Millipore Filter Radioimmunoassay による抗 DNA 抗体の検索について

Studies on Measurement of Anti-DNA Antibodies in SLE
Sera using Millipore Filter Radioimmunoassay.

小 林 二 郎*

JIRO KOBAYASHI, M.D.

これまで、SLE、その他の膠原病の同一検体を用いて、millipore filter radioimmunoassay 法による抗 native DNA 抗体と抗 denatured DNA 抗体の比較検討した報告はいまだない。著者は、仔牛胸腺からえられた未変性 DNA (n-DNA) および変性 DNA (d-DNA) に in vitro で ^{125}I を標識し、SLE、その他の膠原病患者血清中の抗 n-DNA 抗体と抗 d-DNA 抗体を millipore filter 法により検索し、以下の結論をえた。

millipore filter は n-DNA のみならず d-DNA を 74.4% 透過することを認めた。Complex formation 時の incubation time は15分以上必要とし、血清の非働化を必要とした。また、assay 時の塩濃度は0.15M (Tris buffer) が最適であった。

抗 n-DNA 抗体価の高い血清は n-DNA と d-DNA により抑制され、抗 d-DNA 抗体価の高い血清は、d-DNA によってのみ抑制されることを認めた。抗 n-DNA 抗体と抗 d-DNA 抗体は、いずれも正常人にくらべ SLE で有意の高値を示したが、抗 d-DNA 抗体は SLE のみならず、他膠原病でも陽性を認め、正常人でも少数例陽性を認めた。抗 n-DNA 抗体価は SLE の臨床的活動性とよく一致した。millipore filter 法による抗 DNA 抗体の検索は、簡易で、多数の検体を短時間で検索することができ、再現性、特異性にすぐれ有用である。

1948年 Hargraves¹⁾によるLE細胞の発見以来、今日までSLE患者血清中に核蛋白成分と反応する物質のあることが指摘され、近年、その主体をなすものはDNA、特にnative DNAに対する抗体の存在であり、native DNA・抗native DNA抗体 immune complex はSLEの重篤な臓器病変に関与するとされている。事実、native DNA (n-DNA) 抗体価の動向は、血清補体価とともにSLEの活動性病変の指標として欠かすことのできない所見であり、同時に認められうるdenatured DNA (d-DNA) 抗体は、種々核酸に対する抗体産生をinduceする偏在性抗原d-DNAの抗体と考えられ

る²⁾。

一方、これまで抗DNA抗体の検出方法が種々報告され、それらは沈降反応³⁾、補体結合反応⁴⁾、タンニン酸処理赤血球凝集反応⁵⁾、bentonite flocculation test⁶⁾、DNAスポットテスト⁷⁾、ammonium sulfate 法⁸⁾、solid phase immunoassay⁹⁾ cellulose ester filter radioimmunoassay¹⁰⁾ などがあげられる。前4者は二次反応をみて検出されるが、後者は一次反応をみており、特に後3者は抗原としてアイソトープを標識したDNAを用いるradioimmunoassay法であり、鋭敏度がすぐれていると考えられる。Ginsbergらは¹⁰⁾、millipore filter 法によりSLE患者血清中の抗n-DNA抗体を検索したが、これまで本法を用いて同一患者血清中の抗n-DNA抗体と抗d-DNA抗体を検索し、比較検討した報告はない。

* 順天堂大学医学部 (内科学・膠原病)
Department of Internal Medicine, Juntendo
University School of Medicine.
(May, 16, 1979 受付)

図 1 Iodination of DNA

著者は, millipore filter radioimmunoassay による抗 n-DNA と抗 d-DNA 抗体の定量法について検討し臨床的比較検討をおこなったので報告する。

I. 方 法

1. DNA の ^{125}I 標識

Commerford¹¹⁾, Rosenberg¹²⁾らの方法により仔牛胸腺 DNA (Sigma 社) に ^{125}I を標識した。方法は図 1 に示した。d-DNA については, $100^\circ C$ の沸騰水にて 10 分間熱変性させた DNA 1.2 mg/ml を含む SSC 溶液 (0.15 M sodium chloride, 0.015 M sodium citrate) 50 ml を, n-DNA については熱変性させない上記溶液をあらかじめつくっておき, ^{125}I 40 $\mu Ci/ml$ を含む $1.25 \times 10^{-4} M$, $K^{125}I$ 50 ml に 0.5 M sodium acetate 50 ml を加え, 先の DNA 溶液を加えた。最後に $7.5 \times 10^{-4} M$ thallium trichloride ($TiCl_3$) を含む 0.1 M sodium acetate pH 5.0, 50 ml に反応させ, 反応混液を 60 分間, $60^\circ C$ にて incubate した。 ^{125}I -DNA と free の ^{125}I の分離は sephadex G-50 を用いおこなった。えられた specific activity は ^{125}I -n-DNA: 0.3 $\mu Ci/mg$, ^{125}I -d-DNA: 0.94 $\mu Ci/mg$ であった。

