

総説

抗 DNA 抗体の性状

宮脇 昌二*・源 幸淳 司**

*倉敷成人病センター南くらしき病院リウマチ膠原病センター, **同健診センター

Characteristics of Anti DNA Antibodies

Shoji Miyawaki* and Junji Genko**

*Rheumatic Diseases Center and Clinical Laboratory, **Center for Adult Diseases, Kurashiki

Summary Antigenic determinants of DNA that react with anti-double-stranded (ds) and/or single-stranded (ss) DNA antibodies are very heterogeneous. Radioimmunoassay using Farr's assay detects only anti-dsDNA antibodies with high avidity, whereas enzyme immunoassay detects both anti-dsDNA antibodies and anti-ssDNA antibodies with a wide range of avidity. Anti-ssDNA antibodies detected by enzyme immunoassay are not antibodies to purine or pyrimidine bases, but they might mostly be anti-dsDNA antibodies reacting with phosphate-ribose backbones or internal depulex structures in ssDNA antigen. Anti-dsDNA antibodies with high or intermediate avidity and cationic nature may play an immunopathogenic role in producing renal involvement of systemic lupus erythematosus.

Key words : anti-double-stranded DNA antibodies, anti-single-stranded DNA antibodies, antibody avidity, cationic anti DNA antibodies

1. はじめに

抗 DNA 抗体の検出は全身性エリテマトーデス (SLE) を中心とした各種膠原病の診断や鑑別診断、経過観察上で不可欠の検査法となり、広く日常診療上で応用されるようになった。しかし抗 DNA 抗体の種類、検査法、性状などに関して様々な誤解や間違った解釈がなされているのが現状であるため、以下、これらの整理を試み、また最近の新たな知見を加えてみたい。

2. 測定方法による抗 DNA 抗体の相違

2.1 抗 DNA 抗体の定義

抗 DNA 抗体は二本鎖 DNA (double-stranded DNA, 以下 dsDNA) に対する抗体 (以下抗 dsDNA 抗体) と一本鎖 DNA (single-stranded DNA, 以下 ssDNA) に対する抗体 (以下抗 ssDNA 抗体) とに分類されている¹⁾。

抗 dsDNA 抗体はさらに① dsDNA とのみ反応し、dsDNA の二重らせん構造をエピトープとする抗体と、② dsDNA, ssDNA の両方と反応し、DNA の糖-リン酸骨格を抗原とする抗体の 2 種類に分類されている。①に該当する抗 dsDNA 抗体はきわめて稀に SLE の

みに発現し、通常の活動期 SLE で高値、高率に発現する抗 dsDNA 抗体の主体は②とされている。一方、抗 ssDNA 抗体は DNA の塩基または塩基配列と反応する抗体と定義され、その発現は各種の膠原病や他の自己免疫疾患に幅広く分布するが、高値陽性は SLE に集中して発現する^{2,3)}。

この場合注意すべきことは、抗 ssDNA 抗体の疾患分布とは、塩基、塩基配列に対するいわゆる抗 ssDNA 抗体のことを意味しているのではなく、ssDNA に対する抗体の分布を指している点である。すなわちこの抗体には塩基、塩基配列に対する抗体だけでなく、上記②に属する抗 dsDNA 抗体が含まれていることに気づかれていないことが多い。また②に属する抗 dsDNA 抗体の抗原エピトープもより多様性と考えられるが、これらに関しては後述したい。

2.2 抗 DNA 抗体の測定法

抗 dsDNA 抗体の検出法としては放射免疫定量法 (radioimmunoassay, 以下 RIA) が古くから用いられ、今日明らかにされている抗 DNA 抗体の臨床的意義の解析は RIA によって確立されてきた。しかしアイソトープ装置を必要とするため、より簡便に実施可能な酵素免疫定量法 (enzyme immunoassay, 以下 EIA) が第一線の医療機関で普及するようになってい

る。

RIA は 50%飽和硫酸法 (Farr 法) が用いられている。この方法で抗 dsDNA 抗体の測定は可能であるが、ssDNA を抗原とした場合には 50%飽和硫酸下においてすべての ssDNA が塩析するため、対応抗体の測定は不可能である。一方 EIA は、dsDNA を固相化した EIA (以下 dsDNA EIA) を抗 dsDNA 抗体、また ssDNA を固相化した EIA (以下 ssDNA EIA) を抗 ssDNA 抗体とおのこの命名し、これら両 EIA の併用がわが国において慣例化している。

近年高度に精製された dsDNA が使用されるようになり、RIA または EIA による抗 dsDNA 抗体の検出は感度、特異性ともに上昇し、後述する検査法による抗体性状の相違や解離現象などを理解しておけば、大きな問題点は少なくなっている。これに対して ssDNA EIA に関しては、種々の問題点と誤解が存在するため別項に独立させて述べる。

この他抗 DNA テストと称して血球凝集反応による抗 DNA 抗体の測定が今なお実施されている。この方法は検査手技上もっとも簡便という理由だけで継続されているようであるが、感度、特異性ともに著しく劣った方法であるため、RIA または EIA による抗 dsDNA 抗体の測定に切り換えるべきである。

2.3 検出法による抗 DNA 抗体の性状の差異²⁾

RIA による Farr 法は反応液に最終濃度が 50%となるように飽和硫酸を加え、アイソトープ標識 dsDNA と結合した抗体を塩析沈殿させ、抗体価を測定する方法である。このような高塩濃度下においては親和性 (affinity) の低い、あるいは結合力 (avidity) の弱い抗体は解離するため、高親和性/結合力の抗 dsDNA 抗体を検出する結果となる。また 50%飽和硫酸下においては IgG, IgA, IgM などの全免疫グロブリンに属する dsDNA 結合抗体が沈殿するため、RIA で測定する抗 dsDNA 抗体は全免疫グロブリンの総和となる。

