● 原著

全身性エリテマトーデスにおける 尿中抗核抗体の意義

菅原 正弘・橋本 博史・谷 口 修
高崎 芳成・廣瀬 俊一

Jpn. J. Clin. Immun., 15 (1) : 13~19, 1992.

Significance of urinary antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus

Masahiro Sugawara, Hiroshi Hashimoto, Osamu Taniguchi,
Yoshinari Takasaki and Shunichi Hirose

*From the Division of Rheumatology, Department of
Internal Medicine, Juntendo University, School of Medicine*

【Summary】

Urinary autoantibodies, focussing on immunoglobulin G (IgG), and various autoantibody activities, were investigated. There were significant correlation between urinary ANA titers and urinary IgG levels ($p < 0.001$), and between urinary and serum ANA titers ($p < 0.001$). Patients with speckled staining pattern of serum ANA showed higher frequencies in the appearance of urinary ANA ($p < 0.01$).

Using ELISA, patients with anti-DNA antibody and Anti-Sm antibody were investigated. We could find a significant difference between the ratio of urinary anti-DNA and that of anti-Sm antibodies ($p < 0.01$).

Urinary ANA may be unsuitable as a indicator of routine diagnosis for early renal involvement, but seems to reflect indirectly to the potentiality of renal trapping of antibodies.

Key words : SLE,
ANA,
urine

【概 要】

全身性エリテマトーデス (SLE) における尿中各種抗核抗体の測定を行い, その意義を検討した。尿中抗核抗

体価は血中抗体価、尿中 IgG 量と有意の相関を示した ($p < 0.001$)。また、血中で speckled pattern を呈した症例は homogeneous を呈した症例に比し尿中 ANA 陽性例が有意に多く認められた ($p < 0.01$)。通常検査で蛋白尿陰性にもかかわらず尿中 ANA 陽性例がみられたが、全例血中 ANA 値 $\times 2,560$ 以上と高値で尿中 IgG 量も尿中 ANA 陰性例に比し有意に多く認められた ($p < 0.01$)。

ELISA による血中抗体陽性例を用いた検討では抗 Sm 抗体は抗 DNA 抗体に比し尿中陽性例が有意に多く認められた ($p < 0.01$)。

尿中抗核抗体は腎症の早期診断には不適と思われたが、臨床への応用の可能性が示唆された。

I. 緒 言

全身性エリテマトーデス (SLE) においては各種抗核抗体が検出され、その臨床的意義および病態との関連が注目されている。SLE の臓器病変は多種多様であるが、なかでも腎症は予後に大きく関与し、病態を解明するうえでも重要である。これまでループス腎炎の臨床的、免疫学的、病理組織学的検討が数多くなされてきた。

1983 年 Merhew ら¹⁾は、ルーチン検査における蛋白尿陰性 SLE でも尿中抗核抗体 (以下尿中 ANA) 陽性例のあることを報告し、基底膜病変の初期の変化と関係している可能性があるとして述べているが、その臨床的意義は明らかではなかった。

今回われわれは尿中 ANA の検討を行ったので報告する。

II. 対象および方法

1. 対 象

1982 年のアメリカリウマチ協会 (ARA) の SLE revised criteria²⁾ を満たす自験 SLE 症例 75 例 (男性 8 例, 女性 67 例) を検討の対象とした。患者の年齢は 15~66 歳, 平均 38.1 歳であった。通常のスルホサリチル酸法による蛋白尿定性の下限域を考慮し、尿異常所見は①蛋白尿 1 mg/dl 以上ないし、②顆粒・血球円柱陽性ないし ③尿中赤血球数 10/各視野以上のいずれかが認められた場合を陽性とし、陽性群と陰性群に分け検討した。

尿異常所見陽性群 (46 例) では患者の年齢は 15~66 歳, 平均 37.7 歳, 男女比は 5:41 であった。尿異常所見陰性群 (29 例) では患者の年齢は 18~58 歳, 平均 38.8 歳, 男女比は 3:26 であった。