2. Radioimmunoassay 法

図 2 のごとく Keiser ら¹⁰⁾⁽¹³⁾ の方法に従いおこなった。被検血清はあらかじめ $56^\circ C$, 30 分で非働化した。血清 50 μl , ^{125}I -DNA を含む 0.15 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 200 μl , 蒸留水 150 μl を反

図 2 Assay Method

応させ $37^\circ C$, 15 分間 incubate した。反応液の 10 倍量に相当する SSC 溶液 4 ml を加え complex formation を中止させた。ついで溶液を millipore filter (Type-HA 2400, 孔径 0.45 μm) を通過させ, SSC 溶液と蒸留水で 2 回洗浄後, filter membrane を Well-Gamma Scintillation Counter で測定した。被検血清の代りに毎回ブランクをおき, 上記と同様に測定し, 下記の計算式で DNA binding activity (DNA BA) を求めた。小数点以下の数値のためすべて 10^4 倍した。

$$DNA\ BA = \frac{\text{被検血清の cpm-blank}}{\text{使用した } ^{125}I\text{-DNA の cpm-blank}} \times 10^4$$

3. 被検血清

ARA の診断基準を満足する SLE 33 例, その他の膠原病 22 例, 正常人 32 例の血清を用いた。

4. 検討方法

1) 基礎的検討: n- および d-DNA の filter membrane 透過率, incubation time による DNA BA の相異, 非働化の有無による検討, 塩濃度の影響, 再現性, 抑制試験などについて検討した。

2) 臨床的検討: n- および d-DNA 抗体について, SLE, その他の膠原病, 正常人について定量し, SLE については臨床症状, 免疫学的検査所見との比較検討をおこなった。

3) 有意差検定

t 検定を用いた。

	before filtration (cpm)	after filtration (cpm)	filtration rate
^{125}I -n-DNA (200 μl)	40896	39712	97.1 %
^{125}I -d-DNA (200 μl)	53312	39648	74.4 %

表 1 Millipore Filter Filtration of n-DNA and d-DNA

図 3 Kinetics of n-DNA complex formation

Counts/min bound to filter		
Sera	Unheated	56°C for 30 min
SLE	2608	1277
Normal	252	35

表 2 Comparison with Binding of Radioactive DNA before and after Heating Serum

II. 結 果

1. 基礎的検討

1) n- および d-DNA の filter membrane 透過率: 結果は表 1 に示した. 標識された ^{125}I -n-DNA と ^{125}I -d-DNA をそれぞれ 200 μl ずつ millipore filter membrane に通し, どの程度透

図 4 Affection by the Salt Density

		I	II
SLE	^{125}I -n-DNA B. A.	156	148
	^{125}I -d-DNA B. A.	832	854
Control	^{125}I -n-DNA B. A.	15	17
	^{125}I -d-DNA B. A.	112	111

表 3 Reappearance test

過され回収されるかを検討したものである.

n-DNA は 97.1% 透過され, 単独では殆ど透過されるものと思われた. 他方, d-DNA の回収率は 74.4% であり, n-DNA にくらべ透過率が悪く, 一部は filter membrane に付着すると思われた.

2) Incubation time による assay への影響: ^{125}I -DNA と被検血清を反応させ, complex formation をおこなうときの incubation time による測定値の変動をみると図 3 のごとく 15 分以上で安定化することを認めた.

3) 血清非働化の有無による assay への影響: assay をおこなう場合にあらかじめ被検血清を非働化した場合としない場合で測定値に相異があるかどうかを検討した. 結果は表 2 に示したが, 非働化した時の値は, しない場合にくらべ低値を示し, これは正常人血清についても認められた.

