 4 | 100 | 3 | 75.0 | 2 | 50.0 |
| 16 | 6 | 6 | 100 | 1 | 16.7 | 4 | 66.7 |
| 8 | 3 | 3 | 100 | | | | |
| 4 | 3 | 3 | 100 | | | | |
| 2 | 4 | 2 | 50.0 | | | | |
| 1 | 6 | | | | | | |
| 0 | 8 | | | | | | |

4）ＳＬＥ以外の疾患のＡＮＦ価とスポット価（図5）

ＡＮＦ陽性のＳＬＥ以外の疾患は表1に示したように，慢性関節リウマチの12例，肝疾患4例，強皮症2例など25例であった。

ＡＮＦ価はすべて64倍以下で，γ-グ型が25例中，血管炎，自己免疫性溶血性貧血，強皮症にそれぞれ1例ずつ3例（12.0%）に認められたが，IgG型，IgM型，lgA型はいずれも検出されなかった。

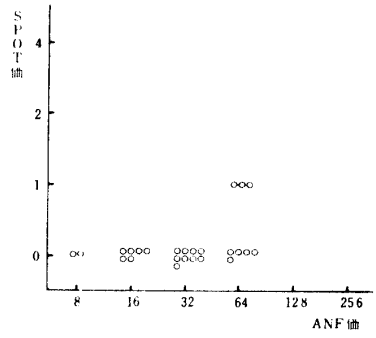


図5　SLE以外の疾患のANF価とSPOT価

5）$CH_{50}$とスポット価（図6）

$CH_{50}$が20以下ではγ-グ型抗体価は16倍以上，IgG型抗体価は4倍以上であり，しかも，IgM型とlgA型の両方または一方を含むものであった。

$CH_{50}$が23のものはγ-グ型抗体価は16倍，IgG型抗体価は4倍であったが，IgM型とIgA型は含まれていなかった。

$CH_{50}$が30になるとγ-グ型抗体価は4倍以下で，IgG型抗体価は1倍といずれも非常に低い抗体価であった。

$CH_{50}$が35以上の正常域から高値を示したものは，γ-グ型抗体価が2倍，IgG型抗体価が1倍の1例を除きスポット法は陰性であった。

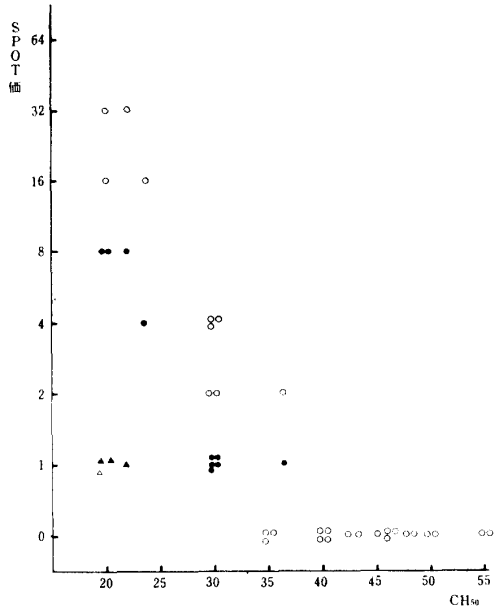


図６　$CH_{50}$ と SPOT 価
○γ-グロブリン　●IgG　△IgM　▲IgA

6）$CH_{50}$とＣＦ価（図７）

$CH_{50}$ が20の低値を示したものはＣＦ法陽性であったが，$CH_{50}$ が30以上に回復してくるとＣＦ法は陰性となり，$CH_{50}$とＣＦ価には明瞭な負の相関が認められた。

