全身性エリテマトーデスにおける抗核因子の尿中排泄

東京大学医学部中尾内科教室（指導 中尾喜久教授）

長 沢 俊 彦 柴 田 整 一

URINARY EXCRETION OF ANTINUCLEAR FACTORS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Toshihiko NAGASAWA and Seiichi SHIBATA

The Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo

(Director: Prof. Kiku Nakao)

概要 血清中抗核因子が陽性のSLE症例を蛋白尿の有無によつて2群にわけて、それぞれの尿中抗核因子排泄量を定量的に比較することを試みた。抗核因子の検索は血清、尿とも蛍光抗体間接法を用いた。その結果、蛋白尿を伴うSLE、すなわちlupus nephritisの例では蛋白尿を欠くSLEに比べて大量の抗核因子が尿中に排泄されることが見出された。lupus nephritisを伴うSLEでは血清中抗核因子のstaining titerの低い例が多いが、これは上述の成績を考えればきわめて説明しやすい。一方、蛋白尿を欠くSLEでは血清中抗核因子のstaining titerが一定の値（われわれの方法では 2^8 倍）以上を呈する場合にのみ尿中抗核因子が陽性となることも認められた。lupus nephritisの群の抗核因子尿中排泄量と腎機能ないし腎生検所見との間には必ずしも密接な相関は見出せなかつたが、今回われわれのえた成績はlupus nephritisの成因を考えてゆく上にきわめて示唆に富む所見と思われる。

緒 言

膠原病諸疾患の診断上に占める血清中抗核因子検索の意義についてはすでに報告した¹⁾²⁾。

その後、さらに全身性エリテマトーデス（以下SLEと略す）の多数症例について検討を重ねているうちに、蛋白尿を伴ういわゆるlupus nephritisの症例では、蛋白尿を伴わない症例に比して血清中抗核因子のstaining titerの低い例が多いという事実が見出された。この事実は血清中の抗核因子が蛋白尿として尿中に失なわれてゆく可能性を強く示唆している。

Lupus nephritisの尿蛋白、とくに γ -globulinの排泄については今までに若干の報告³⁾⁴⁾をみるが、抗核因子の尿中排泄についての系統的な研究はわ

ずかにHanson & Tan⁵⁾が尿中にみられる抗体蛋白の構造についての立場から報告しているのを見るにすぎない。そこでわれわれは血清中抗核因子が陽性のSLE症例について、（1）すべての例で尿中に抗核因子が排泄されるか否か、（2）尿蛋白を伴う例としかからざる例とで抗核因子の尿中排泄に質的、量的になんらかの差異があるか否か、の2点に焦点をしばつて検索を試み、興味ある二、三の成績をえたのでその結果を報告する。

材料と実験方法

1. 対象症例： 現在までにわれわれが扱つたSLE症例で血清中抗核因子が陽性を呈したものは検索総数44例中43例で、そのstaining titerは少なくとも初回測定時には全例 2^5 倍以上を示している。これら症例を蛋白尿の有無にしたがつてA群；ズルフォサリチル酸による定性試験で尿蛋白

本論文の要旨は第31回日本循環器学会総会において発表した。

表1. B群・lupus nephritis 8症例の臨床成績

症例	年齢 性	尿蛋白 g/d	尿蛋白 mg/dl	尿蛋白 mg/dl	24h日尿 mg/dl	腎臓病	腎生検
西○	27♀	3.9	4.8	70	580	低下	L.N.
吉○	24♀	3.6	5.0	55	350	低下	未施行
斉○	18♀	1.8	7.2	16	256	正常	L.N.
佐○	21♀	1.5	6.0	12	312	正常	L.N.
鎌○	24♀	2.1	6.0	16	346	正常	L.N.
秋○	21♀	1.8	7.0	13	288	正常	L.N.
塚○	22♀	6.8	5.2	13	760	正常	L.N.
炭○	24♀	1.6	5.2	26	480	正常	L.N.

