全身性エリテマトーデスにおける血清可溶性 HLA class I 抗原の臨床的意義に関する研究

辻 秀 一・石原 良美*・神 口 浩**
入 交 昭一郎・山村 雅 一**・辻 公 美*

Jpn. J. Clin. Immun., 14 (4) : 387~394, 1991.

Clinical role of Serum soluble (Ss) HLA class I antigen in SLE patients using dot blotting technique

Shuichi Tsuji, Yoshimi Ishihara*, Hiroshi Kamiguchi**,
Shoichiro Irimajiri, Masaichi Yamamura** and Kimiyoshi Tsuji*

Department of Internal Medicine Kawasaki Municipal Hospital

**Department of Transplantation Tokai University School of Medicine*

***Department of Biochemistry Tokai University School of Medicine*

【Summary】

In 1970', the presence of soluble histocompatibility antigens in human serum (Ss HLA antigens) was discovered. However it is now still difficult to detect Ss HLA antigen in spite of using the new reported methods. Additionally the clinical significance of Ss HLA class I antigens are also still unknown. In this report, we detected serum soluble HLA class I antigens in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) using the new method of dot blotting, the double determinant enzyme-linked immunoassay with nitrocellulose membrane. The reaction of Ss HLA antigens, peripheral lymphocyte counts, clinical activities of SLE and the clinical course were compared. The results were as follows: 1) Ss HLA class I antigens were positive in 9 cases of 21 cases (42.9%) with SLE. 2) Absolute number of lymphocytes had a negative correlation to the presence of Ss HLA class I antigens in SLE patients ($p < 0.05$). 3) The presence of Ss HLA class I antigen closely correlated to the activity of SLE ($p < 0.001$). 4) Five of seven active SLE patients in whom Ss HLA class I antigen was not detected, were suffered from nephrotic syndrome due to lupus nephritis. Further studies are needed to determine the pathogenesis of release and clinical significance of serum soluble HLA class I antigen.

Key words : SLE,
可溶性 HLA class I 抗原,
dot blotting,
ELISA

【概 要】

血清可溶性 HLA 抗原 (以下 Ss HLA) は、1970 年その存在を明らかにされて以来、検出方法および臨床的意義について研究されてきたが、なお確立されていない。今回、われわれは自己免疫疾患である全身性エリテマトーゼス (以下 SLE) における可溶性 HLA class I 抗原の臨床的意義を明らかにする目的で、ニトロセルロース膜を用いた ELISA による dot blotting 法により測定し検討した。(結果) (1) Ss HLA class I 抗原は SLE 患者 21 例 (55 ポイント) のうち 9 例 (15 ポイント) で陽性であった。(2) SLE 患者において Ss HLA の反応性はリンパ球数と負の相関を示した ($p < 0.05$)。 (3) Ss HLA の陽性率は SLE の疾患活動性と強い正の相関を示した ($p < 0.001$)。 (4) 活動性 SLE にもかかわらず Ss HLA を認めなかった 7 例のうち 5 例がネフローゼ症候群を有するループス腎炎症例であった。

SLE 疾患における Ss HLA class I は免疫複合体を形成し疾患活動性の一因となりうる病因的な可能性が考えられた。しかし、逆に SLE 疾患自体に伴う免疫系の賦活化された状態を反映する病態としての可能性も否定できない。Ss HLA class I 抗原の遊出機序やその生物学的、臨床的意義に関する今後のさらなる研究が望まれる。

I. はじめに

血清可溶性 HLA 抗原は、1970 年 Van Rood¹⁾ がその存在をはじめて明らかにし、以来その検査方法に関してさまざまな研究が行われてきた²⁻⁵⁾。一方、可溶性 HLA 抗原の存在とその臨床的意義に関しても種々興味をもたれており、現在までにいくつかの報告が散見される⁶⁻¹⁰⁾。今回われわれは、自己免疫疾患である全身性エリテマトーゼス (以下 SLE) における血清可溶性 HLA (Serum Soluble, Ss HLA) class I 抗原の臨床的意義を明らかにする目的で、ELISA を用いた新しい dot blotting 法¹¹⁾に基づき測定し検討した。

