

《ノート》

リコンビジエン抗DNAキットを用いた抗DNA抗体価測定の基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation in Measurement of Anti-DNA Antibody by Recombigen Anti-DNA Kits

伊藤 光泰* 鈴木 啓子* 後藤 吉規* 奥川 忠正*

Mitsuyasu ITOH, Hiroko SUZUKI, Yoshinori GOTO and Tadamasa OKUGAWA

Third Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

I. 緒 言

抗DNA抗体の検出はSLEの診断・疾患活動性の評価に際して重要な手掛かりを与えてくれるものである^{1~5)}が、従来その測定については感度・特異性で種々の問題があった。radioimmunoassay(RIA)法による抗DNA抗体の測定は感度の点で受身球血凝集(PHA)法などに比し優れている^{3,6,7)}が、補体等の血清成分の影響を受けること^{8~11)}から、非効化などの操作を必要とする煩雑さがあった。また、SLEの疾患特異性についても決して十分といえるまでには至っていない。今回、われわれは遺伝子工学の手法により大腸菌由来プラスミドから制限酵素にて切断することにより得られた高純度の¹²⁵I-recombinant DNAを用いた抗DNA抗体RIAキットを使用し、その基礎的ならびに臨床的検討を試みた。

II. 測 定 方 法

1) 本キットの構成および内容

(1) ¹²⁵I-DNA

(2) 抗DNA抗体標準血清

6濃度(0, 5, 10, 25, 50, 100 U/ml)の標準血清が用意されている。

(3) 抗DNA抗体コントロール

2種類(1:低値, 2:高値)のコントロール血清が用意されている。

(4) B/F分離剤(61%飽和硫酸アンモニウム溶液)

2) 操作手順

(1) 検体(血清)または各濃度の標準血清25μlを、チューブに入れる。

(2) ¹²⁵I-DNA 200μlを各チューブに加えて混和する。

(3) 37°Cで2時間インキュベートする。

(4) B/F分離剤を1.0mlずつ加え混和する。

(5) 2,000×gで15分間遠心する。

(6) 各チューブから上清をデカントまたは吸引にて完全に除去する。

(7) チューブの放射能をガンマカウンターにて1分間計測する。

(8) 各標準血清のB/T(%)から、標準曲線を作成して検体の抗DNA抗体価を算出する。

III. 実験方法および実験対象

測定法に関する基礎的検討として、インキュベーション温度および時間の標準曲線に及ぼす影響、

Key words: Recombinant, DNA, Double-stranded, Antibody, SLE.

* 浜松医科大学第三内科

受付: 63年8月25日

最終稿受付: 63年10月26日

別刷請求先: 浜松市半田町3600 (番431-31)

浜松医科大学第三内科

伊藤光泰

各種血清成分・抗凝固剤の影響、再現性、回収率、 56°C 、30分間加熱による非働化の影響、測定された抗体の特異性などを検討した。

臨床的有用性についての対象は健常成人92例、全身性エリテマトーデス(SLE)52例、慢性関節リウマチ(RA)38例、悪性関節リウマチ(malignant RA)1例、結節性動脈炎(PN)4例、進行性強皮症(PSS)14例、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)および混合性結合織病(MCTD)各3例、Sjögren症候群9例、Behcet病6例、過敏性血管炎および大動脈炎症候群各1例、自己免疫性甲状腺疾患47例、糖尿病10例の計281例である。一部の検体についてこれらの測定値とAmersham社製抗DNA抗体キットによる測定値と比較検討した。

実験に使用した標準血清は日本DPCより供与された同一ロット血清を用いた。Cold DNAとして大腸菌により産生され制限酵素にて切断した二重鎖 recombinant DNA(dsDNA: M.W. 7.84×10^5 Da)およびそれを 100°C 加熱急速冷却して作製した一重鎖 DNA(ssDNA)を使用した。Clqは米増の方法¹²⁾により精製し、 α_2 -macroglobulinはSigma社製、ヘパリンはノボ社製を用いた。

IV. 結 果

(1) Incubation 時間、温度の影響

(Fig. 1, Table 1)