L.N.: lupus nephritis の組織像

表2. A, B両群の血清中抗核因子のstaining titer

が全く陰性か、もしくは痕跡程度に陽性を呈する例(35例), B群; 表1に示すごとく尿蛋白の排泄が著しく臨床的にも腎生検所見上も典型的なlupus nephritisの像を呈する例(8例)の2群にわけた。この両群の症例のなかから1日尿を集める操作を行ないやすい症例をA群から12例, B群から7例えらんで尿中抗核因子検索の対象とした。なお、これらの症例は投与量、投与期間は各例によって異なるが、すべてステロイド治療をすでに実施中である。

2. 尿の濃縮方法: 実験成績の項で述べるごとく患者から排泄された原尿について抗核因子を検索してもすべて陰性であるため、尿を濃縮して検討する必要がある。この目的のため朝8時から翌朝8時までの24時間尿を集めた。入院患者の場合には蓄尿中、尿を4℃の冷所に保存した。一部通院中の症例については検索期間を12月から2月の冬期にかぎり、なるべく戸外に尿を保存するように指示した。

表3. A, B両群の血清および尿中抗核因子のstaining titer

症例	尿凍結乾燥 物質の重量 (mg/日)	抗核因子のST	
		血清	尿
A群	大○	106.8	2 ¹¹
	鈴○	72.1	2 ¹¹
	十○	70.6	2 ¹⁰
	永○	82.4	2 ⁹
	杉○	138.9	2 ⁹
	橋○	73.5	2 ⁸
	松○	114.1	2 ⁷
	間○	68.7	2 ⁷
	朝○	76.9	2 ⁷
	河○	54.3	2 ⁵
B群	黄○	101.9	2 ⁴
	中○	79.2	2 ³
	西○	3824.5	2 ⁷
	吉○	3265.3	2 ⁹
	斉○	1337.8	2 ⁸
	佐○	1472.6	2 ⁵
	鎌○	2098.2	2 ⁶
	秋○	1752.7	2 ⁷
	塚○	6244.2	2 ⁶
			2 ²

いずれの場合にもとくに防腐剤は加えなかった。このようにして集めた24時間尿は尿量を測定し、一部をEsbach法による尿蛋白の定量にまわしたのち、残りをただちに3000rpmで10分間遠沈し、生じた沈渣はすて、上清をVisking cellulose tube (27/32) につめて4℃の条件下で最初の24時間は流水で、つぎの24時間は蒸留水で透析した。透析終了後、尿を濾過してから凍結乾燥し、生じた乾燥粉末は重量を測定し、抗核因子を測定するまでデシケーターの中に保存した。

この方法で尿蛋白陽性のB群からはEsbach法で測定した1日の尿蛋白排泄量(表1)にほぼ等しい大量の乾燥物質を回収することができた(表3)。一方、尿蛋白陰性のA群では1日尿から回収しうる乾燥物質の量はごくわずかで(表3)、後述の尿中抗核因子を測定するのに充分でないため、2ないし3日分の尿を集め、これを凍結乾燥して蛋白を回収した。

3. 抗核因子の測定方法: 血清、尿ともに蛍光抗体間接法を用いて検索した。血清の場合にはその術式はすでに詳細に報告¹⁾²⁾⁶⁾したので省略する。尿については上述の凍結乾燥物質を生理食塩水(以下生食と略す)で溶解し、この溶液につ

いて血清の場合と全く同じ方法で抗核因子を検索した。その際、すべての例で生食溶液の蛋白濃度を日立蛋白計を用いて 7.0 g/dl に統一した。

血清、尿いずれの場合にも抗核因子が陽性の例では原血清、もしくは原濃縮尿を生食で 2^0 倍から 2^{11} 倍まで倍々稀釈し、そのおのおのについて蛍光抗体間接法を行ない、核に特異蛍光の見出せる最終稀釈倍数 (2^n) をもってその血清または尿の staining titer (以下 S T と略す) とみなした。なお同一症例の血清と尿の S T を比較する場合、血清の S T は 1 日尿を集めた日に採血、測定した値を用いた。

実験成績

1) A, B 両群の血清中抗核因子の S T

A 群、すなわち蛋白尿を伴なわない S L E 35 例、B 群、すなわち蛋白尿を伴う lupus nephritis 8 例の血清中抗核因子の S T を比較したのが表 2 である。A 群の S T は 2^5 倍から 2^{11} 倍の間に分布しているのに対して B 群では 2^5 倍から 2^9 倍の間に分布し、S T の最高値は A 群に比して 2 段階低くなっている。一方、各群についてそれぞれの平均値をみても、A 群は 2^8 倍、B 群は 2^7 倍であり、B 群の方が 1 段階低値を示している。