図5 Effect of Non-Radioactive DNA on ^{125}I -n-DNA Binding Activity in SLE Sera

図6 Effect of Non-Radioactive DNA on ^{125}I -d-DNA Binding Activity in SLE Sera

4) 塩濃度の変化による assay への影響：
Tris buffer の塩濃度をかえて assay をおこなうと図4のごとく、0.15M の Tris buffer を用いたときに最も高い値を示した。これは SLE の患者血清を用いたときに著明で、正常人血清でも同様の傾向がみられた。

5) 再現性：SLE と正常人血清について duplicate による再現性を検討した結果、表3のごとく SLE、正常人血清ともに再現性のあることを認めた。

6) 抑制試験：抗 n-DNA と抗 d-DNA 抗体価の高い SLE 患者血清と、正常人血清を用いてそれぞれあらかじめ各種濃度の nonradioactive n-DNA と d-DNA を加えて assay をおこなうと、結果は図5、6のごとく、抗 n-DNA 抗体の高い血清では n-DNA と d-DNA の両者により著明に抑制され、抑制度は加えられた DNA の濃度に平行した。また、抑制は n-DNA よりも d-DNA により強いことを認めた。一方、抗 d-DNA

図7 Incidence of ^{125}I -n-DNA Binding Activity in Patients with SLE, other collagen diseases and controls

図 8 Incidence of ^{125}I -d-DNA Binding Activity in Patients with SLE, other Collagen Diseases and Controls

抗体価の高い血清では n-DNA の添加によって抑制されず、d-DNA により著明に抑制され、それは加えられた d-DNA の濃度に平行した。

2. 臨床的検討

1) 各種膠原病疾患における抗 n-DNA 抗体価と抗 d-DNA 抗体価：結果は図 7, 8 に示した。抗 n-DNA 抗体価は正常人の平均値は 20.3 ± 2.5 をとり 20.3 ± 26.4 を正常値とした。SLE では高値を示す症例が多く、平均値は 127.8 であった。SLE と PSS の重複例でも 2 例高値を示したがその他の膠原病ではすべて正常範囲であった。一方、抗 d-DNA 抗体価の正常値は 142.6 ± 151.2 (2 S) であるが、SLE では正常人にくらべ有意に高い値を示した。また、SLE 以外の疾患、PSS, RA, シェグレン症候群、正常人でも陽性を示す症例がみられた。

2) SLE の臨床症状、検査所見と抗 n-DNA 抗

体価および抗 d-DNA 抗体価との相関性：発熱・関節痛・紅斑の有無と両者の抗体価との相関についてみると（図 9, 10），発熱・関節痛・紅斑を認める症例では抗 n-DNA 抗体価がそれらを認めない症例にくらべ高く、関節痛・紅斑を認める症例では有意に高いことを認めた。抗 d-DNA 抗体では発熱・関節痛の有無では有意差を認めず、紅斑の認める症例では認めない症例にくらべ有意に高いことを認めた。

同様に LE 細胞・白血球減少・高 γ -グロブリン血症の有無で検討すると（図 11, 12），LE 細胞陽性の症例は陰性の症例にくらべ有意に抗 n-DNA 抗体価が高く、反面、抗 d-DNA 抗体価については有意差は認められなかった。白血球減少を認める症例では認めない症例にくらべ抗 n-DNA 抗体のみならず抗 d-DNA 抗体価も有意に高いことを認めた。一方、高 γ -グロブリン血症では抗 n-DNA 抗体価では有意差は認められなかったが、抗 d-DNA 抗体価

図 9 Relationship Between ^{125}I -n-DNA Binding Activity and Clinical Findings in SLE

図 10 Relationship Between ^{125}I -d-DNA Binding Activity and Clinical Findings in SLE

図 11 Relationship Between ^{125}I -n-DNA Binding Activity and Clinical Findings in SLE

図 12 Relationship Between ^{125}I -d-DNA Binding Activity and Clinical Findings in SLE

図 13 Relationship Between ^{125}I -n-DNA Binding Activity and Clinical Findings in SLE

図 14 Relationship Between ^{125}I -d-DNA Binding Activity and Clinical Findings in SLE