標準曲線に及ぼす、incubation 時間と温度の影響について検討した。incubation 時間については30分、1時間、2時間、4時間において標準曲線に差が認められなかった。また、incubation 温度の検討では同じく、 4°C 、室温、 37°C のいずれにおいても標準曲線には全く差を認めなかった(Fig. 1)。低結合率および高結合率を示す2検体につき温度による影響をみると、その測定値はTable 1に示したように、2検体とも温度の上昇とともに測定値は高くなる傾向を示した。時間の影響では2検体ともに時間とともに抗体値の上昇を示したが、2時間ではほぼ平衡状態に達した。

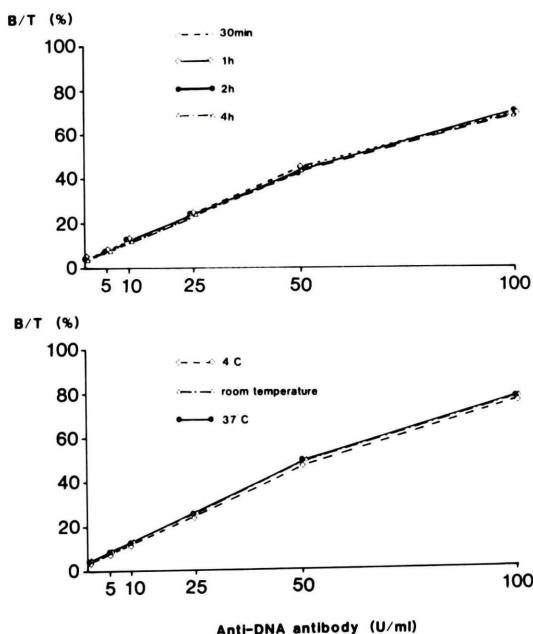


Fig. 1 Effects of incubation time and temperature.

Table 1 Effects of incubation time and temperature on the measurements of serum sample

1) Temperature

| Sample | (A) | (B) |
|----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 4°C | $8.2 \pm 0.4 \text{ U/ml}$ | $26.0 \pm 0.8 \text{ U/ml}$ |
| Room temperature | 11.0 ± 0.7 | 31.5 ± 1.3 |
| 37°C | 13.6 ± 0.3 | 38.8 ± 0.8 |

n=3, mean \pm SD

2) Incubation time

| Sample | (A) | (B) |
|---------|----------------------------|-----------------------------|
| 30 min | $9.2 \pm 0.6 \text{ U/ml}$ | $28.9 \pm 3.1 \text{ U/ml}$ |
| 60 min | 11.3 ± 0.4 | 32.0 ± 0.1 |
| 120 min | 12.4 ± 0.3 | 38.5 ± 1.1 |
| 240 min | 12.5 ± 1.8 | 42.0 ± 3.6 |

n=3, mean \pm SD

(2) 血清成分による影響 (Fig. 2)

次にRIA法による抗DNA抗体測定に影響すると報告されているClq、 α_2 -macroglobulin、heparin、および赤血球溶血の影響について検討した。Clqおよび α_2 -macroglobulinについては、高力価の抗DNA抗体を含む血清と低力価の抗DNA

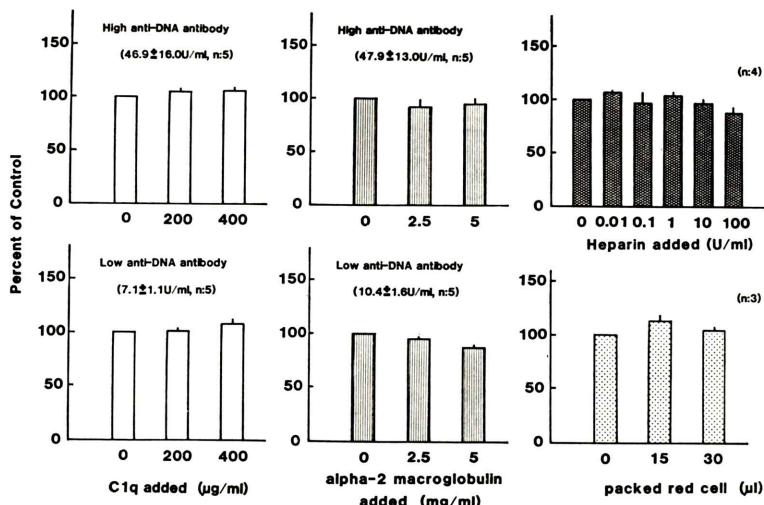


Fig. 2 Effects of C1q, alpha-2 macroglobulin, heparin and packed red cell on the binding of anti-DNA antibody to ¹²⁵I-DNA.