II. 対象と方法

1. 対 象

1982 年 ARA 診断基準¹²⁾を満たした SLE 患者 21 名 (平均年齢 32.3 歳、ステロイド平均投与量 19.8 mg/day) につきそれぞれ経過を追って計 55 回 (以下表現法を 55 ポイントとする) の血清を採取した。さらに健康人 17 名の血清をコントロールとして使用した。

2. モノクローナル抗体

HLA class I 抗原に対するマウス抗体はモノモーフ

ニック単クローン抗体, W 6/32 (Sera-Labo, UK) を用いた。

3. 方 法

1) 検査血清の調整

血清はすべて 0.22 μ m フィルターで濾過後、DEAE アフィゲルブルー (BIO RAD 社, CA) カラムに血清を通し、アルブミンを吸着除去した。アルブミン除去血清は透析膜にて濃度をはじめの濃度まで濃縮した後、抗アルブミン抗体 (Cappel 社, PA) を 2.5 μ l/ml 加えて、4°C で 2 時間反応させた。さらに 20%-staph A を加え 4°C で一晩放置した。13,750 rpm で 5 分遠心分離し、その上清を使用した。

2) リンパ球細胞の培養上清 (Sup) と Lysate の調整

ヘパリン血 20 ml を採血し、生食で 2 倍に希釈した後、Ficoll-Conray 液 (比重: 1.077) で静かに重層した。1,500 rpm で 30 分室温で遠心分離したのち、中間層をピペットで採取した。採取した単核球は単球混入率 10% 以下、リンパ球 90% 以上であった。RPMI-1640 培養液で 1,500 rpm, 1,000 rpm, 800 rpm で 10 分ずつ計 3 回洗浄した。これを 2×10^7 個/ml に調整し、FCS 不添加 RPMI-1640 培養液に浮遊させ、37°C にて一晩 (8~10 時間) インキュベーションした。1,000 rpm で 10 分遠心分離し、その上清を

図 1 HLA class I 抗原に対する W 6/32 モノクローナル抗体を用い、正常リンパ球より得た Lysate に同一ヒト希釈血清添加の反応を検討した。リンパ球数 1×10^5 以上、また添加血清希釈 500 倍以上が必要であった。

培養上清 Sup) とした。また細胞は 1% Nonidet P-40 を含む lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.2, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) で攪拌したのち 0°C にて 30 分静置して溶解させ、13,750 rpm で 20 分遠心分離しその上清を Lysate とした。

3) 可溶性 HLA 抗原の測定

ニトロセルロースメンブレン BA 83 (Scheicher & Schuell 社) を PBS buffer に 2 時間浸し、ドット用プレートにセットした。各ウェルに抗原 (Lysate, Sup, 血清) を $10 \mu\text{l}$ ずつ入れ、室温で 1 時間静置したのちアスピレーターで完全に吸引した。3%-BSA/PBS を $200 \sim 250 \mu\text{l}$ 入れ、室温で 1 時間ブロックしたのち PBS で 3 回洗浄した。次に抗 HLA class I 抗体を $20 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 入れ、室温で 1 時間反応させた。PBS で 5 回洗浄したのち、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (BIO RAD 社, CA) $20 \mu\text{l}$ (1,000 倍希釈) を入れ、室温で 1 時間反応させた。メンブレンを PBS で 5 回 (30 分以上) 洗浄したのち、基質液 (10 mg 3,3'-ジアミノベンジジン-四塩酸塩, $20 \mu\text{l}$ 30% H_2O_2 , 40 ml 100 mM Tris-HCl) で発色させたのち、蒸留水で洗浄して反応を停止した。メンブレン上の発色の有無にて、反応の陽性・陰性を判断した。

III. 結 果

1. 可溶性 Serum soluble HLA 抗原と抗体との反応性の検討

1) 正常コントロール Lysate と同一ヒト血清添加による反応 (図 1, 表 1)

正常コントロール 10 人において、HLA class I 抗原に対する W 6/32 モノクローナル抗体を使用したところ、すべての Lysate において血清非存在下で $1 \times 10^3/\text{ml}$ 個以上の細胞数が反応に必要であった。希釈血清との反応関係をみると 2 および 10 倍希釈の血清添加で反応は阻害され消失した。一方、500 倍希釈の血清添加では $1 \times 10^3/\text{ml}$ 個の最少細胞数でも反応が認められた。