2) 尿中抗核因子の陽性率

濃縮していない尿について、血清と全く同じ方法で抗核因子を検索したが、すべて陰性であった。

そこで凍結乾燥したサンプルを生食に溶解し、その蛋白濃度を 7.0 g/dl に合わせた濃縮尿について抗核因子を検索すると、A 群では 12 例中 6 例が陽性、B 群では 7 例すべて陽性という成績がえられた。これら各症例の血清および尿中抗核因子の S T は表 3 に示すごとくである。なおこの表中の A 群で血清の S T が 2^5 倍以下を示す 2 例はステロイドの大量投与以前にはそれぞれ 2^{10} 倍、 2^6 倍を呈していた症例である。

ここで A, B 両群各症例の血清と尿の S T の相関をプロットしてみると、蛋白尿を伴なわない A 群では表 4 に示すごとく、血清中の S T が 2^7 倍

表 4. A 群各症例の血清および尿中抗核因子の staining titer

までは尿中抗核因子はすべて陰性、血清中の S T が 2^8 倍以上になると、尿中抗核因子はすべて陽性、しかもその S T は血清中の S T と直線的に正の相関を示すという成績がえられた。

また、A 群の 2 症例 (表 3 の大○例と橋○例) では血清と尿の抗核因子の経時的変動を観察できたが、血清 S T が 2^{11} 倍から 2^9 倍に下降した大○例では尿中 S T は 2^7 倍から 2^5 倍に下降し、血清 S T が 2^8 倍から 2^6 倍に下降した橋○例では尿中 S T は 2^4 倍から陰性化した。

B 群については A 群でみられたような相関は全く成立しなかったが、これは B 群各症例の蛋白排泄量が異なることから当然のことと考えられる。

3) B 群の抗核因子尿中排泄量

われわれの検索方法では抗核因子の尿中排泄絶対量を知ることはできないが、A 群に比べて B 群でどのくらい多くの量が排泄されているかはつぎの計算式から求めることができる。

すなわち、ここまでに A 群の抗核因子尿中排泄量を尿の S T 2^n の指数 n で表現することになると、成人の 1 日の生理的尿蛋白排泄量は 0.03 ないし 0.15 g といわれているが⁷⁻¹⁰⁾、これを一律に 0.1 g とみなした場合、B 群の抗核因子排泄量は

$$\frac{\text{1 日の尿蛋白排泄量 (g)}}{0.1 \text{ (g)}} \times n$$

(n は尿 S T 2^n の指数 n)

で表現することができる

この式に従って B 群 7 症例の尿中抗核因子排泄

表5. B群の血清staining titerと抗核因子尿中排泄量

表6. B群の尿中 γ -globulin排泄量と抗核因子尿中排泄量

量を算出してみると、それぞれ 234, 216, 108, 30, 105, 72, 136という値がえられた。これに対してA群6症例の尿中抗核因子排泄量はそれぞれ、7, 6, 6, 5, 5, 4であるから、B群がA群に比してきわめて大量の抗核因子を尿中に排泄していることが明らかである。

つぎにB群について、この尿中抗核因子排泄量と血清STとの相関をみると、表5に示すように血清STの高い例ほど尿中への抗核因子排泄量が多い傾向にあることを知った。また、B群の尿中抗核因子排泄量は、表6に示すように尿中 γ -globulin排泄量（濃縮尿について濾紙電気泳動法で測定）の多い例ほどいちじるしいという傾向も明らかになった。

一方、B群lupus nephritis 7症例の臨床所見、

表7 B群のステロイド治療前後の血清staining titerと抗核因子尿中排泄量

とくに腎機能および腎生検像(表1)と抗核因子の尿中排泄量との相関を検討したが、両者の間に必ずしも密接な関係は見出されなかった。

4) B群における血清および尿中STのステロイド投与による経時的変動

B群、すなわちlupus nephritisの6症例にステロイドを2ないし3カ月間投与(prednisoloneとして20~30mg/日)した前後の血清と尿のSTの変動をみたのが表7である。1例を除いて全例血清中のSTが下降しているが、これに伴って尿中への抗核因子排泄量も減少している。