2. 方 法

血清、原尿および濃縮尿中の免疫グロブリン分画を検体として用いた。

尿濃縮は硫酸塩析法により行った。すなわち 24 時間蓄尿一部 200 ml (血液検体と同日の採尿) を遠心分離し、上清を phosphate buffer saline (PBS, 0.01 M, pH 7.4) にて透析後硫酸アンモニウムで塩析し、得られた免疫グロブリン分画を再度 PBS 透析したものを被検検体とした。

ANA はラット肝切片を核材とし、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト IgG 抗体を 2 次抗体として用いた蛍光抗体法 (MBL 社製, ANA テスト) により検出した³⁾。判定は 5 倍希釈以上を陽性とし、陽性を示す最高希釈倍数を抗体価とした。抗 DNA 抗体は Farr らの変法 (RCC 社, DNA テスト)⁴⁻⁶⁾ およびウシ胸腺 2 本鎖 DNA を抗原とし、ウサギ抗ヒト IgG 抗体を 2 次抗体として用いたマイクロプレートによる ELISA により測定した。抗 Sm 抗体はウサギ胸腺 PBS 抽出液 (RTE) を抗原とした二重免疫拡散法⁷⁾ および精製 Sm を抗原とした ELISA により測定した⁸⁾。抗 n-RNP 抗体はウサギ胸腺 PBS 抽出液 (RTE) を抗原とした、また SSA 抗体はモルモット肝 PBS 抽出液を抗原とした二重免疫拡散法により測定した⁹⁾。

尿中 IgG 量はマイクロプレートを用いた ELISA により測定した。

3. 有意差検定

χ^2 および student-t 検定を用いた。

III. 結 果

1. 尿中各種抗核抗体の陽性率の検討 (表 1)

抗 DNA 抗体は Farr らの変法、抗 Sm 抗体は二重免疫拡散法により測定した。40 倍濃縮尿を用いて検討した。

尿異常所見陽性群では 46 例中 22 例 (48%)、陰性群では 29 例中 4 例 (13.8%) が尿中 ANA 陽性であった。尿異常所見陽性群は陰性群に比し尿中 ANA 陽性例が有意に多かった ($p < 0.01$)。尿異常所見陽性

群においては抗 n-RNP 抗体, 抗 Sm 抗体, 抗 SSA 抗体は 33~57% に陽性例が認められた。尿異常所見陰性群では陽性例はみられなかった。抗 DNA 抗体は尿異常所見の有無によらず全例陰性であった。ELISA を用いた 40 倍濃縮尿中の抗 DNA 抗体価, 抗 Sm 抗体価の検討では尿異常所見陽性群では, 抗 DNA 抗体は血清陽性例 39 例中 2 例 (5%), 抗 Sm 抗体は 12 例中 4 例 (33%) が陽性であった。抗 DNA 抗体は抗 Sm 抗体に比較し尿中陽性率は有意に低値であった (表 2)。

2. 尿異常所見陽性例における検討

尿異常所見陽性群において尿中 ANA 値と尿中 IgG 量の相関について検討した (図 1)。尿中 ANA 値と血中 ANA 値の間に有意の相関が認められた ($p < 0.001$)。

表 1 Incidence of urinary autoantibodies from SLE patients (1)

Urinary autoantibodies	Urinary abnormalities	
	Present	Absent
ANA	22/46* (48)**	4/29 (14)**
Anti-DNA antibody	0/39 (0)	0/17 (0)
Anti-nRNP antibody	4/7 (57)	0/9 (0)
Anti-Sm antibody	4/12 (33)	0/4 (0)
Anti-SSA antibody	3/7 (43)	0/3 (0)

* Positive patients/total patients having each antibody in sera (%)

** $p < 0.01$

Activities of anti-DNA antibody were measured by a modification of Farr's assay. Activities of anti-Sm antibody were measured by the double immunodiffusion method. Urine specimens for detection of autoantibodies were prepared by 40-fold concentration.