で有意差を認めた。

蛋白尿の程度と抗体価について検討すると (図 13, 14), 抗 n-DNA 抗体価は 1 日 3.5g 以上の蛋白尿を認める症例は, 蛋白尿を認めない症例にくらべて有意に高い値を示したが, 抗 d-DNA 抗体価では有意差は認められなかった。1 日 3.5g 以下の持続性蛋白尿を認める症例は, 蛋白尿を認めない症例と比較して両者いずれの抗体価も有意差を認めなかった。血清低補体価の有無により抗体価を検討すると, いずれの抗体価も血清補体価が低い症例に高い値を示したが, 有意差は抗 d-DNA 抗体価でみられ, 抗 n-DNA 抗体価では認められなかった。

3) 蛍光抗体法による抗核抗体, 抗 DNA 抗体と millipore filter assay による抗 n-DNA および抗 d-DNA 抗体価との相関性: 結果は図 15, 16 に示したが, 抗核抗体の抗体価とスポットテストによる抗 DNA 抗体抗体価はいずれも millipore

図 14 Relationship Between ^{125}I -d-DNA Binding Activity and Clinical Findings in SLE

図 16 Relationship Between ^{125}I -d-DNA Binding Activity and ANF, DNA Antibodies (Spot test) in SLE

図 17

filter assay でえられた抗 n-DNA, および抗 d-DNA 抗体価と parallel であったが, 有意差検定では抗 d-よりも抗 n-DNA 抗体価とより強い相関性を示した.

4) 臨床例における抗 n-および d-DNA 抗体価の推移: 経過概要は図 17 に示した. 症例は, 28 歳の女性で 1974 年 2 月関節痛で発病, その後蝶形紅斑が出現し, 同時に多量蛋白尿・白血球減少・LE 細胞陽性・血清低補体価を認め, SLE と診断された. 当初, 外来通院にてプレドニゾン 30mg より治療開始されたが, 1975 年 7 月の抗 n-DNA 抗体価は 848, 抗 d-DNA 抗体価は 1,070 であった. 翌年 3 月高熱・浮腫・心外膜炎・胸膜炎などを認め入院, 抗 n-DNA 抗体 1.177, 抗 d-DNA 抗体 5.277 と高値を示し, プレドニゾン 60mg より治療を開始, 臨床症状・検査所見の改善を認めステロイドを漸減した. 1976 年 6 月, 血清補体は持続

Methods	R.I. and Nucleic Acid	Reporters
Ammonium Sulphate Precipitation	^3H -DNA (Calf-thymus, B. Subtilis)	R.T. Wold, et al., 1968
	^{14}C -DNA (KB cell)	T. Pincus, et al., 1969
	^3H -Actinomycin D-DNA (Calf-thymus)	R.I. Carr, et al., 1969
	^{14}C -DNA	G.R.V. Hughes, et al., 1971
	^3H -DNA (E. coli)	N. Talal, et al., 1971
Double-antibody Technique	^{125}I -DNA (Calf-thymus)	P. Hasselbacker, 1974
	^{125}I -DNA (Calf-thymus)	K. Kusudo, et al., 1974
Solid Phase Immunoassay	^3H -Actinomycin D-DNA (Calf-thymus)	B.J. Rosenberg, 1972
	^3H -DNA (E. coli)	Y. Morai, et al., 1974
Nitrocellulose Membrane Tech.	^3H -DNA (E. coli)	M. Tan, et al., 1973
Millipore Filter Radioimmunoassay	^{125}I -DNA (Calf thymus, E. coli, HeLa)	T. Nishimura, et al., 1974
	^3H -Actinomycin D-DNA (Calf-thymus)	H. Keiser, et al., 1973
	^{14}C -DNA (E. coli)	T. Nishimura, et al., 1974

表 4

して低値を示しているが, 他の検査所見はほぼ正常化し, この時の抗 n-DNA 抗体は 245, 抗 d-DNA 抗体は 2.642 と未だ異常値であるが, 急性期に比較し著明に低下した.