なおこの期間中、全身症状もしくは他の諸検査成績は好転した症例が多いが、注目すべきことに尿蛋白排泄量はほとんど不変にとどまっている。このことは尿蛋白排泄のいちじるしいlupus nephritisの症例でもA群の場合と同様に尿中抗核因子排泄量は血清中抗核因子STの高低によりいちじるしい影響を受けることを示唆している。

考案と総括

蛍光抗体法によるSLE症例の血清中抗核因子のSTは通常全身症状のいちじるしい時期には 2^{10} 倍、 2^{11} 倍などの高値を示し、系統的なステロイド治療によつて漸次低下してゆく例が多い¹⁾²⁾。ところがlupus nephritisを伴ったSLE症例では、全身症状がいちじるしい時期においても血清のSTは比較的低い値を示す例が多い。われわれが今までに観察できたlupus nephritisを伴う

SLE症例の血清STの最高値は 2^9 倍である。そこで抗核因子が陽性のSLE43例を蛋白尿の有無に従ってA、B2群にわけてそのSTを比較してみると、蛋白尿を伴うB群は蛋白尿を欠くA群に比してその血清STの平均値が一段階低いという事実がえられた。このことはlupus nephritisの症例では血清中の抗核因子が蛋白尿として大量に失なわれると仮定すれば、きわめて説明しやすいところが従来、lupus nephritisと尿中の抗核因子にかんしては、lupus nephritisの1症例でその尿蛋白がLE細胞現象を呈しうることを見出したHauserの報告¹¹⁾、同じくlupus nephritisの1症例でその尿蛋白はLE細胞現象を呈すると同時に蛍光抗体法で核に対する特異蛍光を発することを見出したStevensらの報告³⁾に接するにすぎない。緒言でも述べたようにHanson & Tan⁵⁾はSLEの尿中抗核因子を免疫化学的に分析しているが、これは尿中抗体蛋白の特異性を解明する手段のひとつとして抗核因子を利用したのであり、臨床的な立場からの追究ではない。

そこで今回われわれは血清中抗核因子が陽性のSLEを上述のごとく蛋白尿の有無によってA、B2群にわけて、そのおのおのの尿中抗核因子排泄の態度をとくに定量的に検討することを試みたのである。

まず蛋白尿を伴わないA群については、当然のことながら尿を濃縮して蛋白を集める必要がある。尿の濃縮には種々の方法が用いられているが⁵⁾⁷⁾¹²⁾¹³⁾、われわれは遠沈、透析後に凍結乾燥するという方法をとった。この方法でえられた1日尿からの凍結乾燥物質の量は表3に示すごとくで、従来からいわれている1日の生理的尿蛋白排泄量(0.03~0.15g/日)^{7)~10)}にはば一致している。つぎに抗核因子の尿中排泄量を各症例間で問題にすると、各例からえられた尿の凍結乾燥物質を一定の蛋白濃度の溶液にして蛍光抗体間接法を行なうことがぜひとも必要となる。この目的に対して種々の濃度基準を設けうるが、われわれは尿の蛋白濃度を血清のそれとほぼ等しいものに

て検索することが両者の対比上便利であると考えて、すべての尿について蛋白濃度を7.0g/dlに統一した。もちろんA群のみでなくB群も同じ基準のもとに蛍光抗体間接法を行なった。

このような方法でA群の抗核因子の尿中排泄を検討したところ、血清STが 2^7 倍までは陰性であるが、 2^8 倍以上の症例ではすべて尿中抗核因子が陽性で、しかも尿中抗核因子のSTは血清STの高い例ほどlinearに上昇するという興味ある事実がえられた。このことは、血清STが 2^8 倍以上であると、尿細管で再吸収される極限をこえて尿中に抗核因子が出現することを意味している。換言すると、蛋白尿を証明できず腎機能障害もないSLE症例での尿中へ抗核因子が排泄される閾値はわれわれの検索方法によると、血清STが 2^8 倍であるということになる。