2) 正常コントロール Sup と同一ヒト血清添加による反応 (表 2)

正常コントロール 10 人において、HLA class I 抗原に対する W 6/32 モノクローナル抗体を使用したところ、すべての Sup において血清非存在下で $1 \times 10^4/\text{ml}$ 個以上の細胞数が反応に必要であった。希釈血清との反応関係をみると 2 から 50 倍希釈血清の添加で反応は阻害され消失した。一方、1,000 倍希釈より $1 \times 10^4/\text{ml}$ 個の最少細胞数でも反応が認められるようになった。

2. 正常コントロール血清の反応

1), 2) の結果より、可溶性 HLA 抗原を detect できる

表 1 正常血清と本人末梢リンパ球 (Lysate) との関係

Normal serum 本人 PBL. Ly	×0	×2	×10	×50	×100	×500	×1,000	×5,000	×10,000	×50,000
2×10 ⁵	+									
1×10 ⁵	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5×10 ⁴	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
1×10 ⁴	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5×10 ³	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
1×10 ³	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
5×10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1×10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MoAb : W 6/32 (Class I)

表 2 正常血清と本人末梢リンパ球 (Sup) との関係

Normal serum 本人 PBL. Ly	×0	×2	×10	×50	×100	×500	×1,000	×5,000	×10,000	×50,000
2×10 ⁵	+									+
1×10 ⁵	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5×10 ⁴	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
1×10 ⁴	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
5×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1×10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5×10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1×10 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MoAb : W 6/32 (Class I)

きる細胞濃度は $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4 / \text{ml}$ 以上で、かつ血清の阻害物質の影響の消失しうる希釈倍数は 500 倍と考えられた。そこで、検体血清 500 倍希釈での反応例を陽性と判断した。正常コントロール血清ではモノクローナル抗体 W 6/32 に対し陽性の反応を認めなかった。

3. SLE 患者血清の反応

class I モノクローナル抗体 W 6/32 の反応では患

者血清 21 例 (全経過中 55 ポイント) のうち 9 例 (15 ポイント) で陽性の反応が認められた。横張の活動性診断基準¹³⁾による疾患活動性との関係では、23 ポイント中 13 ポイントで活動期に一致して陽性反応を示した (表 3)。そこで、疾患活動性と血清可溶性 HLA 抗原との関係をまとめてみると有意の相関を認めることがわかった (χ^2 検定, 危険率 0.1% 以下) (表 4)。とくに症例 S.S. は中枢神経症状を伴った CNS lupus で、重症の活動期に陽性であった class I

表 3 SLE 患者血清の可溶性 HLA class I 抗原反応

Point Name	1	2	3	4	5
K.A.	—	—			
M.A.	+	—	+	—	
K.I.	—				
T.I.	—				
H.O.	—	—	—	—	—
A.I.	—	—	—		
Y.K.	+				
J.K.	+				
M.K.	—	—			
A.S.	+	—	—	—	
F.S.	—				
E.S.	—	—	—	—	—
S.S.	+	+	—	—	—
K.S.	—				
Y.T.	+	+	—		
A.T.	+	+			
E.S.	—	—			
T.H.	+	—	—	—	—
M.M.	+	+	—		
M.Y.	—	—			
T.N.	+	+			

□: active SLE MoAb: W 6/32 (Class I)

の可溶性 HLA がステロイド大量治療による活動性の消失とともに陰性化した (図 2)。

4. SLE 患者リンパ球数と血清可溶性 HLA 抗原との関係

可溶性 HLA 抗原の陽性群と陰性群とのリンパ球数を比較検討した。陽性群平均 $930.4 \pm 471.2/\text{mm}^3$ は陰性群 $1,596.8 \pm 430.3$ に比べ有意に低い傾向を示した (図 3)。

IV. 考 案

血清可溶性 HLA 抗原に関しては、なおその測定方法が確定していない。その生物学的意義や産生機序に関しては、いまだ不明であり、したがって class I, class II それぞれの Ss HLA の性状についてもわかっ