抗体を含む血清に、C1q は最終濃度 200, 400 µg/ml, α₂-macroglobulin について 2.5, 5 mg/ml を添加した。ヘパリン 0.01~100 U/ml, 15 または 30 µl の濃縮赤血球液添加の影響についても検討した。いずれも無添加時の値を 100% として比較した。これら血清成分およびヘパリンは測定値に有意な変化を及ぼさなかった。

(3) 再現性 (Table 2)

抗体価の異なる 5 検体を用い 10 回の測定を行って得た intraassay variation の CV 値は 2.1~7.0%，同じく 6 検体につき 6 回測定して得た interassay variation は CV 値 1.1~6.1% でいずれも十分満足すべき値が得られた。

(4) 回収率・非働化の影響 (Table 3)

既知の 18.75 U/ml のサンプル血清に 2.5~50 U/ml の標準血清を添加して得た回収率は予測値の 98.8~109.5%，mean ± SD 103.1 ± 4.3% と良好な結果が得られた。

非働化の影響をみるため 12 検体につき未処理の検体と非働化後の検体につき、それぞれ無処理と非働化処理を行った標準血清により作製した標準曲線から求めた値を比較した。標準血清を非働化すると ¹²⁵I-DNA への結合率は無処理の場合に比

Table 2 Precision and reproducibility of the assay

1) Intraassay variation

| | (U/ml) | | | | |
|---------|--------|------|------|------|------|
| No. (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | |
| n | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| mean | 11.8 | 23.5 | 40.5 | 41.1 | 72.0 |
| SD | 0.63 | 1.07 | 0.86 | 2.86 | 3.37 |
| CV (%) | 5.4 | 4.5 | 2.1 | 7.0 | 4.7 |

2) Interassay variation

| | (U/ml) | | | | | |
|---------|--------|------|------|------|------|-------|
| No. (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | |
| n | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| mean | 10.8 | 11.5 | 21.1 | 37.4 | 39.4 | 165.2 |
| SD | 0.63 | 0.34 | 0.83 | 1.48 | 0.34 | 10.3 |
| CV (%) | 5.9 | 3.0 | 3.9 | 4.0 | 1.1 | 6.1 |

較して、0 U/ml で 90 ± 0% (mean ± SD)，5 U/ml 87 ± 6%，10 U/ml 85 ± 2%，25 U/ml 83 ± 1%，50 U/ml 85 ± 1%，100 U/ml 80 ± 3% と軽度の結合率低下を認めた。検体、標準血清ともに非働化した場合、非働化後の値は無処理の 87.5~113.7%，mean ± SD 98.8 ± 7.9% であった。また、両者の測定値には $r=0.99998$ の相関があった。一方、7 検体につき非働化処理を行った場合と行わなかつた場合につき、無処理の標準血清を用いて作成し

Table 3 Recovery study and the effect of inactivation

1) Recovery study

| Sample | Added sample | Expected value | Measured value | Recovery (%) |
|-------------------|--------------|----------------|----------------|--------------|
| 18.75 | 2.50 | 21.25 | 21.0 | 98.8 |
| (U/ml) | 5.00 | 23.75 | 26.0 | 109.5 |
| | 12.50 | 31.25 | 31.9 | 102.1 |
| | 25.00 | 43.75 | 43.7 | 99.9 |
| | 50.00 | 68.75 | 72.4 | 105.3 |
| mean±SD 103.1±4.3 | | | | |

2) Effect of inactivation

| Sample | Untreated sample | Inactivated sample | Recovery (%) |
|-------------|------------------|--------------------|--------------|
| 1 | 184.4 | 193.2 | 104.8 |
| 2 | 2,296.0 | 2,300.0 | 100.2 |
| 3 | 36.1 | 36.0 | 99.7 |
| 4 | 22.1 | 21.5 | 96.8 |
| 5 | 21.6 | 20.0 | 92.6 |
| 6 | 78.2 | 69.7 | 89.1 |
| 7 | 18.4 | 16.1 | 87.5 |
| 8 | 40.0 | 39.5 | 98.8 |
| 9 | 40.6 | 37.9 | 93.3 |
| 10 | 39.3 | 44.7 | 113.7 |
| 11 | 53.5 | 58.9 | 110.1 |
| 12 | 39.0 | 38.8 | 99.5 |
| $r=0.99998$ | | mean±SD 98.8±7.9 | |
| $p<0.0001$ | | | |

