特 集

自己抗体の Immunoabsorbent matrix による**

特異的除去法の開発

Specific Removal of Circulating Anti-DNA Antibodies in Vitro
by DNA Combined Matrix

今 成 順 子*¹ 原 いづみ*¹ 種 田 明 生*¹
YORIKO IMANARI, M.D. IZUMI HARA, M.D. AKIO TANEDA, M.D.

小 川 秀 興*¹ 広 津 敏 博*²
HIDEOKI OGAWA, M.D. & TOSHIHIRO HIROTSU

現在、各種自己免疫疾患にはステロイド、免疫抑制剤等が使用されているが、副作用も多く問題は多い。近年、血中の自己抗体や免疫複合体の除去等の目的で、血漿交換療法すなわち、plasma exchangeが注目を浴びてきており、多くの疾患でその効果が認められている。しかしながらplasma exchangeでは、多量の血漿を必要とするため、その確保が困難であり、また肝炎発症の可能性もある。そこで我々は、Adsorptive plasma perfusion、つまり患者より採取した血液より、毒素や抗体、免疫複合体など有害な物質のみを除去したのち、血漿を再び患者に返す方法の基礎的実験を計画した。本法の応用は、現在治療の困難な自己免疫疾患、及び免疫複合体病をはじめとする種々の免疫疾患において、非常に有効な治療法となり得る可能性がある。今回我々は実験を始めるにあたり、最も抗原と抗体との関係が明らかにされているSLEを対象として、アフィニティクロマト原理応用のAdsorptive plasma perfusionの基礎実験を行なった。すなわち、現在SLEには種々の自己抗体が確認されているが、中でも抗DNA

抗体¹⁾は病因論的にも最も重要なものとされている。そこで我々は、種々の支持体にDNAを結合させたものを作製し、これに血清中の抗DNA抗体を吸着させることにより、抗DNA抗体を除去することを試みた。まず、いずれのDNA結合支持体が効率よく抗体を吸着するか検索、次にDNA結合支持体の安定性を確認、さらに血清中の他の成分に対する影響を調べた。

材 料

1) 血清：active SLE患者より得られた抗DNA抗体価高値の血清を使用した。

2) 抗原支持体(表1)

a) native-DNA-CM cellulose²⁾、及び denatured-DNA-CM cellulose(表1, 9)：和光純薬より市販されているものを使用した。前者は、matrix 1mgに対し0.7~1.1mgのdouble helixed DNAを、後者は、0.3~0.6mgのsingle stranded DNAを含む。

b) 著者らが作製したDNA結合支持体(表1¹⁾~⁸⁾
〈DNA〉：salmon sperma DNAより抽出したDNAで、市販されている(和光純薬)ものを使用した。

〈支持体〉：3種にわけられる。一般吸着剤としては、活性炭及びシリカゲルビーズを、イオン交換樹脂としてはDowex WGR及びBiolex 9、線維物質としては、セルロース粉末・ろ紙・綿ガ

*¹ 順天堂大学医学部(皮膚科学教室)
Department of Dermatology, Juntendo
University School of Medicine

*² 通産省繊維高分子研
Research Institute for polymers and Textiles,
Tsukuba, Japan

** 第218回順天堂医学会学術集会(Sept., 17, 1981)
(Nov., 30, 1981 受付)

支持体	結合法
1) 活性炭	i) BrCN による共有結合
2) シリカゲルビーズ	ii) イオン結合
3) Dowex WGR	iii) PVA を使用しての固定化
4) Biolex 9	a) 加熱処理
5) ろ紙	b) 紫外線照射
6) ガーゼ	c) グロー放電
7) 脱脂綿	
8) キュプロファン	
9) CM cellulose	

表1 抗原支持体

ーゼ・脱脂綿を用いた。

＜結合法＞ (表1)

i) BrCNによる共有結合

アルカリ溶液 (pH = 11.5) 中で, BrCN により活性化された脱脂綿, 及びキュプロファンを DNA と反応させ, 共有結合にて結合させる。

ii) イオン結合

5g の Dowex, 及び Biolex を脱イオン水で数回洗浄後, 5% の DNA 水溶液 10ml 中に室温で 1 時間浸し, 洗浄・乾燥させる。

iii) ゲル状polivinyl alcohol (PVA) 中への DNA の固定化

0.25g の DNA と 5.0g の PVA (M.W=500) を 25ml の水に溶かし, 水溶液を作る。この水溶液中に脱脂綿・シリカゲル, 及びろ紙を浸し, 水洗・乾燥させた。

