博士（医学）　佐　川　　昭

学位論文題名

等電点電気泳動法による全身性エリテマトーデスの抗DNA抗体の分析

－免疫グロブリンクラス，免疫複合体との関係－

学位論文内容の要旨

Ⅰ　研究目的

全身性エリテマトーデス(SLE)において，抗DNA抗体は腎障害をはじめ血管炎や皮膚炎の発症に大きくかかわっていることが推定され，二本鎖DNA（ds－DNA）や一本鎖DNA（ss－DNA）に対する抗体，免疫グロブリンクラスによる違いによってその病原性の違いや疾患活動性との関係などが指摘されている。また，SLEは免疫複合体病としても知られ，DNA／抗DNA抗体の免疫複合体(IC)の沈着が種々の臓器障害を引き起こすとされている。本研究では，SLE患者につき，等電点電気泳動法（IEF）を用いて抗DNA抗体の種類及び分布やICとの関係について明かにすることを目的とした。

Ⅱ　実験方法

1）症例：当科外来通院または入院中のSLE患者の活動期血清を用いた。

2）分取用IEF：水平型IEFカラムに，患者血清とBiolyte（pH3.0－10.0）を混合し泳動後，試料を20分画しpHを測定した後，透析し分析に用いた。

3）ELISA法による抗DNA抗体の測定：ds－DNA，ss－DNAをマイクロプレートに固相化し，被検血清を加え反応させた。洗浄後Peroxidase標識ヤギ抗ヒトIgG(またはIgM, IgA)抗体を反応させ，基質を加え吸光度を測定した。

4）ICの測定：MRLマウスのモノクローナルIgG型リウマトイド因子を固相化したマイクロプレートに被検血清を加え反応させた。洗浄後Alkali-phosphatase標識ヤギ抗ヒトIgG抗体$F(ab')_2$分画を反応させ，基質を加え吸光度を測定した。

5）FPLC, HPLCカラムによる患者血清の分離：イオン交換はFPLCカラムを，ゲル濾過

にはHPLCカラムを用いた。

5）PHカラムによる抗DNA抗体の溶出：SLE患者血清を本カラムに吸着させた後溶出し，その分画を透析後濃縮してIgGおよび抗DNA抗体を測定した。

Ⅲ 結　果

1）ELISA法による免疫グロブリンクラス別抗DNA抗体：SLE群におけるIgGおよびIgM型抗ss－，抗ds－DNA抗体およびIgA型抗ss－DNA抗体は健常人に比べ有意に高かったが，IgA型抗dsDNA抗体では有意差を認めなかった。

2）IEFによる血清免疫グロブリン，抗DNA抗体およびICの分布：SLE患者血清のIEFによる分析で，IgGはほとんどの部分がpH 6付近にピークを持つ幅の広い分布を示し，pH 9以上の部分にも一部分布していた。IgAおよびIgMはpH 5付近にピークを認めたが，IgGに比べその分布は狭くpH 9以上の部分への分布はなかった。抗DNA抗体のIEFによる分析でIgG型抗DNA抗体は，抗ss－，抗ds－DNA抗体共に酸性寄り（pH5.7前後）とアルカリ寄り（pH 8から10前後）の二峰性の分布を示した。IgAおよびIgM型抗DNA抗体は，単峰性で酸性側（pH5.7）に分布していた。ICを測定した結果では，IgGと同様にpH 9以上の部分に分布していた。

3）FPLCおよびHPLCによる抗DNA抗体およびIC分布の分析：抗DNA抗体およびICを，FPLCのIgGを主成分とする第一ピークに認めた。さらにHPLCによるゲル濾過にて，ICは高分子領域に特に高く，他の領域にも幅広く認めた。抗DNA抗体は高分子領域が主で，IgG型抗ss－DNA抗体が主なものであった。上記のFPLCによる第一ピークのHPLCでの分析では，ICは高分子領域に多く，抗DNA抗体は高分子領域および低分子領域に認めた。

4）PHカラムによる抗DNA抗体の溶出：SLE患者におけるPHカラムによる免疫吸着療法で，血中IgG型抗DNA抗体の減少率を見た。抗ssDNA抗体は77.8%，抗dsDNA抗体は62.9%であり，ICは56%であった。本カラム通過により抗DNA抗体は著明に下がりIEF分布で見ると特に高pH領域のピークが消失していた。本カラムに吸着させたSLE患者血清成分をNaClにて溶出した。最初の低濃度塩にて大部分のIgGは溶出し，高濃度塩で溶出されたものは最初の約1/8.2から1/9.6程度であったが，抗DNA抗体の溶出量の変化はほとんどなく，抗DNA抗体／総量IgG比で見ると抗DNA抗体は高塩濃度での溶出率が高く，総IgGに比べPHカラムにより親和性の強いことがわかった。本カラムによる低濃度塩溶出分画はアルカリ側に幅広く分布していたが，高濃度塩溶出分画はさらに強いアルカリ側のpH9.0付近に限局し