III. 考 按

近年, RI 標識 DNA を用いた radioimmunoassay による抗 DNA 抗体の検索法が種々報告されてきた(表4). それらは ammonium sulfate precipitation, double antibody technique, solid phase immunoassay, nitrocellulose membrane technique, millipore filter radioimmunoassay などであるが, 使用する核種や DNA がことなる. 著者は DNA として仔牛胸腺由来のものを使用し, RI は ^{125}I を用い *in vitro* で標識した. Commerford¹¹⁾によれば, TiCl_3 の存在のもとに ^{125}I は DNA に標識される. 今回, 熱変性 DNA と n-DNA に標識したが, d-DNA 濃度が $6.5 \times 10^{-4}\text{M}$ のときの ^{125}I の結合率は16.7%であり, n-DNA 濃度が $6.9 \times 10^{-4}\text{M}$ のときの結合率は0.74%とされ, 変性 DNA の方が結合し易い. n-DNA の ^{125}I 結合率は低いが, 抗 n-DNA 抗体を検索するには抗原量として十分とされている^{10), 13)}. ^{125}I は 5-iodocytosine として DNA に安定した状態で結合する. 標識された DNA と free の ^{125}I は Sephadex G50 のカラムで分離した. 不安定な部分はすでに pH と加熱時間により解離された. n-DNA は 80°C 以上の加熱ではじめて熱変性するとされ, 標識時の 60°C , 60分の incubation は n-DNA の場合熱変性する可能性はもたらさない.

Filter membrane に使用した cellulose nitrate filter は DNA の構造上の相異により一般に n-DNA は通過させるが, 中等度の塩濃度では d-DNA を通過させないとされている¹⁴⁾. 著者はこのことを確認すべく標識された n-DNA と d-DNA を filter にかける, どの程度 filter membrane に付着するかどうかを検討したが, n-DNA は 97.1%通過するのに対し, d-DNA は 74.4%であった. d-DNA の通過率は予測したよりも高い値であり, 正常範囲に大きな影響を与え, 特異性に問題があると考えられたが, 同一方法で抗 d-DNA 抗体を測定した.

Complex formation をおこなうときの incubation time は 15分以上必要と考えられた. また,

血清の非働化は Clq , α_2 -マクログロブリンなど血清中の, DNA と非特異的に結合する活性を失活させる. Assay 時の塩濃度の検討では 0.15M Tris buffer で最も高い抗体価を示し, 0.15M が最適塩濃度と考えられた.

Assay 時の pH は 7.5 でおこなったが, 横張ら¹⁵⁾によれば SLE 血清では pH の影響を受けず, 正常人血清では pH 7.6 以上で 10% 以下の結合活性を認め, pH 条件として 7.6~8.0 を最適としている.

Radioimmunoassay の再現性は一般に低いとされているが, duplicate による検討をおこなったが大きい変動は認められなかった.

抗 n-DNA 抗体価の高い血清と抗 d-DNA 抗体価の高い血清を用い, n-DNA, d-DNA による抑制試験をおこない, 抗 n-DNA 抗体価の高い血清では n-DNA と d-DNA によって抑制され, DNA の濃度をかえると高い濃度では n-DNA によるものよりも d-DNA で抑制制度が強いことを認めた. また抗 d-DNA 抗体価の高い血清では n-DNA では抑制されがたく, d-DNA で著明に抑制された. Seligman ら^{16), 17), 18)}は SLE の患者血清を抗 d-DNA 抗体のみを有するもの, 抗 n-DNA 抗体を有するもの, 両者の抗体を有するものの3群に分け, ある種の血清は2つ以上の群に属す抗体を同時に有する可能性を指摘した.

また, 抗 d-DNA 抗体は d-DNA によって抑制されるが, n-DNA では抑制されず, これは n-DNA の抗原決定基が native な macromolecule でかくされているためと考えられる¹⁷⁾. 抗 n-DNA 抗体は d-DNA と n-DNA の双方で抑制され, 時に n-DNA でより強く抑制される場合がある. この場合, 抗原決定基は rigid double helical structure を必要とする¹⁷⁾. 双方の DNA に対する抗体は d-RNA, n-RNA いずれとも抑制反応を起こさず, 双方の型に共通した抗原決定基を有する DNA と反応し, この場合反応する側鎖が deoxyribose と large oligonucleotide を必要とする¹⁹⁾.