PVA-DNA 水溶液は, さらに下記の 3 つの方法にてゲル化され, 支持体に結合させた。

iii) 一a) 加熱処理

DNA と PVA の水溶液に浸した支持体を, 65°C 18 時間加熱すると PVA はゲル化し, 不溶化する。65°C という温度は DNA の変性を防ぎ, しかも PVA をゲル化させる温度である。この方法はシリカゲル・ろ紙・脱脂綿について行なった。

iii) 一b) 紫外線照射

DNA-PVA 水溶液に浸した支持体に, 高圧水銀紫外線を 2 時間照射した。これにより, 脱水素化作用が起こり, PVA 同志が共有的に結合

図1 抗DNA抗体吸着能の測定法

DNA結合支持体 (10mg/0.6ml血清)	抗体価
1) コントロール	320 倍
2) DNA活性炭	320 倍
3) Native DNA CM cellulose	(-)
4) Denatured DNA CM cellulose	160 倍
5) DNA 脱脂綿 BrCN 処理	160 倍
6) DNAキュプロファン BrCN 処理	320 倍
7) DNA-Dowex WGR	(-)
8) DNA-Biolex 9	320 倍
9) DNA-PVA シリカゲルビーズ	640 倍
10) DNA-PVA ガーゼ	160 倍
11) DNA-PVA ろ紙	160 倍
12) DNA-PVA 加熱処理 シリカゲルビーズ	320 倍
13) DNA-PVA 加熱処理ろ紙	80 倍
14) DNA-PVA 加熱処理脱脂綿	(-)
15) DNA-PVA 紫外線照射ろ紙(DNA高濃度)	(-)
16) DNA-PVA 紫外線照射ろ紙(DNA低濃度)	320 倍
17) DNA-PVA 紫外線照射ガーゼ (DNA高濃度)	160 倍
18) DNA-PVA 紫外線照射ガーゼ (DNA低濃度)	320 倍
19) DNA-PVA グロー放電ガーゼ	(-)
20) DNA-PVA グロー放電ろ紙	80 倍

表2 抗DNA抗体吸着能の比較(37°C, 30分反応)

し, DNA を網の中に閉じ込める。この操作はガーゼ・ろ紙について行なった。

iii) 一c) 暈光放電 (グロー放電)

PVA の共有結合は, 13.56 MHz の高周波によるグロー放電によって起こる, 手技については, 安田, 広津によってすでに報告されているのとはほぼ同様である⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。

DNA-PVA 水溶液にて処理された支持体 (大きさ 10cm × 10cm) を, 反応管 (直径 4.4cm, 長さ 40cm) 中にセットし, 内部の圧力が 1.0×10^{-3} mm

DNA結合支持体 (10mg/0.6ml血清)	抗体価
DNA-PVA グロー放電ガーゼ	(-)
DNA-CM cellulose	(-)
DNA-Dowex	80 倍
DNA-PVA 加熱処理ガーゼ	320 倍
DNA-PVA 紫外線照射る紙	320 倍
コントロール	640 倍

表3 抗DNA抗体吸着能の比較
(37°C, 5分間incubate)

DNA結合支持体 (10mg/0.6ml血清)	抗体価	
	5分	30分
DNA-PVA グロー放電ガーゼ	(-)	(-)
DNA-Dowex	(-)	(-)
DNA-CM cellulose	(-)	(-)
ガーゼ	320倍	160倍
Dowex	160倍	160倍
CM cellulose	320倍	320倍
コントロール	320倍	320倍