た標準曲線から読み取った測定値の比較では非働化後の値は非働化しなかった場合の 73.5~91.7%, mean±SD 82.2±6.8% であった。以上から、本測定法では非働化により標準血清、検体ともに結合率が約 10~20% 低下するが、両者の低下率はほぼ一致し、非働化の有無による差はほとんどないと考えられた。

(5) 他社製抗 DNA 抗体 RIA キットとの相関 (Fig. 3)

同一検体における本法による抗 DNA 抗体値と Amersham 社製抗 DNA 抗体キットによる測定値との相関をみると $r=0.846$ と良好な相関を示したが、一部に測定値の解離が認められた。SLE 以外の検体は全例本法による測定値が Amersham 社製抗 DNA 抗体による測定値より低値を示した。一方、SLE の検体では本法のみ

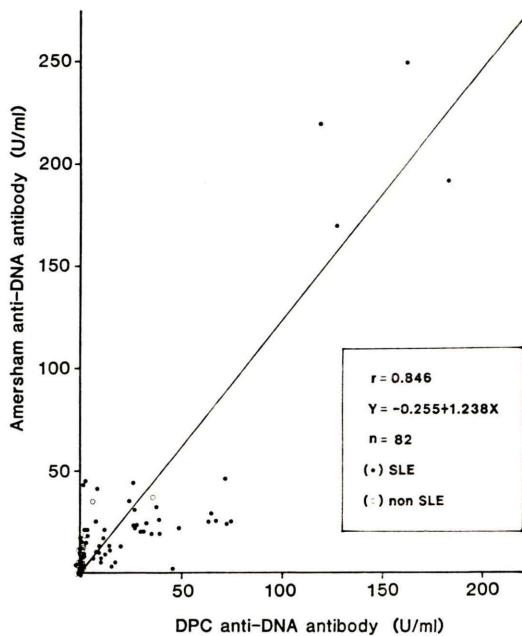


Fig. 3 Correlation between anti-DNA antibody values by Recombigen anti-DNA kit and those by Amersham kit. (●) patients with SLE, (○) control subjects and patients with rheumatic diseases other than SLE.

高値を示す例が、本法のみ低値を示す例よりやや多かった。

(6) 正常者および各種疾患における抗 DNA 抗体値 (Fig. 4)

本測定法による正常者および各種疾患の抗 DNA 抗体値を示す。健常成人 92 例の mean±SD は 5.16 ± 2.33 U/ml であり、mean+2 SD から求めた正常値は 9.81 U/ml 以下である。活動性の SLE 32 例では 130.7 ± 533.0 U/ml で 69% (22/32) が正常範囲を超えて有意に上昇がみられ ($p<0.005$)、一方非活動性の SLE 20 例では 9.4 ± 16.1 U/ml で 30% (6/20) が正常範囲を超えていた。活動性および非活動性 SLE 間には有意な差が認められた ($p<0.01$)。非活動性で抗 DNA 抗体値の上昇がみられた 6 例はいずれも 1 年以上軽度の紅斑、抗核抗体を認める以外、症状・所見とも異常なく、プレドニゾロン 1 日量 5 mg 以下にて維持