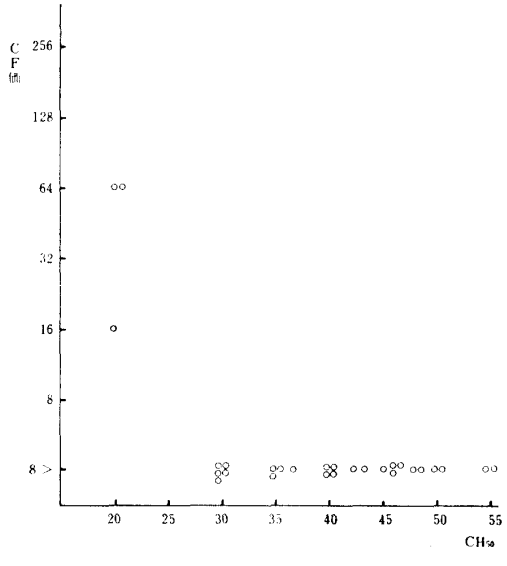


図７　$CH_{50}$ と CF 価

7）抗ＤＮＡ抗体価の経時的変動

同一症例で抗ＤＮＡ抗体を経時的に追求できたのは少なかったため，その１例を呈示する（図８）。

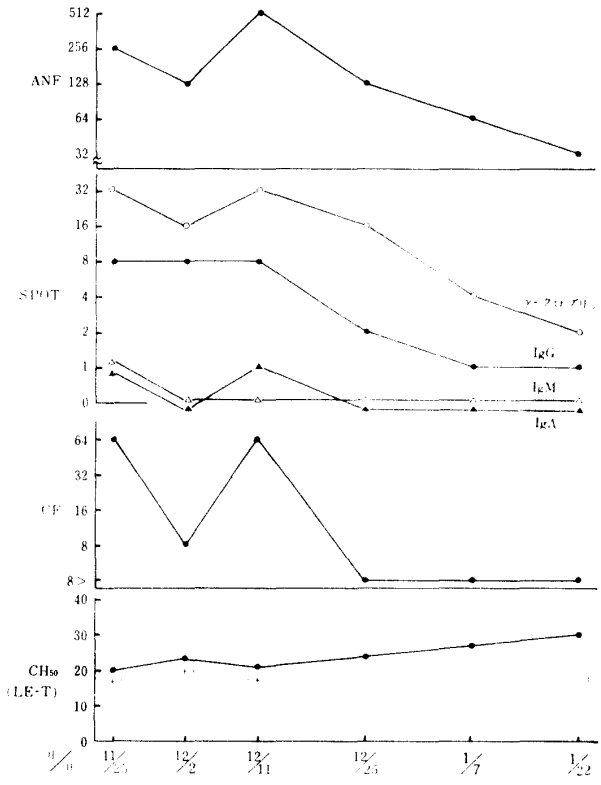


図８　症例 Y. H. 27才（♀）の経時的観察

$CH_{50}$が20の活動期にはＡＮＦ価256倍，抗ＤＮＡ抗体のγ-グ型抗体価32倍，IgG型抗体価８倍，IgM 型と IgA 型の抗体価は１倍であったが，その後，抗体価の低下と $CH_{50}$ のわずかの上昇があり，回復の徴候がみられたが再び増悪した。この間の各種の抗体価の動きは同じであった。以後治療によりＡＮＦ価，γ-グ型抗体価，IgG 型抗体価はそれぞれ低下し，IgM 型抗体価，IgA 型抗体価，ＣＦ価およびＬＥテストは早急に陰性化し，$CH_{50}$ も 30に回復した。

## 考　　察

ＳＬＥの血清学的診断法として，最近ではＡＮＦの検出が普及しており，さらにＡＮＦの免疫グロブリンクラス測定とその意義について多数の報告がなされている。

一方，抗ＤＮＡ抗体はＳＬＥに特異的に出現

するといわれ，仔牛胸腺由来のDNAを抗原としてスポット法，HA法，CF法などが広く試みられている。DNA抗原については，native DNAとdenatured DNAがあり，抗DNA抗体との反応性について相違が指摘されている[8]。

著者らはdenatured DNAを抗原としてスポット法，CF法による抗DNA抗体を測定しさらに免疫グロブリンクラス分類を試みた。また，$CH_{50}$との関連，経時的変動についても検討した。

SLE37例のすべてANF陽性で，スポット法によるγ-グ型は29例（78.4%）に検出された。富永らの94.1%，Segoviaら[10]の83%に比して陽性率はわずかに低かった。しかし，著者らがさきに報告[4]した56.7%よりも高い陽性率であった。この著者らの成績に差異がみられたのは，実験期間を短かく限ったため，その期間中の活動性SLE患者の多少が影響しており，さらに実験操作の技術的向上も大きな因子と考えられる。

γ-グ型陽性29例のうちIgG型は21例(72.4%)に検出され，その抗体価が2倍以上のものは活動期の症例であった。

また，IgG型抗体価が1倍の4例は，治療により抗体価が1/8から1/16に低下して1倍になった2症例と，この実験のあと増悪がみられた2症例で，この4症例とも臨床的には寛解期と判定された。SLEの活動性の判定には，いろいろの成績から総合判定されるが，$CH_{50}$が正常化しても，IgG型が弱陽性の間は寛解状態にあると考えるのは問題であるかも知れない。

IgM型，IgA型陽性の症例はANF価128倍以上，γ-グ型抗体価16倍以上の13例のうちIgM型は6例（46.2%），IgA型は9例（69.2%）に検出された。

IgM型とIgA型の抗体価は低値であるが，増悪と寛解のくり返しがみられた長期経過中の活動期の症例と，あとで述べるが，$CH_{50}$が25以下の低値の症例に認められた。

γ-グ型抗体価が低値のものに免疫グロブリンクラス分類不能のものが，SLEに8例，SLE以外の3例に認められた。

このような現象がみられた原因としては，抗血清そのものに問題があるのかも知れないが，精製分離された免疫グロブリン以外の何らかの非特異的なものの関与，あるいは相乗的なものによるとも考えられる。