これに対して EIA は等張塩濃度下で反応させるため、低より高親和性/結合力の抗体を幅広く検出する結果となる。また 2 次抗体に抗ヒト IgG 抗体が用いられているため、IgG 型の抗 dsDNA 抗体のみを検出することとなる。

以上の検査法による抗体親和性と免疫グロブリンの差異を念頭に置き、抗 DNA 抗体の結果の解釈を行うことが重要である。

2.4 ssDNA EIA の意味するところ

今日わが国においては dsDNA EIA とともに ssDNA EIA が同時に施行されることが慣行となっている。

二重螺旋構造の dsDNA を 100°C に熱して冷却すると、塩基間の水素結合が切断され ssDNA となる。これを固相化した EIA で検出した IgG 抗体を抗 ssDNA 抗体と呼称することはかならずしも間違いない。しかしこの呼称と塩基、塩基配列と反応する本来の抗 ssDNA 抗体の呼び名との間には大きな隔たりが存在する。はたして ssDNA EIA で検出する抗体は塩基、塩基配列と反応する抗体のみを検出しているのだろうか。

図 1 に自験各種膠原病 454 例の dsDNA EIA と ssDNA EIA の相関図を示す。両 EIA 値間には有意な相関が認められ、①両 EIA が陰性群、② ssDNA EIA のみ陽性群、③両 EIA が陽性で、両値が同等か、多くは ssDNA EIA のほうが高値を示す群、以上の 3 群に分かれ、dsDNA とのみ反応する血清や、dsDNA とより強く反応する血清は認められなかった。

以上の抗 DNA 抗体の反応性は ssDNA 主導型となっている。こうした反応性は血清の DNA による抑制試験³⁾、すなわち両 EIA と反応する抗体は dsDNA, ssDNA 両抗原によって吸収抑制され、とくに ssDNA による抑制率がより顕著であった事実からも明らかである。

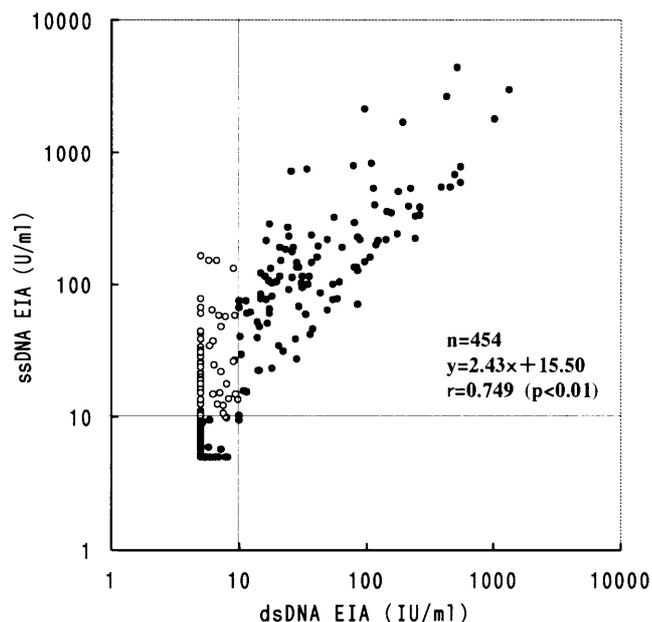


図 1 dsDNA EIA と ssDNA EIA との相関

● 両法陽性または陰性群, ○ ssDNA EIA のみ陽性群。

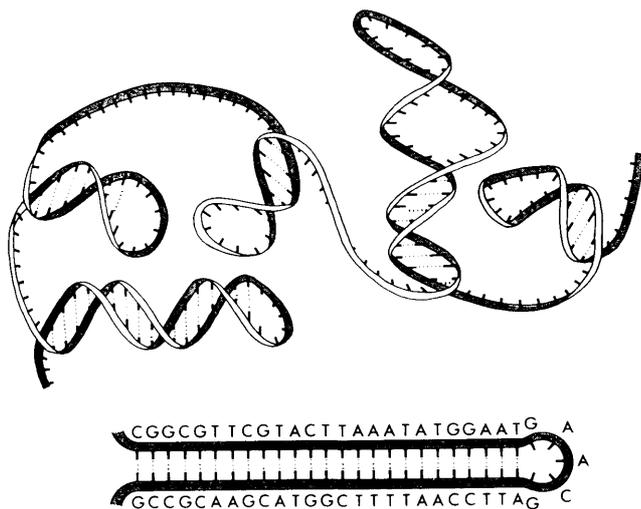


図2 一本鎖DNAの構造⁴⁾

相補的塩基配列部分でヘアピンループなどの二重構造を作り、折りたたまれた形をとりやすい。

なぜこのようなssDNA主導型の反応性を示すのであろうか。従来より抗原dsDNAに混入した一本鎖部分に起因する現象と考えられてきた。しかしこれだけではssDNAとのみ反応する血清群が発現することの説明は困難であり、ssDNAとdsDNAとの抗原構造⁴⁾の類似性で説明するほうが理に適っている。

ssDNAには塩基や塩基配列の露出のみならず糖-リン酸骨格も存在する。またssDNAは柔軟性に富み⁵⁾、一本鎖の随所でヘアピンループなどの二重螺旋構造(internal duplex structure)を形成しやすい^{4, 6)}(図2)。その結果、ssDNA EIAは本来の抗ssDNA抗体のみならず、抗dsDNA抗体とも反応することとなる。また抗dsDNA抗体と反応するエピトープはssDNA抗原のほうに多いため⁵⁾、ssDNA EIAのほうが抗dsDNA抗体をより高感度に検出しやすい結果となる。抗体親和性/結合力の面よりみれば、dsDNA EIAが比較的高親和性の抗dsDNA抗体を検出するのに対して、より抗原性に富むssDNA EIAは低親和性から高親和性までの抗dsDNA抗体を幅広く検出する²⁾。このような抗原構造の類似性と親和性の差が上記ssDNA主導型の反応性を誘導していることが想定される。