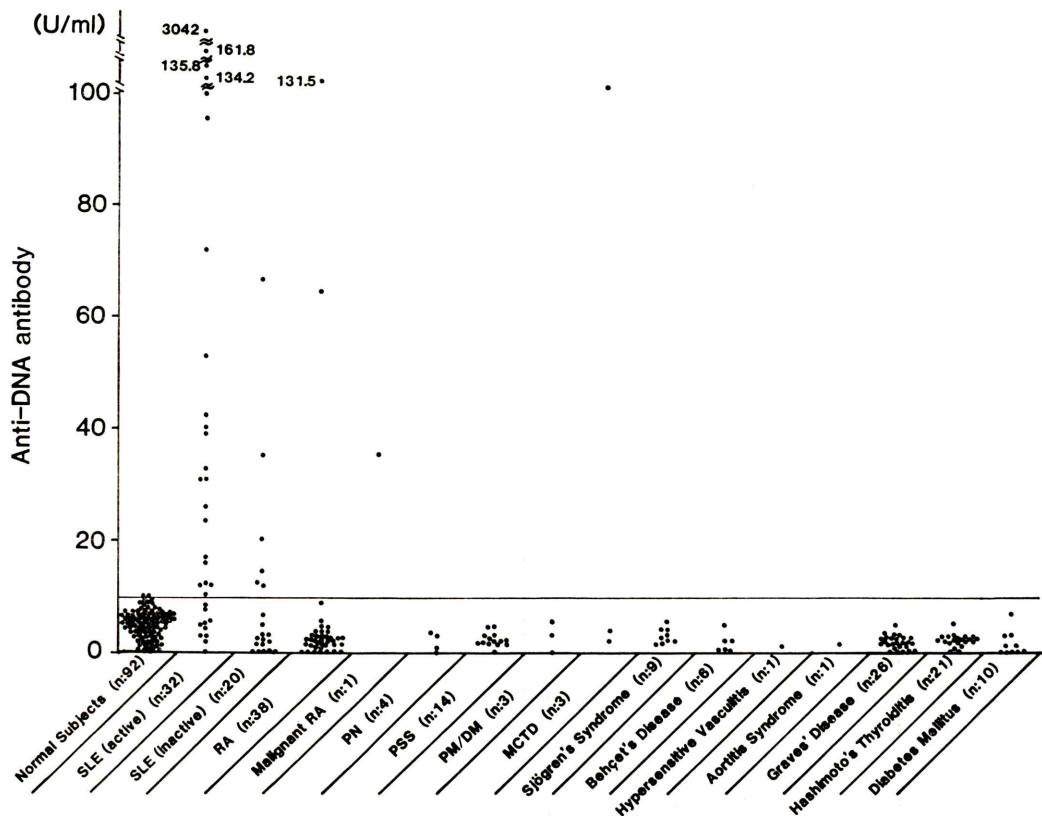


Fig. 4 Titers of anti-DNA antibody in various disorders.

されていた。しかし、2例はその後白血球減少、血管炎によると思われる腹痛を生じプレドニゾロンを增量した。RA 38 例は平均 7.6 ± 23.0 U/ml であり、2例 (131.5, 64.4 U/ml) 5.3% が正常範囲以上であった。その他の疾患では MRA (35.3 U/ml) および MCTD (101.4 U/ml) の各 1 例ずつが正常範囲を超えて陽性であった。PN, PSS, Sjögren 症候群、Behcet 病などの膠原病およびその他の類縁疾患、さらに臓器特異的自己免疫疾患であり近年抗 DNA 抗体の陽性率が高いことが報告されている自己免疫性甲状腺疾患および糖尿病は全例低値であった。

(7) 抗 DNA 抗体特異性の検討 (Fig. 5, Fig. 6)

SLE 以外で抗 DNA 抗体価が上昇していた RA の 2 例、MCTD、および MRA 各 1 例の血清に 0.1 p mole の recombinant dsDNA を添加し、¹²⁵I-

recombinant DNA との結合をみた。対照として 8 例の抗 DNA 抗体価高値の SLE 血清を用いた。Fig. 5 に示したように、いずれも 33.0~68.3% の inhibition がみられた。SLE 以外の疾患では 37.2% から 58.8% であり、一方 SLE では 33.0% から 68.3% で両群間には差を認めず、いずれの検体も少なくとも dsDNA に特異的な抗体を含んでいた。次に、この RA の No. 1 と SLE の No. 12 の血清を用いて ¹²⁵I-recombinant DNA との結合に対する cold の recombinant DNA 添加の影響をみた。Fig. 6 に示したように、両血清とも dsDNA および ssDNA によりその結合は阻害を受ける。最大結合の 50% 阻害を受ける mole 濃度を dsDNA を分子、ssDNA を分母にとり比をとると、RA 0.292, SLE 0.386 とやや SLE で高いが、ほぼ同程度の値を示した。inhibition を示し始