ていた。

Ⅳ 考　案

全身性エリテマトーデスにおいて抗 DNA 抗体は最もその病因との関連が深く，種々の面から検討がなされている。SLE 患者血清の IEF による各免疫グロブリンの分布で IgG は IgA や IgM と異なり，高 pH 部分の分布を含め二峰性を示したが，この傾向は各クラス別の抗 DNA 抗体の IEF での分布をみた時も同様であった。さらに IC は，IgG の分画に見られたこの高 pH 部分の分布に一致して認められ，この部位に IgG 主体の IC の存在が明かとなった。この様に液相の IEF で IC の位置を確認した報告はなく本研究が始めてである。さらにこのアルカリ側の部分は SLE 患者での PH カラムによる免疫吸着療法で消失しており，本カラムが抗 DNA 抗体のみならず ICをもよく吸収しているのが明かであった。FPLC による抗 DNA 抗体および IC の分析では，ともにその主要部分を IgG を主成分とするカラム素通りの第一ピークに認めたが，このピークは主に cationic IgG からなっていると思われ，IC もこの部分に存在していることが示された。このことはまた PH カラムが特に cationic IgG を吸着する能力があり，同時にその部分に存在している IC をも吸着するのに都合がよいと言うことが判明した。HPLC 分析にて，SLE 患者血清では主に抗 DNA 抗体を主体とした様々のサイズの IC が形成され循環していることが示された。SLE の IC について種々の報告が見られるが，本研究においても種々のサイズのものが認められており，今後さらに IC サイズと SLE の各病型毎の関係についての分析が重要と思われた。本カラムより溶出された抗 DNA 抗体はより濃縮された IgG 型抗 DNA 抗体で，アルカリ寄りの部分に限局して分布している cationic IgG（抗 DNA 抗体）である。さらにこの様な cationic IgG（抗 DNA 抗体）が腎組織に対し親和性が強く腎毒性を示す可能性があるとの報告がみられるが，これらの点については今後，より直接的でかつ綿密な分析が必要であると思われた。

Ⅴ 結　論

SLE 患者血清を用い，IEF にて免疫グロブリン，抗 DNA 抗体および免疫複合体の分布を調べ以下の結論を得た。

1．抗 DNA 抗体には，IgG，IgA，IgM class のものが認められ，IEF にて各免疫グロブリンと同様にそれぞれ特有の限定した pH の範囲に分布していた。IgA 及び IgM 型抗 DNA 抗体は酸性寄りに一つのピークを示すように分布したが，IgG 型抗 DNA 抗体は二相性に別れア

ルカリ寄りの部分はICの分布と一致していた。

2．またFPLC（イオン交換法）やHPLC（ゲル濾過法）など他の方法を用いた場合にも抗DNA抗体とICは一致した分布を示し，抗DNA抗体を含むICを見ているものと思われた。さらにこの様なICは様々の分子サイズのものが認められた。

3．SLE患者に対し行ったPHカラムを用いた免疫吸着療法では，この様なICはカラムにより吸着除去された。このことよりPHミニカラムを作製しSLE患者血清の分析を行ったところ，カラムに対する親和性は溶出第二ピークでより強く抗DNA抗体の濃度も高かった。同成分はIEFプレート法による分析ではよりアルカリ側に分布していた。

4．以上よりヒトSLE患者において，IgG型抗DNA抗体の中でもアルカリ領域に分布した陽イオン性IgG型抗DNA抗体とされるものは，免疫複合体を形成しやすい傾向を示し，このタイプの抗DNA抗体はSLEの組織障害，特に糸球体腎炎の発症に関与している可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　中　川　昌　一

副　査　　教　授　　小　林　邦　彦

副　査　　教　授　　柿　沼　光　明

抗DNA抗体およびDNA／抗DNA抗体の免疫複合体（IC）は，全身性エリテマトーデス（SLE）の腎障害をはじめ血管炎や皮膚炎などの臓器障害を引き起こすとされている。