以上の抗原構造にしたがって図1の成績を再考すると、ssDNA EIAとのみ反応する血清群は塩基、塩基配列に対する抗体か、または低親和性の抗dsDNA抗体である。また両EIAと反応し、同等またはssDNAとより強く反応する血清群は、塩基、塩基配列と反応する抗体と抗dsDNA抗体の混在か、または様々な親

和性をもった抗dsDNA抗体であることが考えられる。しかしこれらの中で塩基、塩基配列に対するいわゆる抗ssDNA抗体の存在は、動物実験での作製が可能であっても、SLEなどで多発する確証は少なく、塩基、塩基配列のみを抗原としたEIAで再検討しないかぎりその実態は不明である。このような抗体が、ある時は単独に、またある時には抗dsDNA抗体と混在して発現すると解釈するのは不自然であり、むしろその大部分は低親和性の抗dsDNA抗体であり、これらをssDNA EIAが高感度に測定している現象と解釈したほうが正鵠を射ているのではなかろうか。

このようなssDNAの抗原構造が忘れられて、ssDNA EIAで検出する抗体を塩基、塩基配列と反応する抗体のみと誤解されているのが現状である。こうした誤解は、ssDNAを抗原としたアッセイ系で検出する抗体に対する「抗ssDNA抗体」の呼称と、塩基、塩基配列と反応する抗体に対して命名された本来の「抗ssDNA抗体」の名称との混同に由来しており、実はSLEを始めとして種々の疾患で発現するssDNA EIAの本体は抗dsDNA抗体に他ならない、という結果になってしまっていることは再認識されるべきである。

抗DNA抗体の反応性から見るとDNAの抗原エピトープは複雑であり、最初に述べた抗DNA抗体の分類法では説明不能な現象が多発している。ssDNAに対する抗体に関する混乱や誤解を避け、またssDNAとdsDNAの両抗原と反応する多彩な抗体の抗原エピトープが明らかにされた新たな分類法の出現が待望される。

2.5 ssDNA EIAの臨床的意義の再考

今日わが国でssDNA EIAとdsDNA EIAとが同時に実施されるようになった理由は、SLEの活動期に先駆けてまず抗ssDNA抗体が上昇し、遅れて抗dsDNA抗体が上昇する現象を捉えて、SLEの増悪を早期に把握する手段としてのssDNA EIA有用性を強調した報告⁷⁾に基づいている。

こうした現象は塩基、塩基配列に対する抗体がまず上昇し、遅れて抗dsDNA抗体が発現するのではなく、まずssDNA EIAが低力価、低親和性の抗dsDNA抗体を最初にキャッチし、その抗体価の上昇とともにdsDNA EIAでの測定が可能となった現象と考えられる。かつて仔牛胸腺由来の精製dsDNAを抗原とし、dsDNA EIAの感度が著しく劣っていた時代においては、抗dsDNA抗体をより鋭敏に検出するssDNA

EIA のこのような利用法も一考に値したであろう。しかしその後 dsDNA EIA の感度が上昇し、RIA の感度に接近してきた今日、二つの EIA を同時に実施する必然性は、検査上の煩雑性からもまた経済的にもきわめて乏しくなっていることが想定される。

しかし ssDNA EIA が高感度である以上、dsDNA EIA に先駆けて ssDNA EIA が上昇する可能性は今なお捨てきれないとする論議も残存する。しかし図 1 に示す ssDNA EIA のみが陽性の群には非活動期の SLE とその他の膠原病群が集中しており、また時系列で観察しても ssDNA EIA のみが陽性の症例が経過とともに悪化して行く現象は確認されていない³⁾。

また二つの EIA を同時施行する場合に残されている大きな未解決の課題は、両 EIA が陽性で両値が同等か、多くは ssDNA EIA のほうが高値を示す血清が頻発する点にある。二つの EIA を同時実施する以上は、このような両 EIA の反応の差に関する臨床的意義も十分に解明されていて然るべきと考えられるが、今なお意義不明のまま放置されている。

このような状況下で両 EIA が漫然と同時実施されている慣習は早急に正されるべきであり、臨床的には RIA か EIA のいずれかによる抗 dsDNA 抗体の検出の一本にしばって実施することが望ましいと考える。

2.6 RIA と EIA とのデータ解離

一施設において抗 dsDNA 抗体を測定する際には RIA または EIA のいずれか一方が用いられるのが一般的である。しかし RIA と dsDNA EIA を比較してみると両法間にはしばしば解離現象が認められる。

図 3 に各種膠原病血清 454 例の RIA と dsDNA EIA の関係を示す。両群間には有意な相関が存在するが、完全には一致しない。両法陰性または陽性血清が存在する一方で、RIA または EIA のみ陽性の血清が存在する。また両法陽性血清においても RIA または EIA のほうがおのおの他方の 2~3 倍高値を示す血清も認められる。