表4 抗DNA抗体吸着能の比較

Hg になるまで減圧し、高周波をかけると25ワットでグロー放電が起こる。この操作をサンプルの裏表5分間ずつ施行した。この方法は、ガーゼとろ紙に施行した。

方 法

①抗DNA抗体価：間接血球凝集反応により測定した。80倍以上を陽性とした。

②DNA量：Kissane & Robins³⁾による、microfluorometric method により測定した。

③抗DNA抗体吸着能：DNAを結合させた支持体と、SLE患者血清をincubateし、その前後の抗DNA抗体価を比較した(図1)。

④DNA結合支持体の安定性：PBS及び正常人血清にて浸漬し、37°C下に試験管内で反応を数回繰り返し、遊出するDNA量を上記にて測定した。

⑤DNA-PVAグロー放電ガーゼの血清中種々成分に対する影響：血清と反応させた際の血清のpH, albumin, globulin, CH₅₀, C₃, C₄, C₅

図2 DNA結合体支持の安定性

PBS及び正常人血清中で、37°C, 1時間ごと洗浄を繰り返した際遊離するDNA量を、結合した全DNA量に対する割合で表わす。

図3 洗浄後の Sample における抗体吸着能の比較

等に対する影響を調べた。

⑥血清中 Immune complex の測定：反応前後の血清中 Immune complex は、Hay⁴⁾の方法を改良した solid phase C₁q binding assay⁵⁾にて測定した。すなわち、ヒト C₁q⁶⁾を coat させたポリスチレンチューブ中で血清を反応させ、さらに Horse Raddish peroxidase (HRP) を結合させた抗ヒトウサギIgG⁷⁾を加え、洗浄後結合したIgGのHRPをλ=510nmにて蛍光光度計を用い、値を読み、結合した Immune complex 量を測定した。

図4 DNA-PVAグロー放電ガーゼと反応前後の血清中 Immune complex 量

⑦DNA-PVAグロー放電ガーゼを用い、カラムを作製し迅速処理を検討：Volume 1ml, 使用したDNA-PVAグロー放電ガーゼ 500mg, elution speed 0.26ml/min, 2.6ml ずつ試験管にとり、抗DNA抗体価を測定した。

成 績

1) 抗DNA抗体吸着能

市販の native DNA-CM cellulose, denatured DNA-CM cellulose 及び、新たに作製したDNA結合支持体10数種をおのおの10mgとり、0.6mlのSLE血清を加え、試験管内で37°C・30分間 incubate し、抗DNA抗体価の変化を測定した。結果は、control 血清320倍に対し native DNA-CM cellulose, DNA-Dowex WGR, DNA-PVA 加熱処理ガーゼ, DNA-PVA 紫外線照射ろ紙, DNA-PVAグロー放電ガーゼの5種において抗体価の著明な減少がみられた(表2)。

次に上記5種に対し、サンプル量・血清量は全く同じにし、反応時間を5分間に短縮したところ、DNA-PVAグロー放電ガーゼ, DNA-CM cellulose, DNA-Dowexが吸収効率が良いとの結果を得た(表3)。

更に吸収効率の良いこれら3種のDNA結合支持体に対し、支持体そのものが抗体価に影響を与えているか否か、DNAを結合させていない支持

	before reaction	after reaction
pH	7.4	7.4
Alb (%)	44.4	42.4
α1-g1	1.9	2.0
α2-g1	5.1	5.1
β -g1	8.4	8.3
γ -g1	32.0	34.1
IgG (mg/dl)	2590	2680
IgA	247	271
IgM	99	76
CH50 (U/ml)	26.1	21.1
C3 (mg/dl)	61.0	63.0
C4	15.0	15.0
C5	9.0	7.6
DNA (μg/ml)	13.6	11.7

表5 DNA-PVAグロー放電ガーゼの血清中種々成分に対する影響

体をコントロールとして、抗DNA抗体価を測定したところ、支持体のみでは抗体吸収は起こらないとの結論を得た(表4)。

2) DNA結合支持体の安定性

次に、前述した3種の結合支持体をPBS、及び正常人血清にて、37°C・1時間ごと(3回目はover night)に洗浄を繰り返した際に、遊離するDNA量(全DNAに対する%)を測定した(図2)。図2に示す如く、DNA-CM cellulose ではかなり多量のDNA遊離がみられたが、DNA-Dowex, DNA-PVA グロー放電ガーゼでは、遊離はほとんどみられなかった。特にDNA-PVAグロー放電ガーゼは量もDNA遊離が少ない。