1967年，Koffler ら[11]によってDNAのimmune complexesが，SLE患者のループス腎炎と関係するとし，1968年，Tojo ら[12]が補体結合性抗DNA抗体がループス腎炎の成因の一つであることを明らかにした。

CF法陽性のものはγ-グ型抗体価4倍以上で，IgG型抗体価は2倍以上のものであり，すべて活動性の症例であった。補体結合性抗DNA抗体はループス腎炎はもとより，SLEの活動性とも相関し，SLEの血清学的診断上有意義であることは$CH_{50}$との関係からも明らかである。しかし，高度の技術が要求されること，結果を得るまで24時間を要し，さらに抗補体作用を示すものがウイルス，梅毒のCF法に比較して高率であるとの理由から，ひろく用いられていない。

補体学の進歩により，各種疾患における$CH_{50}$を測定し，その変動を比較検討することは，その疾患の病因を追求する意味からも，治療，予後を判定する上からも非常に重要になってきた。SLEの活動期に$CH_{50}$が異常な低値をみることを初めて報告したのは，1951年，Vanghanら[13]である。わが国では森田ら[14]，Asanoら[15]の詳細な研究があり，SLEの活動期に$CH_{50}$は著明に低下し，治療により漸次上昇し正常域に回復し，ANF価，抗DNA抗体価と相関すると報告されている。

著者らの成績においても症例（図8）に示されているように，$CH_{50}$とANF価，スポット価の間には同じような抗体価の動きがみられ，しかも，$CH_{50}$の動きはSLEにおける定型的パターンを示した。また$CH_{50}$が25以下の低値のものにのみIgM型，IgA型が検出されたことは興味あることである。

ANF陽性のSLE以外の疾患では，γ-グ型の抗DNA抗体が3例，12%に陽性であったが

その抗体価は低値で，しかも，抗IgG，抗IgM，抗IgAのいずれにも反応を示さない，SLEの一部に認められたと同じ性状のものであった。これらの症例は詳細に検討するとSLEとのOverlap Syndromeといえるものかも知れない。今後さらに検討を要する問題である。

## 結　　語

1）SLE 37例のすべてにANF陽性であり，γ-グ型は29例（78.4%）に検出された。

2）γ-グ型陽性29例中，IgG型は21例（72.4%），IgM型は6例（20.7%），IgA型は9例（31.0%）に検出され，ANF価128倍以上，γ-グ型抗体価16倍以上の高いものではIgG型，IgM型，IgA型に分類可能であり，しかも活動期の症例であった。

3）γ-グ型陽性にもかかわらず，免疫グロブリンクラス分類不能のものがSLE 8例，SLE以外の疾患で3例認められた。

4）$CH_{50}$の低下した症例は抗DNA抗体陽性で，それは大部分が補体結合性で，IgG型であり，高抗体価のものにはIgM型，IgA型も含まれていた。しかも，$CH_{50}$の変動と平行して，抗DNA抗体価も変化した。

## 文　　献


1) Ceppellini, R., Polli, E. and Celada, F.: A DNA-Reacting Factor in Serum of a Patient with Lupus Erythematosus Diffusus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:572, 1957.

2) Robbins, W. C., Holman, H. R., Deicher, H. and Kunkel, H. G.: Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575, 1957.

3) Seligmann, M.: Evidence for the presence in the serum of patient with lupus erythematosus disseminatus of a substance determing a precipitation reaction with a deoxyribonucleic acid. C. R. Acad. Sci. 245:243, 1957.

4) 山田巌，沢江義郎，森田耕作：抗DNA抗体検出法の検討．最新医学，31:176, 1976.

5) Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I. and Kunkel, H. G.: Deoxyribonucleic Acid (DNA) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with SLE. J. Clin. Invest. 45:1732, 1966.

6) 松本勲：全身性エリテマトーデスの臨床的，血清学的研究．リウマチ，11:356, 1971.

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

8) 本間光夫，高永教洋：抗核抗体の意義．SLEをめぐって．Medicina, 11:1068, 1974.

9) 高永教洋：全身性エリテマトーデスにおける抗DNA抗体の研究．日内会誌，57:325, 1968.

10) Segovia, D. A., Fishbein, E., Alcala, H. et al: The range and specificity of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 6:557. 1970.

11) Koffler, D., Schur, P. H. and Kunkel, H. G.: Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med. 126:607, 1967.

12) Tojo, T. and Friou, G. J.: Lupus Nephritis. Varing Complement-Fixing Properties of Immunoglobulin G Antibodies to Antigens of Cell Nuclei. Science. 161:904, 1968.

13) Vanghan, T. H. et al: Complement in SLE. J. Lab. Clin. Med. 37:698, 1951.

14) 森田実，西下駿三，天野哲基，他：SLEの血清補体価に関する研究．アレルギー，20:159, 1971.

15) Asano, S., Marumo, K., Igaki, Y. et al: Serum complement in systemic lupus erythematosus (SLE). アレルギー，17:597, 1968.