RI 標識 DNA と結合し, filter membrane に留置する物質の多くは DNA に対する抗体と考

えられるが、個々の SLE 患者血清中の DNA 抗体の質的な相異により、また抑制試験に用いる DNA の質的な相異により、DNA 抑制試験の反応性が異なると思われる。Keiser¹⁰⁾らは n-DNA と結合する SLE 患者血清中の蛋白として IgG を認め、特異抗体であるとしている。抗 DNA 抗体の免疫グロブリンとして IgG, IgM が認められるが、多くは IgG (特に subclass 1, 3) が主で、その活性は Fc portion より Fab [F(a b')₂] に存在するとされる¹⁹⁾。IgM 型抗体は SLE 以外の疾患でも認められること多く、勿論 SLE でも認められるが、急性期には IgG 型抗体の増量を認める¹⁵⁾。八倉²⁰⁾らは RAST 法により抗 DNA 抗体を免疫グロブリンクラス別に測定することをこころみ、IgG, IGM のみならず、IgA, IgE 抗体も認めている。SLE では抗 n-DNA 抗体が特異的であり、IgG が主と考えられるが、このことは補体結合性と関連性を持ち、補体結合性は抗 d-DNA 抗体よりも抗 n-DNA 抗体が高く、IgM よりも IgG の補体結合量が多い¹⁶⁾。また、DNA の μg あたりの補体結合量も異なり、これは DNA の分子量に関係するのではなく、DNA の抗原決定基の有効性を反映していると考えられる²¹⁾。

Millipore filter assay で DNA と結合し、filter membrane に留置する物質は大部分は抗 DNA 抗体と考えられるが、n-DNA と結合し、filter に留置する物質として enzyme RNA polymerase, *E. Coli* の lac. repressor protein, ある種のマウスの骨髄腫にみられる免疫グロブリンなどが報告されている^{22)~24)}。

抗 DNA 抗体価と SLE の活動性病変との間の相関については数多くの報告があり、特にループス腎炎では血清低補体価を伴う抗 n-DNA 抗体価の高値はその活動性と一致する。著者は個々の臨床症状・検査所見と抗 n-, d-DNA 抗体価との相関について検討したが、抗 n-DNA 抗体価と有意の相関性を示したものは関節痛・紅斑・LE 細胞・白血球減少、多量蛋白尿であり、蛍光抗体法による抗核抗体、抗 DNA 抗体ともよく相関した。一方、抗 d-DNA 抗体価との検討では白血球減少、

高 γ -グロブリン血症、血清低補体価を認めるものは有意に高い値を示し、抗核抗体・スポット法による抗 DNA 抗体とも相関性を示したが、有意差を認める項目数や相関係数は抗 d-DNA 抗体よりも抗 n-DNA 抗体で多く、SLE の活動性病変は抗 n-DNA 抗体価がより強く反映していると思われる。また、抗 n-DNA 抗体価は SLE 以外の疾患では異常値を認めず、抗 d-DNA 抗体価は SLE 以外の疾患、ときに正常人血清においても認められた。正常人あるいは他の膠原病疾患で認められる抗 d-DNA 抗体は主に IgM とされ¹⁵⁾、今回の検討結果がこのことを意味しているのか、filtration rate の低いことに起因しているのか明らかでなく、今後検討されなければならない。

抗 n-DNA 抗体の assay に際しては、抗原とする n-DNA の特異性が問題となる。使用する n-DNA の source は特異抗体に対して antigenicity が同一であるかどうかの問題を提示し、n-DNA の精製に際し MAK, HAP (hydroxyapatite chromatography), millipore filter などにより d-DNA の混入を防止しようとされているが、その感受性は MAK が最も高い²⁵⁾。d-DNA が混在した場合、その 0.1% は補体結合性を有するといわれる²⁶⁾。著者は仔牛胸腺由来の n-DNA を MAK カラムにかけ、わずかであるが約 5% の d-DNA の混在を認めている。また、¹²⁵I 標識の際に n-DNA が変性する可能性は少ないと考えられるが、標識後 specific activity が高い場合には放射性物質による DNA の damage の危険性を伴う。この観点から Leon ら²⁶⁾は ¹²⁵I-UdR-DNA を使用し、正常人血清中の免疫グロブリンとの結合率も低いとしている。

近年、抗 n-DNA 抗体価の定量のみならずその avidity が SLE の活動性病変との関連性において問題とされている。今後、抗 n-DNA 抗体の特異性・補体結合性・avidity・immune complex の定量と SLE の活動性病変、特に病態形成への関与の検討が平行しておこなわれなければならない。

IV. 結 論

Millipore filter radioimmunoassay による抗 DNA 抗体の検索を検討した結果、以下の結論をえた。

1. Millipore filter は n-DNA のみならず d-DNA も 74.4% 透過することを認めた。

2. Complex formation の際の incubation time は 15 分以上必要とし、血清非働化を必要とする。

3. Assay 時の塩濃度は 0.15M (Tris buffer) が最適と思われた。

4. Duplicate assay により再現性を認めた。

5. 抗 n-DNA 抗体価の高い血清は n-DNA と d-DNA により抑制され、抗 d-DNA 抗体価の高い血清は n-DNA では抑制されず、d-DNA によって抑制されるところを認めた。