一方、蛋白尿を伴うlupus nephritisの症例では事情が一変して血清STが 2^8 倍以下でも尿中に抗核因子が排泄される。これは、尿中に出現する γ -globulinが血清 γ -globulinと全く同じ構造か否かは別問題⁹⁾として、血清 γ -globulin、したがってその分画に含まれることがすでに明らかで¹⁴⁾ある抗核因子が大量に尿中にでるために生ずる現象と考えられる。そこでこのB群ではどのくらいの量の抗核因子が尿中に失なわれるかを、A群の排泄量と比較してみたところ、B群でははるかに大量の抗核因子の排泄されることが明らかとなったのである。この事実はlupus nephritisの症例で血清中抗核因子のSTが低いことを強く支持する成績と思われる。

経過を追って観察できたlupus nephritisの6症例では、ステロイド治療によつて全身症状が改善しても、尿蛋白排泄量はほとんど減少していない。しかしながら血清中STが低下するとともに尿中への抗核因子排泄量が減少している。この点はA群で経過を追って観察した2症例での成績と同じ態度であり、いずれの群においてもステロイドの投与によつて血清中抗核因子の力価が減少すると尿中への排泄も減少することを示唆して

いる。したがって抗核因子の尿中排泄量を決定する最も大きな因子は、蛋白尿の有無にかかわらず、血清中抗核因子の濃度ということができよう。

ところで近年lupus nephritisの成因を抗核因子¹⁵⁾¹⁶⁾、ないし核酸代謝¹⁷⁾の面から明らかにしようとの試みがますます活発になりつつある。

今回われわれがlupus nephritisの症例で明らかになしえた大量の抗核因子が尿中に排泄されるという事実は、現在の時点ではこれが直接腎障害の成因と結びつかなくとも、今後これら症例の経過を追うこと、あるいはこれら症例の尿蛋白の物理化学的ないし免疫化学的解析を行なうことなどの努力を通してlupus nephritisの成因、または進展のメカニズムを追究する上に役立つものと考えられる。

結 論

蛍光抗体間接法を用いてSLE症例の尿中抗核因子排泄量を定量的に検討することを試みた結果、1) lupus nephritisを伴うSLEではきわめて大量の抗核因子が尿中に排泄されること、2) 蛋白尿を伴わないSLEでは血清中抗核因子の力価が一定の値以上を示す場合にのみ、尿中に抗核因子が排泄されること、3) 蛋白尿の有無にかかわらず、抗核因子の尿中排泄量を決定する

最大の因子は血清中抗核因子の力価であることを見出した。

これらの成績は今後lupus nephritisの成因ないし進展のメカニズムを追究してゆく上に重要な糸口となるものと考えられる。

文 献

- 1) 長沢俊彦, 柴田整一: 日内会誌, 55: 326, 1966.
- 2) 柴田整一 長沢俊彦, 詫摩武英, 成清卓二, 宮川侑三: 最新医学, 21: 691, 1966. — 3) Stevens, M.B. & Knowles, B.: New Engl. J. Med., 267: 1159, 1962. — 4) Miyasato, F., Pollak, V.E., & Barcelo, R.: Amer. J. clin. Path., 45: 541, 1966. — 5) Hanson, L.A., & Tan, E.M.: J. clin. Invest., 44: 703, 1965. — 6) 長沢俊彦: 臨床検査, 11: 113, 1967. — 7) Grant, G.H.: J. clin. Path., 10: 360, 1957. — 8) Rigas, D.A., & Heller, C.G.: J. clin. Invest., 30: 853, 1951. — 9) Franklin, E.C.: J. clin. Invest., 38: 2159, 1959. — 10) McKay, E., & Slater, R.J.: J. clin. Invest., 41: 1638, 1962. — 11) Hauser: Arch. Derm. Syph. (Berl.), 200: 564, 1955. — 12) Merler, E., Remington, J.S., Finland, M. & Gittlin, D.: J. clin. Invest., 42: 1340, 1963. — 13) Barcelo, R., & Pollak, V.E.: Canad. Med. Ass., 94: 269, 1966. — 14) Haserick, J.R., Lewis, L.A., and Bortz, D.W.: Amer. J. med. Sci., 219: 660, 1950. — 15) Krishman, C., & Kaplan, M.H.: Fed. Proc., 25: 309, 1966. — 16) Graf, M., & Koffler, D.: Fed. Proc., 25: 659, 1966. — 17) Tan, E.M., Schur, P.H., Carr, R.I., & Kunkel, H.G.: J. clin. Invest., 45: 1732, 1966.