表 1 にこれらの血清の RIA, dsDNA EIA, ssDNA EIA の結果をまとめて示す。1 群：3 法陽性血清は 80 例で、その多くは SLE 血清であり、高値陽性群には腎障害が多く認められ、高親和性の抗 dsDNA 抗体が所属していると考えられる。2 群：RIA が陰性で dsDNA EIA と ssDNA EIA が陽性の血清が 29 例存在し、また 3 群：ssDNA EIA のみが陽性の血清が 46 例認められた。2, 3 群にはいずれも非活動期 SLE とその他の膠原病血清が該当し、RIA では検出しえな

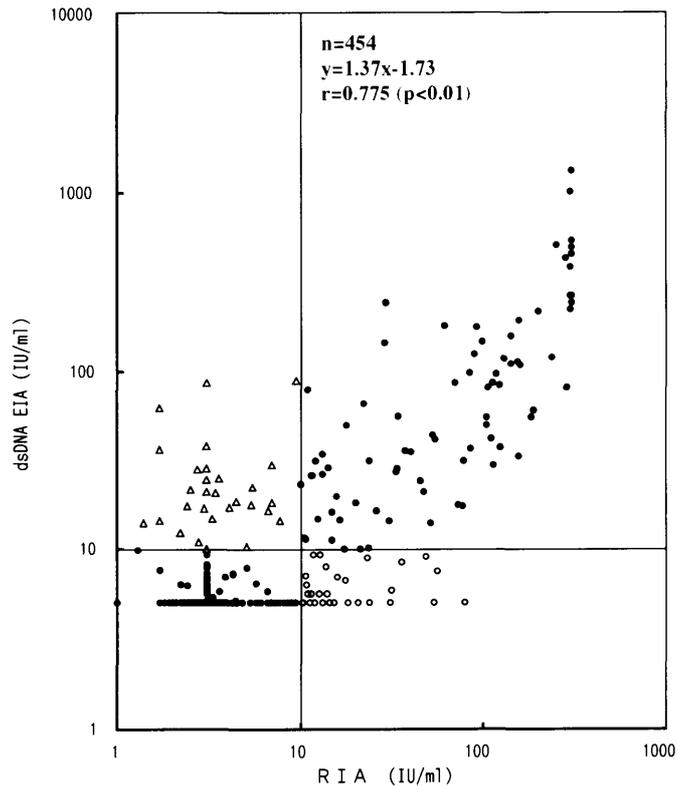


図 3 RIA と dsDNA EIA との相関

● 両法陽性または陰性群, ○ RIA のみ陽性群, △ dsDNA EIA のみ陽性群。

表 1 RIA, dsDNA EIA, ssDNA EIA の結果の解離

| | 1 群 | 2 群 | 3 群 | 4 群 | 5 群 | 6 群 | |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| RIA* | + | - | - | + | + | - | |
| dsDNA EIA* | + | + | - | - | - | - | |
| ssDNA EIA* | + | + | + | + | - | - | 計 |
| SLE | 69 | 16 | 20 | 18 | 0 | 23 | 146 |
| 強皮症 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 25 | 30 |
| 皮膚/多発筋炎 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 14 | 17 |
| RA | 1 | 2 | 11 | 3 | 3 | 100 | 120 |
| MCTD | 7 | 5 | 6 | 3 | 0 | 44 | 65 |
| 重複症候群 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 9 | 13 |
| シェーグレン症候群** | 0 | 4 | 5 | 2 | 0 | 47 | 58 |
| その他 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| 計 | 80 | 29 | 46 | 27 | 5 | 267 | 454 |

*いずれも cut off は 10 単位, **原発性シェーグレン症候群。

い低親和性の抗 dsDNA 抗体の集合体であり、とくに 3 群にはもっとも低親和性の抗 dsDNA 抗体が集中していることが推測された。4 群：RIA と ssDNA EIA とが陽性で、dsDNA EIA が陰性の血清が 27 例存在し、RIA 高値陽性例には活動期 SLE が多く認められた。この群に所属する血清は反応時間を長くすることによって dsDNA EIA が陽性となることより、反応

性が遅く、3法陽性の1群よりも親和性が低い抗dsDNA抗体(IgG)であることが考えられた。この他RIAのみ陽性の血清が少数例存在したが、これらはIgG以外の免疫グロブリンに属する抗dsDNA抗体と考えられた。

このようにRIAまたはEIAのいずれかを使用して抗dsDNA抗体を測定する際には、両法間に解離が認められることを念頭に置く必要があり、またこうした解離の解析には高低両親和性抗体を幅広く検出するssDNA EIAの応用が有用と考えられた。

3. 塩濃度を上昇させた抗DNA抗体の親和性の検討

抗DNA抗体の親和性/結合力の相違はRIAとEIAによって識別可能であることは上述した。より精密に観察する方法としては反応系の塩濃度を上昇させて抗体の解離を観察する方法が古くから用いられている⁸⁻¹⁰。臨床的に親和性が問題となるのは、SLEにおいて抗dsDNA抗体が高値を示しながら、かならずしも腎障害などの活動性所見が出現しない症例が散見される場合である。こうした症例に対して比較的簡便

な方法で親和性の検討を試みた結果をRIA、EIA別に述べてみたい。

3.1 RIAによる検討¹¹⁾

RIAで100 U/ml(通常DNA結合率60%)以上の高値陽性を呈したSLE症例を対象とした。

通常の¹²⁵I標識DNA溶液(100 mM)に125 mMのNaClを加え、血清と反応後、最終濃度が50%となるように飽和硫酸を加えて遠心、沈殿物の放射活性を測定し、DNA結合率(高塩結合率)を算定した。もともとRIAは高親和性抗体を検出する方法であるが、さらに反応塩濃度を上昇させて、より高親和性の抗体を検出することを目的とした方法である。