表 4 SLE 疾患活動性と可溶性 HLA class I 抗原反応の関係

		SLE 疾患活動性	
		active*	inactive
可溶性 HLA class I 抗原反応	*positive	14	2
	negative	9	30

*: $p < 0.001$

ていない。1970 年代は cytotoxic inhibition test による検出法が主に用いられてきた³⁾。1980 年代に入りマイクロプレイトを用いた enzyme-linked immunoadsorbent assay¹⁴⁾ あるいは radio-immunoassay¹⁵⁾ 法が相次いで報告された。今回われわれは、山村らの方法¹¹⁾にてニトロセルロースメンブレンを用いた double determinant enzyme-linked immunoassay 法で可溶性 HLA 抗原の検出を行った。血清の阻害蛋白を取り除く目的で、まずアルブミンを除去した。ついで抗原性をなくさず、かつ阻害蛋白の影響をなくす目的で血清を希釈した。Lysate の血清希釈実験より可溶性 HLA 抗原の検出可能なリンパ球数は $1 \times 10^3/\text{ml}$ 以上であることがわかった。また血清は 500 倍以上の希釈で阻害蛋白の影響が消失することも証明できた。したがって、平均リンパ球約 $1,200/\text{mm}^3$ の血液より採取した血清を 500 倍に希釈しても、 $2.4 \times 10^3/\text{ml}$ と抗原検出に必要な十分な量の抗原が存在することがわかった。しかしなお、この Ss HLA 抗原の分子量、性状などは不明で、種々検討中である。

さらに、血清可溶性 HLA 抗原の臨床的意義もいまだ明らかにされていない^{16,17)}。白血病患者³⁾、骨髄移植後の recipient^{7,10)}、AIDS 患者⁸⁾に存在するなどの報告がある。生体内にて免疫反応あるいは細胞代謝回転の進んだ状態に存在する可能性が考えられている¹⁸⁾。今回われわれは、自己免疫疾患である SLE の血清中に可溶性 HLA class I 抗原の存在を証明した。しかも疾患活動性に一致して認められ、また適切な治療により消失する例の存在することもわかった。SLE 疾患における可溶性 HLA 抗原は、免疫複合体を形成し臓器障害や疾患活動性の一因となりうる病因的な可能性が考えられた。しかし、逆に SLE 疾患自体に伴う免疫系の賦活化された状態や、細胞代謝回転の亢進

図 2 CNS lupus 患者経過表 (52 Y/O, male)

図 3 可溶性 HLA 抗原の陽性群と陰性群とのリンパ球数を比較検討した。陽性群は陰性群に比し有意にリンパ球は少なかった (t 検定, 危険率 5% 以下)。

状態を反映する病態としての可能性も否定できない。

疾患活動性が認められるにもかかわらず、可溶性 HLA 抗原の認められなかった 7 例 (10 ポイント) につき検討したところ、7 例のうち 5 例で腎症 SLE、しかもネフローゼ症候群を認めていた。血清可溶性 HLA 抗原は、抗原性も低く分子量も小さいと考えられる糖蛋白¹⁹⁾のため、ネフローゼ症候群では尿中に排泄されてしまい反応が陰性化するのではないかと考えられた。

HLA class I 抗原は、 $\beta 2$ ミクログロブリンと非共有結合してほとんどすべての有核細胞に存在する細胞膜貫通蛋白で、もちろんリンパ球表面にも存在する。今回、可溶性 HLA 抗原の存在はリンパ球数と負の相関を示すことがわかった。また $\beta 2$ ミクログロブリン値も可溶性 HLA 抗原の存在と相関が認められなかつ

た (data not shown)。これらのことより可溶性 HLA class I 抗原の遊出に与える因子として、リンパ球の絶対数やリンパ球の膜脆弱性あるいは単なる細胞の turn over だけではなく、リンパ球表面 class I 抗原自体の量的変化や脆弱性なども考えられた。今後、可溶性 HLA class I 抗原の遊出機序に関するさらなる研究が望まれる。