次に前述の如く、6回洗浄後のおのおののDNA結合支持体につき、抗DNA抗体の吸着能を調べたところ、DNA-PVAグロー放電ガーゼが最も良い吸着能を示した(図3)。

3) DNA-PVAグロー放電ガーゼの血清に及ぼすその他の影響

DNA-PVAグロー放電ガーゼについて、反応前後の血清のpH, albumin, globulin, CH₅₀, C₃, C₄, C₅, DNA 量を測定したところ、変動はほとんど見られなかった(表5)。又、反応前後のImmune complex 量を測定したところ、反応前 6.0μg/ml に比べ反応後は4.0μg/mlと減少し、これよりこのDNA結合支持体は、抗DNA抗体を

結合すると共に, Immune complexをも減少せしめることが推察された(図4).

考 察

現在, 自己免疫疾患の治療法としては, ステロイド, 及び免疫抑制剤が主体として使用されているが, その副作用, 全身的影響の為, 使用不能な症例, 或いは, 上記薬剤が無効な症例をしばしば経験する. 最近これらの症例に対し, plasma exchange (血漿交換) が有効とされ, 我々も皮膚科分野における, 天疱瘡・類天疱瘡に対し, plasma exchangeを施行し, 非常に良好な結果を得ている¹¹⁾. しかしながら, plasma exchange もはじめに述べた如く問題点がある. そこで我々は今回, Plasma exchange よりさらに進んだ方法とされている Adsorptive plasma perfusion の開発を試みた. 基礎実験を始めるに当り, 抗原の明確になっている疾患としてSLEを選び, 抗DNA抗体を特異的に吸着する目的で, 17種のDNA結合支持体を新たに作製した. 現在DNA結合支持体としては, native DNA-CM cellulose, denatured DNA-CM cellulose とがあるが, これら2種も含め抗DNA抗体吸着能を比較検討, さらに, 血清中でのDNA結合支持体の結合の安定性を検討した. すでに述べた如く, 結果は抗体吸着能, 安定性ともに, 我々が今回開発したDNA-PVAグロー放電ガーゼが, 最も優れているとの結論を得た. この種の研究においては, Terman¹²⁾¹³⁾らによりDNA-コロジオン活性炭, DNA-セルロース寒天等のDNA結合支持体がつくられ, 動物実験が行なわれており, 抗DNA抗体の吸着に良い成績を修めたとしている. 我々の開発したDNA-PVAグロー放電ガーゼは, PVAとガーゼとの間に共有結合を作らせ, DNAをその網の中に閉じ込めてしまう方法であり, 安定性は非常に高い. これに比し, 前記したTermanらは, DNAと支持体との結合法として, いずれも強固な結合法を用いていない様である. DNAと支持体の結合という最も重要な部分に, この様な結合を用いることは問題があり, 我々の実験からも, DNA-

CM celluloseとDNA-Dowexは安定性に欠けるかあるいは, 洗浄を繰り返す事により, その抗DNA抗体の吸着力が落ちるという結果を得ている. イオン結合等の方法を用いる事には, 問題が多いと言わざるを得ない. この種の研究では, DNA結合支持体は抗DNA抗体の吸着能が高い事は最も重要な事であるが, 安定性が高いという事が必要条件となる. 特にDNA結合支持体よりDNAがはずれた場合, 患者血液中には多くのDNA-Immune complexが出来ることになり, DNA結合支持体の安定性は, 最も厳格に追求すべき問題であると考え. 我々の開発したDNA-PVAグロー放電ガーゼは, 以上の点からも利用価値が高いと言えよう.

次に, DNA-PVAグロー放電ガーゼの血漿中の他の成分に対する影響であるが, pHを始めとし, Albumin, Globulin, Complement等に対し, *in vitro*の実験からは問題となる影響はないとの結論を得, Plasma exchangeがすべての血漿成分を取ってしまうのに比べ, 本法の臨床応用が可能になった際には, 人体に対しよりside effectが少ない治療法になり得る事が推察される.

現在, 大量迅速処理につき本ガーゼ使用のカラム作製を検討し, 良好な結果を得ているが, これらについては別に述べる.