その結果(表2)、尿蛋白、尿円柱、腎不全の有無別に比較してみると、通常結合率、高塩結合率ともに有意にこれらの有り群で高値を示したが、尿蛋白、尿円柱の有無では高塩結合率での有意差の方が顕著であった。また腎生検像でび慢性増殖性腎炎像を示した群、ネフローゼ型腎症群、CH 50、C 3、C 4の低値群においては、いずれも高塩結合率が有意に高値を示したが、通常結合率では有意差は認められなかった。以上の所見は従来より報告されている活動期SLEや腎障害

表2 抗DNA抗体が異常高値*を示す全身性エリテマトーデスにおける高親和性DNA結合率(Hi-Aキット、高塩結合率)と血清補体価、腎障害との関係

| 検査所見 | 例数 | 通常結合率(%) | 高塩結合率(%) | | | | |
|-----------------|---------|------------|------------|------------|----------------------|----------|-------------|
| C 3 (mg/dl) | 35 以上 | 38 | 85.71±9.31 | NS** | 51.13±35.15 | } p<0.05 | |
| | 35 未満 | 41 | 88.18±8.40 | | | | 67.80±29.69 |
| C 4 (mg/dl) | 8 以上 | 29 | 86.02±9.18 | NS | 45.75±36.53 | } p<0.01 | |
| | 8 未満 | 50 | 87.56±8.74 | | | | 67.92±28.60 |
| CH 50 (U/ml) | 15 以上 | 37 | 86.11±8.84 | NS | 51.96±34.75 | } p<0.05 | |
| | 15 未満 | 42 | 87.77±8.95 | | | | 66.67±30.74 |
| 蛋白尿 | + | 52 | 88.54±8.50 | } p<0.05 | 68.99±29.9 | } p<0.01 | |
| | - | 27 | 84.01±8.99 | | | | 42.05±32.7 |
| 尿円柱 | + | 43 | 89.20±8.13 | } p<0.05 | 75.75±25.2 | } p<0.01 | |
| | - | 36 | 84.35±9.12 | | | | 40.72±31.9 |
| 腎生検 | DPLN*** | 33 | 90.05±7.91 | NS | 80.72±20.6 | } p<0.01 | |
| | minimal | 15 | 86.01±8.58 | | | | 42.77±34.8 |
| 腎不全 | + | 5 | 92.70±1.27 | } p<0.01 | 93.40±1.46 | } p<0.01 | |
| | - | 73 | 86.50±9.06 | | | | 58.23±32.84 |
| 非ネフローゼ腎症 | 14 | 85.06±10.0 | NS NS | 54.77±37.9 | } p<0.05 } p<0.01 | } NS | |
| ネフローゼ腎症 | 34 | 89.72±8.04 | | | | | 78.66±21.5 |
| 非腎症 | 31 | 84.87±8.67 | | | | | 41.35±31.2 |

*通常結合率60%以上、抗体価100 U/ml以上(リコンビジェン抗DNAキット)、

not significant, *diffuse proliferative lupus nephritis.