6. 抗 n-DNA 抗体価と抗 d-DNA 抗体価はいずれも正常人にくらべ SLE に有意に高い値を示したが、抗 n-DNA 抗体は SLE に特異的であり、他方抗 d-DNA 抗体は SLE 以外の疾患 (PSS・RA・シェグレン症候群・正常人) でも陽性を示す症例がみられた。

7. 抗 n-DNA 抗体価は関節痛・紅斑・LE 細胞・白血球減少・多量蛋白尿を認める症例に有意の相関を示し、抗 d-DNA 抗体価は白血球減少・高 γ -グロブリン血症・ CH_{50} 低下を認める症例に有意に高いことを認めた。

8. 蛍光抗体法による抗核抗体・抗 DNA 抗体との比較検討で、抗 n・抗 d-DNA 抗体いずれも、それらの抗体価と有意の相関を示したが、抗 d よりも抗 n-DNA 抗体の方がより高い相関性を示した。

9. Millipore filter assay における今後の検討すべき問題点を提示、考察した。

ご指導いただきました順天堂大学内科 (膠原病) 塩川 優一教授、橋本博史助教授に深謝いたします。

本研究にあたり、厚生省自己免疫調査研究班の研究費を使用した。

文 献

- 1) Hargraves, M.M., Richmond, H. and Morton, R.: Presentation of Two Bone Marrow Elements: the Tart cell and LE cell. *Proc. Staff Mayo Clin.* **23**, 25~28, 1948.
- 2) Koffler, D. et al.: Antibodies to polynucleotides in human sera, antigenic specificity and relation to disease: *J. Exp. Med.* **134**, 294, 1971.
- 3) Asherson, G.L.: Antibodies against nuclear and cytoplasmic cell constituents in systemic lupus erythematosus and other diseases: *Brit. J. Exp. Path.* **40**, 209, 1959.
- 4) Cepellini, R., Polli, E. and Celeda, F.: DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffusum: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **96**, 572, 1957.
- 5) Miescher, P. and Straessle, R.: New serological methods for detection of LE factor: *Vox Sang* **2**, 283, 1957.
- 6) Bozicevich, J., Nasou, J. P. and Kayhoe, D.E.: Deoxyribonucleic acid bentonite flocculation test for lupus erythematosus: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **103**, 636, 1960.
- 7) Friou, G.J.: Fluorescent spot test for antinuclear antibodies: *Arthritis Rheum.* **5**, 407, 1962.
- 8) Wold, R.T., Young, F.E., Tan, E.M. and Farr, R.S.: Deoxyribonucleic acid: *Science* **161**, 806, 1968.
- 9) Tan, M. and Epstein, W.V.: A solid-phase immunoassay for antibody to DNA and RNA: *J. Lab. Clin. Med.* **81**, 122, 1973.
- 10) Ginsberg, B. and Keiser, H.: A millipore filter assay for antibodies to native DNA in sera of patients with systemic lupus erythematosus: *Arch. Rheum.* **16**, 199, 1973.
- 11) Commerford, S.L.: Iodination of nucleic acids in vitro: *Biochemistry* **10**, 1993, 1971.
- 12) Rosenberg, B.J. et al.: Radioimmunochemical Studies on nucleosides-Specific antibodies using Iodinated DNA: *J. Immunology* **108**, 271, 1972.
- 13) Keiser, H.: Preparation of ^{125}I -labeled native DNA for use in radioimmunoassay for anti-