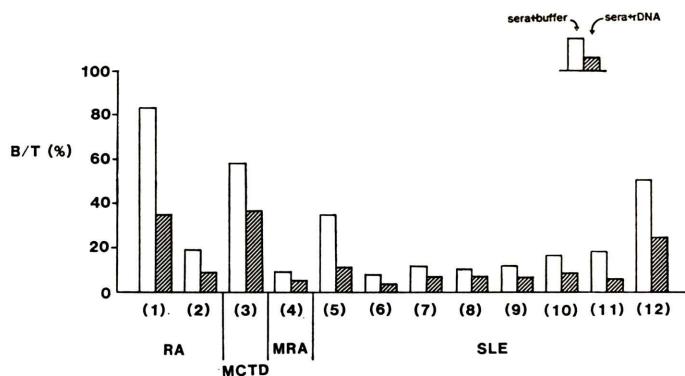


Fig. 5 Inhibition of ^{125}I -DNA binding to anti-DNA antibodies by recombinant DNA.

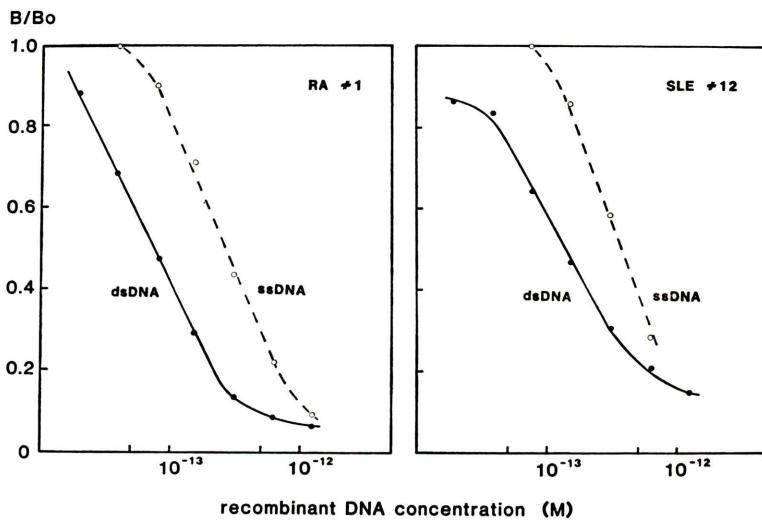


Fig. 6 Displacement curve of ^{125}I -DNA binding to anti-DNA antibody by recombinant DNA.

める ssDNA の最小 mole 濃度はそれぞれ 0.06~0.08 p mole, 0.11~0.15 p mole と SLE 血清の方がやや高かった。

(8) 症例 (Fig. 7)

SLE 29 歳女性で少量のプレドニゾロンにて寛解状態にあったが、精神神経症状出現し 1987 年 12 月当科に紹介入院した。大量のプレドニゾロンおよびパルス療法により精神神経症状改善し、同時に血清補体値も改善をみた。この間抗 DNA 抗体も急速に低下し、精神症状および補体の正常化とよく平行していた。

V. 考察

抗二本鎖 DNA 抗体は SLE に特異的に出現し、疾患活動性とよく相関するといわれている^{1~5)}。しかし、その測定法には種々の問題点が存在する。RIA 法は感度において優れている^{3,6,7)}が、標識 DNA の純度^{13,14)}、標識 DNA と抗体以外の血清成分との結合¹⁵⁾等の問題点が報告されている。本キットに用いられている ^{125}I -DNA は ^{125}I -dCTP を大腸菌に DNA polymerase により取り込ませ、制限酵素により切断して得られた分子量 1.1 と

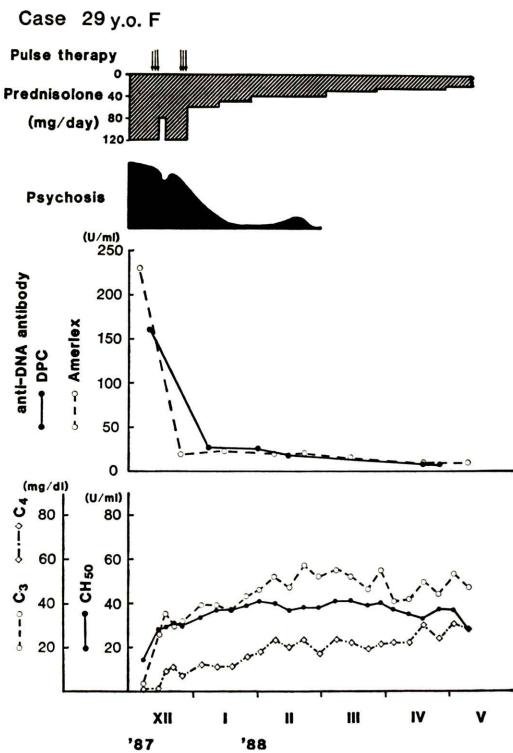


Fig. 7 Anti-DNA antibody in a patient with SLE.