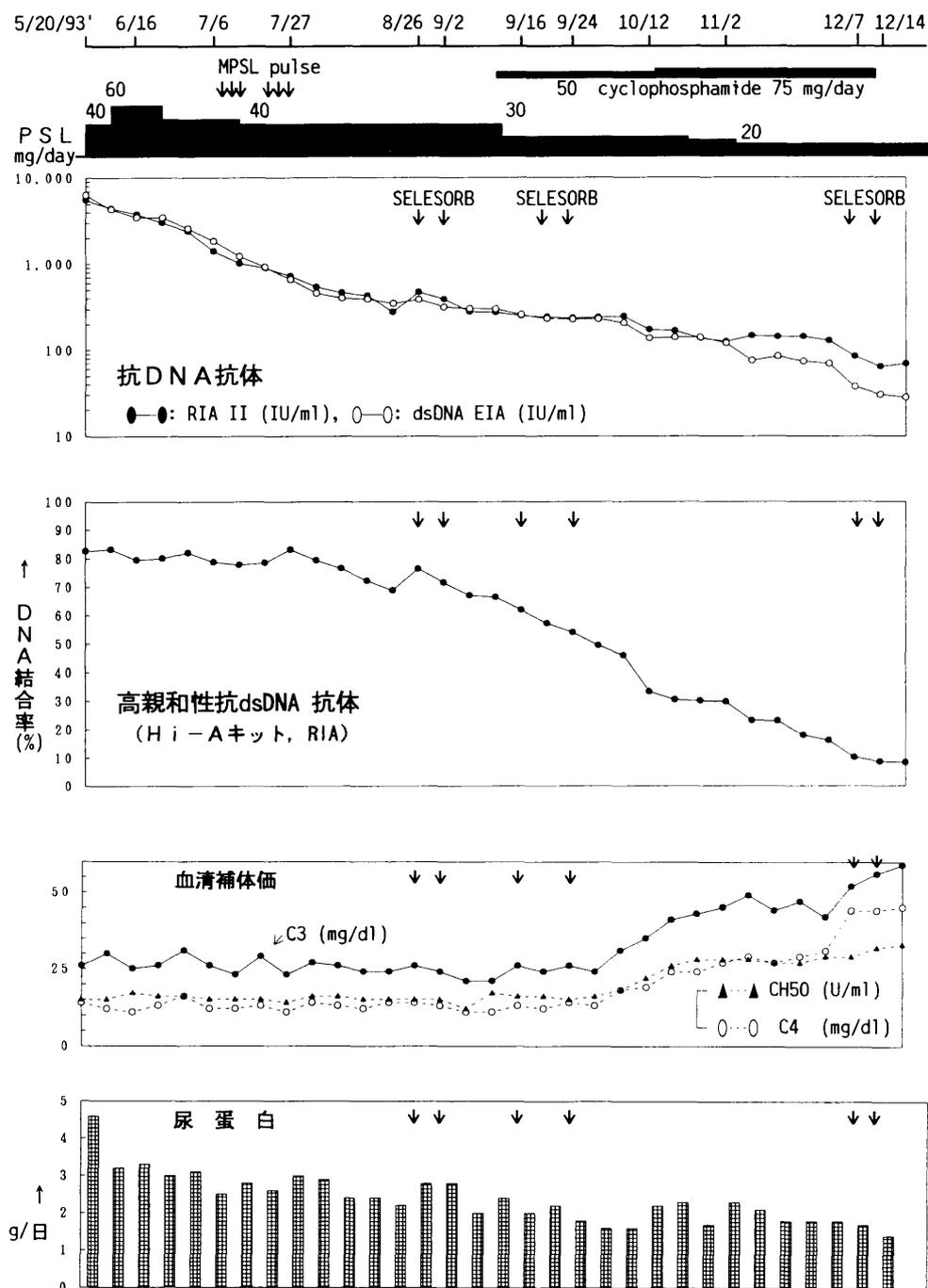


図4 デキストラン硫酸カラム (SELESORB) による抗 DNA 抗体の吸着 (30 歳, 女性, SLE)

に高親和性抗体が関与するとする報告⁸⁻¹⁰⁾に一致していた。一方、手指紅斑、痙攣、胸/心膜炎の有群は、無し群と比較して、高塩結合率が各々有意に低い傾向が認められ、過去の CNS ループスにおける低親和性抗体の関与の報告¹²⁾などとも一致した所見と考えられた。

経時的に観察すると (図 4)、通常の抗 DNA 抗体価の動きよりも早期に高塩結合率が変動し、治療上の良い指標となることが推測された。また SLE 以外で

抗体価 100 U/ml 以上を示した MCTD の 4 例と SLE と RA の重複症候群の 1 例は、高塩結合率ではいずれも 20% 以下の低値を示しており、高塩結合率の疾患鑑別への応用を示唆していた。一方、抗 DNA 抗体価が 100 U/ml (結合率 60%) 未満の血清ではほぼ全例で高塩結合率の著明な低下が認められ、高親和性抗体の存在は確認できなかった。