0.001)。また尿中 ANA 値と尿中 IgG 量の間にも有意の相関が認められた ($p < 0.001$)。

ANA の staining pattern を血中と尿中で比較すると両者一致していたが, 血中で speckled pattern を呈した症例は 17 例中 13 例 (76%) が尿中 ANA 陽性であったのに比し, homogeneous pattern を呈した症例では 23 例中 3 例 (13%) と有意に尿中 ANA 陽性例が少なかった ($p < 0.01$) (表 3)。

3. 尿異常所見陰性例における検討

尿異常所見陰性群において尿中 ANA 値と尿中 IgG 量の相関につき検討した (図 2)。尿中 ANA 陽性例は陰性例に比し尿中 IgG 量が有意に多かった ($p < 0.01$)。尿中 ANA 陽性例は全例が血中 ANA 値 2,560 倍以上と高値であったが, 尿中 ANA 値は 5 倍と低値であった。

尿異常所見陰性例の血中各種抗核抗体につき検討した結果, 尿中 ANA 陽性例は陰性例に比し血中抗 n-RNP 抗体陽性例が有意に多く認められた (表 4)。尿中 ANA の staining pattern は全例が speckled pattern であった。

表 2 Incidence of urinary autoantibodies from SLE patients (2)

Urinary autoantibodies	Urinary abnormalities	
	Present	Absent
Anti-DNA antibody	2/39 (5)*	0/5 (0)
Anti-Sm antibody	5/13 (38)*	0/5 (0)

* $p < 0.01$

Positive patients/total patients having each antibody in sera (%). Activities of anti-DNA antibody and anti-Sm antibody were measured by ELISA.

表 3 Staining pattern of urinary ANA from SLE patients with urinary abnormalities

Staining pattern of serum ANA	Staining pattern of urinary ANA				Positive (%)
	Homo and Spe	Spe	Homo	ANA-negative	
Homogeneous and speckled	2	3	1	0	100*
Speckled	0	13	0	4	76*
Homogeneous	2	0	1	20	13
Total	4	16	2	24	48

* $p < 0.01$ compared with homogeneous pattern of serum ANA.

Homo ; homogeneous. Spe ; speckled.

図 1 尿異常所見陽性群における尿中 ANA 値と血中 ANA 値、尿中 IgG 量との相関

- (A) 尿中 ANA 値は血中 ANA 値と有意の相関を示した ($p < 0.001$).
 (B) 尿中 ANA 値は尿中 IgG 量と有意の相関を示した ($p < 0.001$).

表 4 Relationship between urinary ANA and serum anti-nRNP antibodies in the group of patients without urinary abnormalities

Urinary ANA	Serum anti-nRNP antibodies	
	Negative	Positive
Negative	20	5
Positive	0	4

The patients with urinary ANA included significantly more patients with serum anti-nRNP antibody than patients without serum anti-nRNP antibody ($p < 0.01$).

IV. 考 察

全身性エリテマトーデスにおける各種抗核抗体の研

究は近年著しい進歩を遂げたが、尿中抗核抗体に関しては報告も少なく今なお不明な点も多い。

1983 年 Merhew ら¹⁾は尿中 ANA を検索し以下の結論を得ている。① 尿中 ANA 値と 24 時間尿の蛋白総量とは相関がなかった。② 尿中 ANA は正常の免疫グロブリンの分子量をもっている。③ ANA の staining pattern は血中と尿中で同じであった。④ 通常の検査で蛋白尿陰性例で尿中 ANA 陽性例があり、糸球体基底膜の初期の変化を示すと思われ、腎症の早期診断の指標となる可能性がある。一方、今回の著者らの検討では尿中 ANA には、血中抗体価、尿中 IgG 量、抗体の種類 3 因子の関与が大きいことが明らかになった。

ループス腎炎の成因に関して、いまだ不明の点が多いが、SLE では疾患活動性と抗 DNA 抗体価が相関

図 2 尿異常所見陰性群における尿中 IgG 量

尿中 ANA 陽性群は陰性群に比し尿中 IgG 量が有意に多かった ($p < 0.01$).