今回申請者は活動期SLE患者の血清を用い，等電点電気泳動法（IEF）により抗DNA抗体の種類や分布，ICとの関係について分析を試みた。

その結果は，

(1) SLE群におけるIgG，IgM型抗ss－，抗ds－DNA抗体およびIgA型抗ss－DNA抗体は健常人に比べ，有意に高かった。

(2) SLE患者血清中免疫グロブリンの等電点による分析で，IgGは二峰に分かれ大部分はpH 7以下に分布し，残りはpH 9以上の分画に認められた。IgAとIgMはそれぞれpH4.7と5.1に一つのピークを示しIgGに比べその幅は狭く，pH 9以上には認められなかった。

(3) 抗 DNA 抗体の等電点は, SLE 症例では抗 ss－, 抗 ds－DNA 抗体ともに二峰性の分布を示し, 第一のピークは pH5.7に, 第二のピークは pH9.0に認められた。IgA および IgM 型抗 DNA 抗体の等電点分布は, 各症例とも単峰性であった。

(4) IC の等電点による分布では, mRF 法で pH8.5よりアルカリ側に向かって上昇し分画19においてピークを形成した。anti－C1q 法でも同様であった。

(5) FPLC イオン交換カラムで抗 DNA 抗体および IC はともに, IgG が主成分である第一ピークに一致して認められた。

(6) 症例 1 の FPLC イオン交換カラムによる第一ピークを HPLC にてゲル濾過し, IC および抗 DNA 抗体の分布を測定した。IC は特に高分子領域に多く, 抗 DNA 抗体は高分子領域および低分子領域に認められた。

(8) 抗 DNA 抗体高値の SLE 患者に対しフェニルアラニン結合（PH）カラムを用いた免疫吸着療法を行った。同カラム通過により抗 DNA 抗体は著明に低下し特に高 pH 領域のピークが消失した。

(9) 臨床経験例を実験的に確認のため PH カラムに吸着した SLE 患者血清成分を, NaCl をステップワイズに加え溶出し, 分画中の IgG 濃度および抗 DNA 抗体を測定した。最近の0.15 MNaCl 加 TBS で大部分の IgG は溶出し, 0.5MNaCl 加 TBS で溶出されたものは総量にして約 1/8 から 1/9 程度であった。

(10) 抗 DNA 抗体と IgG の比は0.15MNaCl 加 TBS にて溶出された分画では0.10～0.12であるのに対し, 0.5MNaCl 加 TBS で溶出された分画で0.35～0.49と高く, 抗 DNA 抗体がその部分に濃縮され溶出されたため, 抗 DNA 抗体は非特異的 IgG に比べより PH カラムに対し親和性が強いことが判明した。

(11) 上記の PH カラム溶出分画の等電点電気泳動では, 0.15MNaCl 加 TBS 溶出分画は pH 7.8付近を中心としたアルカリ側に幅広く分布したが, 0.5M NaCl 加 TBS 溶出分画はそれよりさらにアルカリ側に限局して分布した。

以上の結果, 活動期 SLE 患者血清において,

1．抗 DNA 抗体には, IgG, IgA, IgM class のものが認められ,IgG 型抗 DNA 抗体は IEF で二相性に分布しアルカリ寄りの部分は IC の分布と一致した。

2．FPLC や HPLC でも抗 DNA 抗体と IC の分布は一致していた。IC は種々の分子サイズのものが認められた。

3．SLE 患者での PH カラムによる免疫吸着療法では, 抗 DNA 抗体は総 IgG より親和性が強

く，よりアルカリ側に分布していた。

4．以上の結果よりヒトSLE患者において，特にアルカリ領域に分布したcationic IgG型抗DNA抗体は，免疫複合体を形成しやすい傾向を示し，SLEの組織障害，特に糸球体腎炎の発症に関与している可能性が考えられた。

試問に際し，小林教授より，DNA以外の成分を抗原としたICについての検索，抗DNA抗体が酸性のDNAと結合するとアルカリ側よりむしろ酸性側に移動する理由，抗DNA抗体がcationicな理由は構造的なものかどうかについて，柿沼教授より，ICがアルカリなのはC1qを多く含むためではないのか，IgG subclassによる違いはどうか，皆川教授より，SLEの活動性との関係，CNSループスにおける抗DNA抗体およびICの髄液への出現の有無，免疫吸着療法での有効例の有無，有効除去成分などについて，宮崎教授より，等電点分析の結果は病態予後判定の指標になるか，IgGのICが腎組織に沈着する理由，Adhesion moleculeとの関係，IgG，IgA，IgMなどのpI（等電点)について糖質の量やPolymerなどの影響について，石橋教授より，ICはbasicであるので，Mono-Q columnをもちいるならば，pass throughしない条件で行うべきであるなどについて，それぞれ質問およびコメントがあったが申請者は概ね適切な答弁をした。

以上により，本論文は学位授与に値するものと判定した。