3.2 EIA による検討¹³⁾

EIA は低より高親和性までの抗 DNA 抗体を幅広

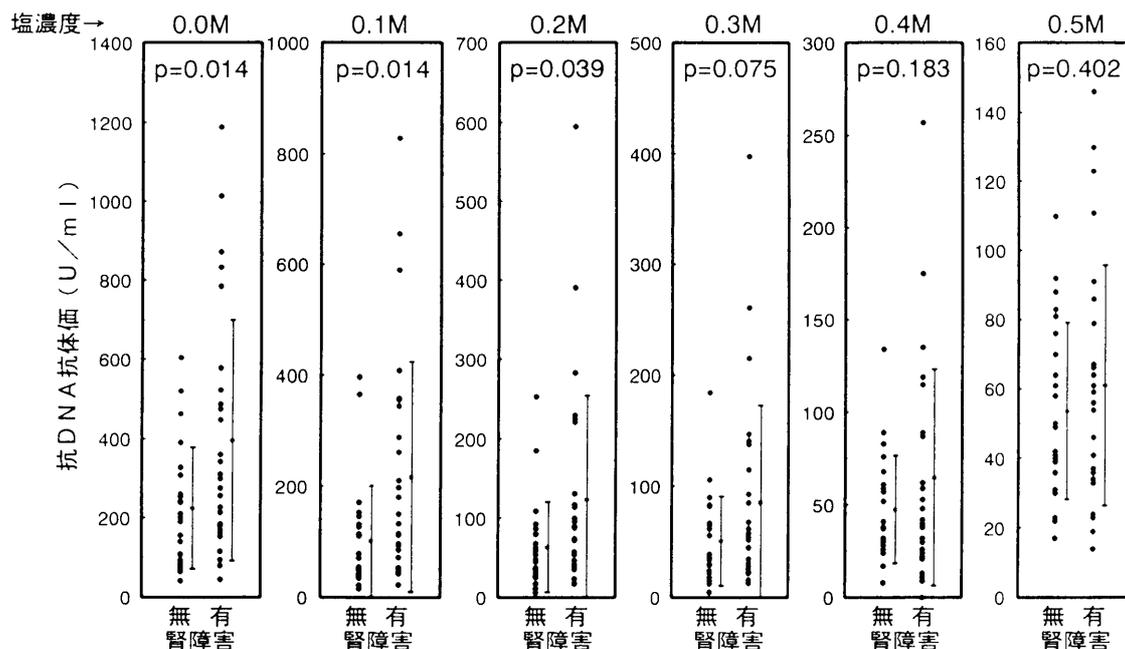


図5 腎障害有無間でのELISAにおける抗原抗体反応時の塩濃度を変化させた場合の抗DNA抗体価の比較

表3 ELISAにおける反応塩濃度差別抗DNA抗体価と腎障害との関連性

| 反応液中の塩濃度 (M) | | ELISA 抗DNA抗体価 (A-B) (U/ml) | | p 値* |
|--------------|-----|----------------------------|--------------|--------|
| A | B | 腎障害有り群 (27例) | 腎障害無し群 (23例) | |
| 0.0 | 0.1 | 178.7±135.2 | 123.4±82.1 | 0.0831 |
| 0.0 | 0.2 | 272.6±211.7 | 161.3±115.9 | 0.0238 |
| 0.0 | 0.3 | 310.6±240.6 | 174.1±129.1 | 0.0147 |
| 0.0 | 0.4 | 331.0±263.5 | 177.3±139.7 | 0.0121 |
| 0.0 | 0.5 | 334.7±284.0 | 171.1±145.3 | 0.0125 |
| ----- | | | | |
| 0.1 | 0.2 | 93.9±91.6 | 37.9±49.4 | 0.0090 |
| 0.1 | 0.3 | 131.9±130.6 | 50.7±67.8 | 0.0074 |
| 0.1 | 0.4 | 152.3±160.5 | 53.9±82.1 | 0.0082 |
| 0.1 | 0.5 | 156.0±184.6 | 47.7±89.7 | 0.0103 |
| ----- | | | | |
| 0.2 | 0.3 | 38.0±46.5 | 12.8±20.8 | 0.0156 |
| 0.2 | 0.4 | 58.5±79.9 | 16.0±35.8 | 0.0177 |
| 0.2 | 0.5 | 62.2±106.6 | 9.8±45.1 | 0.0261 |
| ----- | | | | |
| 0.3 | 0.4 | 20.5±36.5 | 3.3±16.9 | 0.0348 |
| 0.3 | 0.5 | 24.2±62.1 | -3.0±26.1 | 0.0461 |
| ----- | | | | |
| 0.4 | 0.5 | 3.7±32.3 | -6.2±12.7 | 0.1513 |
| ----- | | | | |
| RIA (IU/ml) | | 205.3±233.6 | 110.7±67.2 | 0.0536 |

*腎障害有り群と無し群で抗DNA抗体価の差の検定を行ったときのp値。

く検出し、またRIAよりも反応塩濃度をよりきめ細かに変動させることが可能な方法である。そこでEIAの塩濃度を種々上昇させ、抗体親和性を検討した結果を以下に示す。

RIAにて抗DNA抗体が高値を示すSLE血清50例(平均抗dsDNA抗体価161.8IU/ml、腎障害有り27例、同無し23例)の血清を対象とした。S1スクレーパーゼ処理精製仔牛胸腺DNAを固相化した

EIAを用い、血清希釈液にNaClを0, 0.1~0.5 M濃度となるように加え、各塩濃度における抗 dsDNA 抗体価を測定した。

その結果 (図 5), 抗原抗体反応時の塩濃度が 0.2 M 以下では腎障害有り群のほうが有意に高い抗 dsDNA 抗体価を示したが, 0.3 M 以上では有意差は認められなかった。この塩濃度は予想外の低濃度であった。

次に塩濃度が(A)_Mのときの抗体価からより高い塩濃度(B)_Mの抗体価を減じた抗 DNA 抗体価は、塩濃度(B)_Mでは DNA と結合できないが、(A)_Mでは結合できる抗体に等しい、という仮説を立てて分析した。その結果 (表 3), 腎障害有り群と無し群を比較すると、0.1 M の抗体価より 0.3 M の抗体価を減じた (0.1-0.3)_Mでの抗体平均値においてもっとも強い有意差が認められ、この有意差は、0.0 M, 0.1 M, 0.2 M 単独 EIA で確認された有意差よりもより強かった。一方、(0.0-0.1)_Mでの抗体平均値には有意差は認められなかった。

以上の結果、0.0 M, 0.1 M, 0.2 M EIA での抗体価は腎障害の有無で有意差が認められたものの、これらの中には腎障害との関連性が低い抗体、すなわち 0.3 M 以上の EIA で検出する抗体と (0.0-0.1)_Mの抗体が含まれていることが考えられ、これらの抗体を除外した (0.1-0.3)_Mの抗体がもっとも腎障害と関連する抗 DNA 抗体であることが考えられた。

抗体親和性の面から考察すると、高、低親和性の定義がない今日、0.1 M 未満の塩濃度で測定可能な抗体を低親和性とし、0.2 M 以上を高親和性と定義すれば (0.1-0.3)_M抗体は高親和性に属する抗体群となる。しかしより高塩濃度で残存する抗体を高親和性とすれば、この抗体群は高、低親和性の中間に属する抗体といえることができる。

4. 陽性荷電抗 DNA 抗体

以上述べた抗 DNA 抗体はどのような機序で SLE 腎炎を惹起するのであろうか。この点に関しては今日においても免疫複合体説が有力である。しかし循環血中の DNA-抗 DNA 抗体複合体が腎に直接沈着するというかつての説は否定され、腎局所 *in situ* での免疫複合体形成説¹⁴⁾が有力視されている。すなわち陽性に荷電した抗 DNA 抗体が発現し、これが腎糸球体基底膜のヘパラン硫酸などの陰性荷電部位に静電的に結合し、これに抗原 DNA が反応して腎炎が惹起されるという説である。

まず NZB/NZW F1 ループスマウスにおいては、腎障害を欠く若齢時には抗 DNA 抗体は低親和性で、等電点も中性であるが、腎炎を発症する月齢となると、高親和性で陽性に荷電した抗 DNA 抗体が発現することが明らかにされている^{15, 16)}。このような高親和性で陽性に荷電した抗 DNA 抗体の発現は、免疫グロブリン遺伝子で繰り返される突然変異によってアルギニン、リジンなどの塩基性 (陽性荷電) のアミノ酸への置換が起こるためとされている。