する症例が多いこと¹⁰⁻¹³⁾, 血中抗 DNA 抗体価と流注免疫複合体が正の相関を示すこと¹⁴⁻¹⁷⁾, ループス腎炎増悪前に血中に遊離 DNA が出現し, その後抗 DNA 抗体価が減少することなど^{18,19)}から抗 DNA 抗体が腎症に密接に関与していると考えられている。また, 最近ではマウスを用いた研究により, 一定の idiotypic を有する IgG 抗 DNA 抗体と腎症との関連が注目されている²⁰⁾。

一方, 抗 DNA 抗体による腎症の発症様式には, 1) DNA 抗原と抗 DNA 抗体が流注免疫複合体を形成し, これが腎に沈着して腎炎を発症させる²¹⁾, 2) DNA が基底膜内コラーゲンと電気親和性を有しており, 基底膜にまず血中遊離 DNA が結合し, 遅れて抗 DNA 抗体が結合し, 局所で免疫複合体が形成され腎症を発症させる²²⁾, 3) 抗 DNA 抗体が腎糸球体の基底膜の構成成分である proteoglycan と交叉反応性を有し, 腎症を発症させる²³⁾などの機序が考えられてい

る。

1)~3) のどの機序であっても腎に抗 DNA 抗体が trapping されていれば, 尿中に排出される抗 DNA 抗体は減少するものと考えられる。山田ら²⁴⁾は RIA 法を用いてループス腎炎患者の血中, 尿中抗 DNA 抗体価を測定し, 腎炎増悪時の血中抗 DNA 抗体価の減少が尿中排泄の増加でないことを報告し, trapping された可能性を示唆した。

今回のわれわれの検討で血中抗核抗体が homogeneous の症例は speckled の症例に比較し, 尿中抗体陽性率が低いこと, ELISA にても尿中抗 DNA 抗体陽性率は抗 Sm 抗体に比較してきわめて低いことは腎への抗 DNA 抗体の trapping を反映していると思われる。

尿中に ANA が多量に検出されるためには ① 血中抗核抗体価が高値である, ② 尿中 IgG 量が多い, ③ 腎に trapping されにくい抗体である, などのいくつかの条件を満たす必要があると考えられる。

通常の検査で蛋白尿陰性でも尿中 ANA 陽性例が認められたが, これらの症例はいずれも血中 ANA 値 $\times 2,560$ 以上で尿中 IgG 量も比較的多く, staining pattern は全例が speckled pattern であり, 上記 ①~③ のすべてを満たすような症例であった。尿に排出されるのは腎症とむしろ関連が少ない抗体であると考ええると尿中抗核抗体は早期腎症の診断には不適と思われる。

ループス腎炎患者の腎糸球体溶出液中に抗 DNA 抗体以外に核蛋白, ヒストン, 非ヒストン核蛋白, 抗 RNP 抗体, 抗 Sm 抗体, 抗 SSA 抗体が同定されたとの報告がある²⁵⁾。今回検討したわれわれの症例のなかにも血中抗 RNP 抗体高値で尿中 IgG 量も多いのに尿中 ANA 陰性例が認められたが, かかる症例では抗 RNP 抗体が腎に trapping されているのかもしれない。

今回, ELISA にて抗 DNA 抗体と抗 Sm 抗体の測定を行ったが, 他の抗体に関しても ELISA での定量が可能になれば, 血中と尿中の抗体価と IgG 量の比較により腎に trapping されている抗体の種類, 量を間接的に推定できるようになるかもしれない。