- native DNA antibodies. Arch. Rheum: 16, 468, 1973.
- 14) Kredich, N.M., Skyler, J.S. and Foote, L.J.: Antibodies to native DNA in systemic lupus erythematosus: Arch. Int. Med. 131, 639, 1973.
- 15) 横張龍一, 青塚新一, 諸井泰興: ミリポアフィルター法による抗DNA抗体の測定: リウマチ 17, 135, 1977.
- 16) Arana, R. and Seligman, M.: Antibodies to native and denatured deoxyribonucleic acid in SLE: J. Clin. Invest. 46, 1867, 1967.
- 17) Seligman, M. and Arana, R.: The various types of DNA antibodies in SLE sera. In Nucleic acids in Immunology., O.J. Plascia and W. Braun (ed.) Springer-Verlag N.Y., p. 68, 1968.
- 18) Seligman, M., Arana, R. and Cannat, A.: The heterogeneity of DNA antibodies in SLE and their clinical significance: In Rheumatic Disease, J.J.R. Duthie and N.R.M. Alexander (ed.) Williams and Wilkins, Co. Baltimore p. 211, 1968.
- 19) Pincus, T. and Kaplan, A.P.: True antibodies to DNA in SLE; activity of Fab and F(ab')₂ fragments: Nature 227, 394, 1970.
- 20) 八倉隆保, 志水正敏, 山村雄一: 抗DNA抗体のRAST法による検出: リウマチ, 17, 136, 1977.
- 21) Stollan, D., Levine, L. and Marmur, J.: Antibodies to denatured deoxyribonucleic acid in LE serum. II. characterization of antibodies in several sera: Biochem. Biophys. Acta 61, 7, 1962.
- 22) Jones, O.W. et al.: Studies on the binding of RNA polymerase to polynucleotides: J. Mol. Biol. 22, 199, 1966.
- 23) Riggs, A.D. et al.: Lac repressor operator interaction. I. Equilibrium studies: J. Mol. Biol. 48, 67, 1970.
- 24) Schubert, D. et al.: Anti-nucleic acid specificities of mouse myeloma immunoglobulins: Nature 225, 154, 1970.
- 25) Irvin, W.S. and Somaha, R.J.: The inadequacies of techniques for separation of single-strand from double strand DNA. XIV. International Congress of Rheumatology, abstracts, 1977.
- 26) Leon, S.A., Green, A. et al.: Avidity of antibodies in SLE: Arthritis Rheum. 20, 23, 1977.

Summary

Studies on Measurement of Anti-DNA Antibodies in SLE Sera using Millipore Filter Radioimmunoassay.

The measurement of anti-native DNA (n-DNA) and denatured DNA (d-DNA) antibodies in sera from patients with SLE and other rheumatic diseases using millipore filter radioimmunoassay was studied methodologically and clinically.

The ^{125}I -n-DNA and d-DNA produced by the in vitro labelling of calf thymus n-DNA and heat denatured DNA with ^{125}I . Radioactive DNA was separated from other reactants by passage through a Sephadex G-50 column. The specific activities of ^{125}I -n-DNA and d-DNA were $0.3\mu\text{Ci/mg}$ and $0.94\mu\text{Ci/mg}$, respectively. Test sera were heated at 56°C for 30 minutes. Fifty microliters of heated serum were added to labelled DNA in 200μ liter of 0.15 M Tris buffer, $\text{PH } 7.5$, and 150μ liter of distilled water. The assay mixture was incubated at 37°C for 15 minutes after which the reaction was stopped by the addition of 4ml of SSC solution (mixture of 0.15M Sodium Chloride and 0.015 M Sodium Citrate). The diluted assay mixture was passed through a prewetted millipore filter (type-HAWP) under gentle suction. The radioactivity of the filter membrane was measured in a scintillation counter. Sera were obtained from 32 healthy controls, 22 patients with rheumatic diseases other than SLE and 33 patients with SLE.

As the results, the millipore filter assay using preheated sera was capable of detecting specific heat stable DNA binding activity in SLE sera. Complex formation between radioactive DNA and anti-DNA antibodies in SLE serum was biphasic, with a rapid initial phase complete in 10 minutes. Optimum density of salts in Tris buffer was determined to be 0.15 M . When unlabelled n-DNA and d-DNA were added to $50\mu\text{l}$ of serum from the SLE patients with high titer of anti-n-DNA and d-DNA antibodies, unlabelled n-DNA inhibited the binding of radioactive n-DNA, and unlabelled d-DNA inhibited both the binding of radioactive n-DNA and d-DNA. The high levels of anti-n-DNA antibodies were found in sera from patients with SLE and reflected the degree of disease activity. On the other hand, anti-d-DNA antibodies appeared in sera from not only SLE but other rheumatic diseases.

This simply and rapidly performed assay is easily quantitated and can be useful in the diagnosis and management of patients with SLE.

JIRO KOBAYASHI, M.D.

*Department of Internal Medicine,
Juntendo University School of Medicine.*