参 考 文 献

- 1) Tan, E.M., Schor, P.H., Carr, R.Z. & Kunkel, H.G.: Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in serum of patients with systemic lupus erythematosus: J. Clin. Invest. **45**, 1732. 1966.
- 2) Alberts, B. & Herrick, G.: DNA-cellulose chromatography, Method in enzymology (ed. by Grossman and K. Moldave): Vol. XII, part D, p198. Academic Press, New York.
- 3) Kissane, J.M., & Robins, E.: Fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissue with special reference to the central nervous system: J. Biol. Chem. **233**, 184, 1958.
- 4) Hay, F.C., Nineham, L.J., & Roitt, I.M. Rou-

- tine assay for the detection of immune complex of known immunoglobulin class using solid phase C_{1q} : Clin. Exp. Immunol. **24**, 396, 1976.
- 5) S. Miyagawa, M. Iwai, & K. Sakamoto: circulating immune complexes in pemphigus, Response to steroid therapy: J. Invest. Derm. **77**(5) in press.
- 6) K. Yonematsu, & R.M. Stroud: C_{1q} rapid purification method for preparation of monospecific antisera and for biochemical studies: J. Immunol. **106**, 304, 1971.
- 7) P.K. Nakane, & A. Kurao: Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation: J. Histochem. Cytochem. **22**, 1084, 1974.
- 8) H. Yasuda, & T. Hirotsu: Polymerization of organic compound in an electrodeless glow discharge (10): Internal stress in plasma polymers: J. Appl. Polym. Sci. **21**, 1457, 1977.
- 9) T. Hirotsu, & S. Ohnishi: Surface modification of some fluorin polymer films by glow discharges: J. Adhesion, **11**, 57, 1980.
- 10) T. Hirotsu: Some surface properties of plasma polymers prepared from hexamethyldisilazane and diethylaminotrimethyl silane: J. Appl. Polym. Sci. **24**, 1979.
- 11) 渡辺修一, 高森建二, 小川秀興: 尋常性天疱瘡の血漿交換療法: 臨皮, **23**, 1981.
- 12) D.S. Terman, D. Petty, R. Harback, R.I. Carr & G. Buffalo: Specific removal of DNA antibodies in vivo by extracorporeal circulation over DNA immobilized in collodion chacoal: Clin. Immunol. Immunopathol. **8**, 90~96, 1977.
- 13) D.S. Terman, I. Stewart, J. Robinette, R. Carr and R. Harbeck: Specific removal of DNA antibodies in vivo with an extracorporeal immuno-adsorbent: Clin. exp. Immunol. **24**, 231~237, 1976.

塩酸ニカルジピンの降圧効果について

塩酸ニカルジピン(perdipine)は血管平滑筋細胞の中への Ca^{++} の取り込みを抑制することにより血管拡張作用、血圧降下作用や冠拡張作用のあることはすでに諸家によって報告されている。われわれも脳血栓後遺症5例に本剤を使用する機会があり、血圧降下作用について若干の知見を得たので報告する。

症例は罹病期間2カ月より6年にわたる男性3例、女性2例で、年齢は57~73才である。薬剤の投与期間は、同系統の薬剤の併用はさけ、5週から16週で、1日60mgを分三投与した。自覚症状では、頭重感、めまい、めまい感の改善が目立ち、神経症状では、構音障害、運動障害が、精神症状では、不安、焦躁感に改善の傾向がみられた。

血圧の変動については、図のごとく全例に血圧の低下がみられ、とくに拡張期血圧の漸次下降が目立った。一般の降圧剤は長期間にわたって継続されることが多く、心・血管系に機能的あるいは器質的変化を及ぼすことが少なくない。カルシウム拮抗剤はこれらの薬剤と作用機序が異なり、血管に直接作用し、血管抵抗を低下させる。5症例とも緩徐な血圧下降がみられ、心・肝・腎機能に変化なく、副作用の出現もみら

血圧の変動 (脳血栓後遺症)

れなかった。症例が少なく大規模な追試が必要であるが、降圧剤使用時に考慮されるべき薬剤と思われる。

(Dec., 24, 1981)

(お茶の水相互クリニック 森近 浩)