尿中抗核抗体は早期腎症の示標としては不適と思われるが, さらに詳細に検討することにより臨床へ応用できる可能性があると考えられた。

稿を終えるにあたり御指導を賜りました順天堂大学

膠原病内科 藤 治言講師, 平野隆雄講師, 御協力い いただきました田嶋美智子氏に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Merhew, N.L., Misser, R.P., Tan, E.M. : Urinary excretion of antinuclear antibodies. *J. Rheumatol.*, 267 : 913~919, 1983.
- 2) 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.
- 3) Tan, E.M. : Relationship of nuclear staining patterns with precipitating antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Lab. Clin. Med.*, 70 : 800~812, 1967.
- 4) Andrew, L.A., Lakmaker, F., Feltkamp, T.E. W. : Immunology of DNA. I. The influence of reaction conditions on the Farr assays as used for the detection of anti-ds DNA. *J. Immunol. Meth.*, 10 : 27~37, 1976.
- 5) Andrew, L.A., Lakmaker, F., Feltkamp, T.E. W. : Immunology of DNA II. The effect of size and structure of the antigen on the Farr assay. *J. Immunol. Meth.*, 10 : 39~48, 1976.
- 6) Aitchesson, C.T., Joslin, F., Tan, E.M. : Characteristics of antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 528~538, 1980.
- 7) Northway, J.D., Tan, E.M. : Differentiation of antinuclear antibodies giving speckled staining patterns in immunofluorescence. *Clinical Immunol. Immunopathol.*, 1 : 140~154, 1972.
- 8) Yasuma, M., Takasaki, Y., Matsumoto, K. et al. : Clinical significance of IgG anti-Sm antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*, 17 : 469~475, 1990.
- 9) Ohata, N. : Clinical significance of antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *The Ryumachi*, 27 : 79~87, 1987.
- 10) Schur, P.H., Monroe, M., Rothfield, N. : The Ig subclass of antinuclear and antinuclear acid antibodies. *Arthritis Rheum.*, 15 : 174~182, 1972.
- 11) Sontheimer, R.D., Gilliam, L.N. : DNA antibody class, subclass and complement fixation in systemic lupus erythematosus with and without nephritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 10 : 459~467, 1978.
- 12) Hashimoto, H., Utagawa, Y., Yamagata, J. et al. : The relationship of renal histopathological lesions to immunoglobulin classes and complement fixation of anti-native DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Rheum.*, 12 : 209~214, 1983.
- 13) Winfield, J.B., 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.
- 14) Nydegger, U.E., Lanobert, P.H., Gerber, H. et al. : Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B antigen. *J. Clin. Invest.*, 54 : 297~309, 1974.
- 15) Huston, K.A., Gupta, R.C., Donald, J.V. et al. : Circulating immune complexes in systemic lupus erythematosus. Association with other immunologic abnormalities but not with changes in renal function. *J. Rheumatol.*, 5 : 423~432, 1978.
- 16) Levinsky, R.J., Cameron, J.S., Soothill, J.F. et al. : Serum immune complexes and disease activity in lupus nephritis. *Lancet*, 1 : 564~567, 1977.
- 17) Tung, K.S.K., De Horatius, R.J., Williams, R. C. : Study of circulating immune complex size in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, 43 : 615~625, 1981.
- 18) Tan, E.M., Schur, P.H., Carr, R.I. et al. : Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibody to DNA in the serum of patients with sys-

- temic lupus erythematosus. J. Clin. Invest., 45 : 1732~1740, 1966.
- 19) Swaak, A.J.G., Aarden, L.A., Statius, L.W. et al. : Anti-ds DNA and complement profiles as prognostic guides in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum., 22 : 226~235, 1979.
- 20) Hahn, B.H., Ebling, F.M. : Idiotypic restriction in murine lupus ; High frequency of three public idiotypes on serum IgG in nephritic NZB/NZW F₁ mice. J. Immunol., 138 : 2110~2118, 1987.
- 21) Koffler, D., Schur, P.H., Kunkel, H.G. : Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med., 126 : 607~623, 1967.
- 22) Izui, S., Lambert, P.H., Miescher, P.A. : *In vitro* demonstration of a particular affinity of glomerular basement membrane and collagen for DNA. A possible basis for a Local formation of DNA-anti-DNA complexes in systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med., 144 : 428~443, 1976.
- 23) Faaber, P., Capel, P.J.A., Rijke, G.P.M. et al. : Cross-reactivity of anti-DNA antibodies with proteoglycans. Clin. Exp. Immunol., 55 : 502~508, 1984.
- 24) Yamada, A., Miyakawa, Y., Kosaka, K. : Entrapment of anti-DNA antibodies in kidney of patients with systemic lupus erythematosus. Kidney International, 22 : 671~676, 1982.
- 25) Maddison, P.J., Reichlin, M. : Deposition of antibodies to a soluble cytoplasmic antigen in the kidneys of patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum., 22 : 858~863, 1979.
-