以上、ニトロセルロースメンブレンを用いた double determinant enzyme-linked immunoassay 法にて、SLE 患者血清中に可溶性 HLA class I 抗原を証明した。その生物学的意義はいまだ不明な点が多く、その解明に示唆を与える研究と考えられた。

本研究の一部は厚生省難病調査研究班の研究費によった。

文 献

- 1) Van Rood, J.J., Van Leeuwen, A., Van Sauten, M.C.T.: Anti-HL-A9 inhibition in normal human serum. *Nature*, 226: 366~367, 1970.
- 2) Charlton, R.K., Zmijewski, C.M.: Soluble HL-A7 antigen localization in the β -lipoprotein fraction of human serum. *Science*, 170: 636~637, 1970.
- 3) 辻 公美・渋谷恵子・井上博雄: 血漿中遊離 HLA 抗原の測定方法とその生物学的意義. 移植, 14: 171~176, 1979.
- 4) 坂口孝作・小出典男・荒木康之・他 6 名: モノクローナル抗体による血清中 HLA-B27 および HLA-A2 の検出. 消化器と免疫, 20: 73~77, 1988.
- 5) Vilar, L.M., Roy, G., Lazaro, I. et al.: Detection of soluble class I molecules (non HLA-A or HLA-B) in serum, spleen membranes and lymphocytes in culture. *Eur. J. Immunol.*, 19: 1835~1839, 1989.
- 6) Billing, R.J., Safani, M., Petersen, P.: Soluble HLA antigens present in normal human serum. *Tissue Antigens*, 10: 75~82, 1977.
- 7) Tsuji, K., Kusama, M., Nakatsuji, T., Kato, S.: Biological significance of Ss (Serum soluble) HLA-class I antigens in bone marrow transplantation. *Tokai. J. Exp. Clin. Med.*, 10: 169~174, 1985.
- 8) Ferreira, A., Villar, M.L., Alvarez, Cermenio, J.C. et al.: Quantification of soluble serum HLA class I antigens in healthy volunteers and AIDS patients. *Clinica. Chimica. Acta.*, 174: 207~212, 1988.
- 9) Davies, H. F. S., Pollard, S.G., Calne, R.Y.: Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients. *Transplantation*, 47: 524~527, 1989.
- 10) Grosse-Wilde, H., Doxiadis, I.: Allotyping for HLA class I using plasma as antigen source. *J. Immunogenetics*, 16: 1~7, 1989.
- 11) Yamamura, M. et al.: in preparation
- 12) Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F. et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.*, 25: 1271~1277, 1982.
- 13) 横張龍一: SLE 活動性判定基準. 厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班昭和 60 年研究業績, 1986, pp. 50~57.
- 14) Stevenson, F.K., George, A.J.T., Walters, M. T., Hamblin, T.J.: Analysis of soluble HLA class II antigenic material in patients with immunological diseases using monoclonal

- antibodies. *J. Immunol. Method*, 86 : 187~190, 1986.
- 15) Russo, C., Fotino, M., Carbonara, A., Ferrone, S. : A double determinant immunoassay for HLA class I typing using serum as antigen source. *Human. Immunology*, 19 : 67~77, 1987.
- 16) Allison, J.P., Pellegrino, M.A., Ferrone, S., Callahan, G.N., Reisfeld, R.A. : Biologic and chemical characterization of HLA antigens in human serum. *J. Immunol.*, 118 : 1004~1009, 1977.
- 17) Tsuji, K. : Ss (Serum soluble) HLA antigens and their biological significance. *Tokai. J. Exp. Clin. Med.*, 4(supplement) : 117~129, 1979.
- 18) 小森清和・渋谷恵子・塩飽徳行・能勢義介・井上博雄・辻 公美 : 高齢者 HLA-system の研究. II. 高齢者における血清中 β_2 -microglobulin 値と可溶性 HLA 抗原活性に関する研究. *臨床免疫*, 11 : 681~686, 1979.
- 19) Villar, L.M., Roy, G., Lazaro, I. et al. : Detection of soluble class I molecules (non HLA-A or HLA-B) in serum, spleen membranes and lymphocytes in culture. *Eur. J. Immunol.*, 19 : 1835~1839, 1989.
-