1.2 Kbp の非常に精製された ligand である。アガロースゲル電気泳動、オートラジオグラフィーによる検討でも単一な band として検出される¹⁶⁾。また、組み換えプラスミドから ¹²⁵I-DNA を得ているため、ロット間のばらつきが非常に少ないといわれている¹⁷⁾。今回の検討でも測定間変動係数は小さく再現性に優れていることが確かめられた。さらにわれわれの検討で SLE に検出された抗体と ¹²⁵I-DNA の結合は cold の recombinant DNA により displace されたことから本法で測定される抗DNA 抗体は dsDNA に特異的と考えられる。高濃度の ssDNA によっても displace されたのは SLE, RA, MRA, または MCTD 血中には抗 ssDNA, 抗 dsDNA 両者と反応する抗体があること、抗 dsDNA 抗体との cross-reactivity、さらに作製した ssDNA の一部が二本鎖となつたいわゆる annealing の部位と反応している¹⁸⁾などの可能性が考えられる。しかしながら、本法で測定された抗

DNA 抗体は SLE では他のキットと同様に高い陽性率を示したのに対し、他のいわゆる膠原病および臓器特異的自己免疫疾患での陽性率が非常に低く、ことに他の測定法を用いて報告されている甲状腺疾患¹⁹⁾、糖尿病²⁰⁾での陽性例はなく、この点からも本法で測定した抗 DNA 抗体は疾患特異性が高いと考えられる。他社キットと比較すると本キットの測定値とよく相關したが、一部解離し、全般に本キットでの測定値が低い傾向にあった。この点からも本キットで測定した抗 DNA 抗体は SLE に疾患特異性が高いことと関連していると考えられた。しかし一部の検体は本キットの測定値がより高く、その差異については ¹²⁵I-DNA との親和性が検体により異なるためと思われる。本キットに使用されている標準血清は非常に平衡状態に達するのが早く、incubation 時間、温度の検討では検討した範囲内では時間、温度に影響されることなく、標準曲線が一致したが、実際に症例の血清を検討すると、時間・温度とともに結合率が上昇するのでキットに添付されたマニュアルどおり 37°C、2 時間の incubation が至適と考えられる。

血清中の補体⁸⁾、 α_2 -macroglobulin⁹⁾等の蛋白が ¹²⁵I-DNA と結合し、測定値に影響することが知られている。本キットに用いられている ¹²⁵I-DNA は抗原が純化され ssDNA の混入がない¹⁶⁾ため、これら蛋白との結合が低いと考えられる。実際 in vitro での検討で C1q, α_2 -macroglobulin, ヘパリンは測定値にほとんど影響しなかった。また、溶血により血球から DNA が溶出し、抗 DNA 抗体測定に影響すると考えられるが、充填赤血球を添加しても測定値は影響を受けなかった。非効化操作により抗体の結合率は軽度低下するが、検体と標準血清の低下は同じで、同様の処理をした標準曲線での測定値は非効化操作をしなかった場合の測定値とよく一致した。したがって、従来のキットで行われていた非効化の必要がなく、操作が容易で短時間に結果を得ることができる利点がある。

SLE の活動性の比較では臨床的な症状・検査所

見から活動性を評価しているため、他の報告^{14,21)}と同様、大部分は抗DNA抗体価と活動性・非活動性の病態との間に関連性がみられたが、一部で活動性と抗体価の間に差がみられた。今回検討した非活動性の症例で抗DNA抗体が高かった例は測定の前後6か月以上臨床症状、他の検査成績に変化がなく、治療によっても抗DNA抗体が低下しなかったためとは考えにくい。むしろ臨床症状、尿・血液生化学所見や血清補体値などに変化を生じない範囲で主として抗DNA抗体産生のみが高まっている症例と考えられ、より長期の臨床経過との関連性をみる必要があると考えられた。さらに、解離がみられた理由の1つには臨床的に寛解・増悪に先行して抗DNA抗体が変動している可能性が考えられる。このことは呈示した症例や非活動性でありながら、抗体価が高かった2例がその後急性増悪していることがこの可能性を示唆している。