ヒト SLE においても腎障害を有する活動期の SLE にヘパラン硫酸と強く結合する陽性荷電の抗 DNA 抗体が発現し、治療とともに消失することが報告¹⁷⁾されている。

5. 抗 DNA 抗体の性状よりみた アフェレシスの適応

近年、デキストラン硫酸カラムによって選択的に抗 DNA 抗体を除去することが行われるようになった。デキストラン硫酸は陰性荷電物質であるため、このカラムを用いて高親和性で陽性荷電の抗 DNA 抗体を吸着、除去することは理に適った方法と考えられる。しかしその効果は一時的であり、吸着療法だけでは短時間に抗体価は再上昇する。そのため後療法としてステロイド剤の併用が不可欠となる。

図 4 は抗 DNA 抗体が異常高値を示した一例である。パルス療法を含む大量のステロイド剤の投与によって抗体価の低下が認められたが、抗体の再上昇と高親和性抗体の残存が認められたため、デキストラン硫酸カラムによるアフェレシスを繰り返した結果、抗体価の低下とステロイド剤の減量に成功した症例である。

抗 DNA 抗体が陽性的の場合、その抗体価が異常高値を示していても、大量のステロイド剤 (パルス療法を含む) によって低下するのが一般的である。したがって抗体価が高いからといって無差別にアフェレシスを行うことには問題がある。その適用としては大量のステロイド剤を投与しても抗体価、とくに高親和性抗体の低下が遷延する場合や、ステロイド剤の大量投与を回避せざるをえない事態が発生した場合などが考えられる。またアフェレシスの併用は、抗 DNA 抗体をいち早く除去して組織障害の拡大を抑制し、かつステロイドの減量化が図れる利点なども考えられるが、今後のさらなる検討を要するところである。

検査法からアフェレシスの適応を考察すると、上述した RIA と EIA との間に生じる解離現象には注意す

べきであり、高親和性抗体を検出しやすいRIAによる抗DNA抗体価を参考にして適応を決めることが重要と考えられる。

文 献

- 1) Arana R, Seligmann M: Antibodies to native and denatured deoxyribonucleic acid in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* **46**: 1867-1882, 1967
- 2) Smeenk R: A comparison of four different anti-DNA assays. In: *Immunoassay technology Vol. 2*, Pal SB (ed), Walter de Gruyter & Co., Berlin & New York, 1986, p. 145-166
- 3) 宮脇昌二, 源幸淳司, 川村雅英: 酵素免疫定量法で測定している抗一本鎖DNA抗体とは何か—その臨床的意義の再評価—. *リウマチ* **35**: 889-898, 1995
- 4) Watson JD, Hopkins NH, Robert JW, et al: The structures of DNA. In: *Molecular biology of the gene*, Watson JD, et al (eds), 4th ed, Benjamin/Cummings, California, 1987, p. 240-281
- 5) Aarden LA, Lakmaker F, De Groot ER: Immunology of DNA. IV. The effect of mercaptans on IgG and IgM anti-dsDNA. *J Immunol Methods* **16**: 143-153, 1977
- 6) Stollar BD, Papalian M: Secondary structure in denatured DNA is responsible for its reaction with anti-native DNA antibodies of systemic lupus erythematosus sera. *J Clin Invest* **66**: 210-219, 1980
- 7) 青塚新一, 横張龍一: 酵素免疫測定法のキットによる抗二本鎖DNAおよび抗一本鎖DNA抗体の同時測定とその臨床的意義. *リウマチ* **28**: 96-101, 1988
- 8) Geshwin ME, Steinberg AD: Qualitative characteristics of anti-DNA antibodies in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* **17**: 947-954, 1974
- 9) Winfield JB, Faiferman I, Koffler D: Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis. *J Clin Invest* **59**: 90-96, 1977
- 10) Yoshida M, Yoshida H, Muso E, et al: Avidity of anti-DNA antibodies and its clinical significance in patients with SLE. *Jpn Arch Int Med* **34**: 89-96, 1987
- 11) 宮脇昌二, 峰重洋昭, 川村雅英: 大腸菌プラスミド二本鎖DNAを抗原としたFarr法による抗DNA抗体測定の再検討と高塩濃度DNA抗原液によるDNA結合率の併用. *リウマチ* **32**: 437-445, 1992
- 12) Smeenk RJT, Rooijen AV, Swaak TJG: Dissociation studies of DNA/anti-DNA complexes in relation to anti-DNA avidity. *J Immunol Methods* **109**: 27-35, 1988
- 13) 田万潤子, 矢吹哲郎, 古吉重雄, 他: 全身性エリテマトーデスにおける腎障害関連抗DNA抗体のELISAによる検討. *リウマチ* **36**: 8-15, 1996
- 14) Agoda LYC, Gauthier VJ, Mannik M: Antibody localization in glomerular basement membrane may precede *in situ* immune deposit formation in rat glomeruli. *J Immunol* **134**: 880-884, 1985
- 15) Shlomchik MJ, Mascelli M, Sham H, et al: Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arised by clonal expansion and somatic mutation. *J Exp Med* **171**: 265-292, 1990
- 16) Diamond B, Katz JB, Paul E, et al: The role of somatic mutation in the pathogenic anti-DNA response. *Annu Rev Immunol* **10**: 731-757, 1992
- 17) Suzuki N, Harada T, Mizushima Y, et al: Possible pathogenic role of cationic anti-DNA autoantibodies in the development of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **151**: 1128-1136, 1993