VI. まとめ

¹²⁵I-recombinant DNAを用いた抗DNA抗体測定についての基礎的ならびに臨床的検討について報告した。本法は非効化の必要がなく、再現性に富み、活動期SLEに高率に陽性化し、さらにSLEに疾患特異的に検出されるので臨床的に有用と考えられる。

謝辞 リコンビジエン抗DNA抗体キットならびに組み換えDNAを提供いただきました日本DPCコーポレーションに深謝いたします。

文 献

- Tan EM, Schur PH, Carr RI, et al: Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* **45**: 1732-1740, 1966
- Koffler D, Schur PH, Kunkel HG: Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* **126**: 607-624, 1967
- Pincus T, Schur PH, Rose JA, et al: Measurement of serum DNA-binding activity in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* **281**: 701-705, 1969
- Clough JD: Measurement of DNA-binding immunoglobulin in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods* **15**: 383-394, 1977
- Schwartz RS, Stollar BD: Origins of anti-DNA autoantibodies. *J Clin Invest* **75**: 321-327, 1985
- Arden LA, Lakmeyer F, Feltkamp TEW: Immunology of DNA. I. The influence of reaction conditions on the Farr assay as used for the detection of anti-ds DNA. *J Immunol Meth* **10**: 27-37, 1976
- Arden LA, Lakmeyer F, Feltkamp TEW: Immunology of DNA. II. The effect of size and structure of the antigen on the Farr assay. *J Immunol Meth* **10**: 39-48, 1976
- Claus DR, Siegel J, Petras K, et al: Complement activation by interaction of polyanions and polyacations. *J Immunol* **118**: 83-87, 1977
- 東條毅: 抗DNA抗体. 臨床免疫 **12**: 766-773, 1979
- Brehm SP, Hoch SO, Hoch JA: DNA-binding proteins in human serum. *Biochem Biophys Res Commun* **63**: 24-31, 1975
- Hoch SO, McVey E: Purification and characterization of two major DNA-binding proteins in human serum. *J Biol Chem* **252**: 1881-1887, 1977
- 米増国雄: C1qの精製法. 免疫実験操作法第7部補体IV-1: 951-956, 1975
- 横張龍一: SLEにおける抗DNA抗体. 日本臨床免疫学会会誌 **9**: 1-12, 1986
- 小池隆夫, 高林克己, 鏡味勝, 他: 組換えDNAを用いたリコンビジエン抗DNAキットの基礎的・臨床的検討. 医学と薬学 **19**: 321-325, 1988
- Epstein WV, Tan EM: An antibody-like material in systemic lupus erythematosus directed toward a thermolabile serum macroprotein. *Arthritis Rheum* **16**: 43-51, 1973
- 川村雅英, 吉川典隆, 西江晴男: 組換えDNAをトレーサーとした抗DNA抗体測定法. ホト臨床 **36**: 833-836, 1988
- 藤井賀生, 遠井初子, 浅川英男, 他: 遺伝子組み換え法を用いたリコンビジエン抗DNA kitの検討. 医学と薬学 **18**: 1065-1071, 1987
- Stollar BD, Papalian M: Secondary structure in denatured DNA is responsible for its reaction with antinative DNA antibodies of systemic lupus erythematosus sera. *J Clin Invest* **66**: 210-219, 1980
- Katakura M, Yamada T, Aizawa T, et al: Presence of antideoxyribonucleic acid antibody in patients with hyperthyroidism of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* **64**: 405-408, 1987
- Huang S-W, Maclaren NK: Antibodies to nucleic acids in juvenile-onset diabetes. *Diabetes* **27**: 1105-1111, 1978
- 高崎芳成, 菊川隆史, 松本圭二, 他: 組み換えDNAを用いたリコンビジエン抗DNAキットの臨床的検討. 医学と薬学 **20**: 469-474, 1988