

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

免疫疾患診断用プロテイン・チップの開発に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 伊藤 嘉浩

平成 18 (2006) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

免疫疾患診断用プロテイン・チップの開発に関する研究…………… 1

伊藤 嘉浩

II. 分担研究報告

1. 免疫疾患診断プロテイン・チップ開発用のコンテンツ（アレルゲン）

確立に関する研究…………… 8

上阪 等

2. 免疫疾患診断プロテイン・チップ開発用の自己抗体標準血清の確立

に関する研究…………… 12

諏訪 昭

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 22

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 25

I .総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
総括研究報告書

免疫疾患診断用プロテイン・チップの開発に関する研究

主任研究者 伊藤 嘉浩

独立行政法人理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員

研究要旨

抗体検査を、より微量なサンプル量で、より迅速に、より多くの種類について検討できるようにプロテイン・チップによる検出システムの開発を目指して研究を行った。これまでに主任研究者の伊藤が開発してきた光固定化法は、様々な生体分子を固定化できる特徴がある。そこで、自己免疫疾患関連抗原である多様なタンパク質やDNAを同一のポリスチレン基板上に固定化し、これを自己免疫疾患診断チップとして、慶應義塾大学病院よりインフォームドコンセントをへて取得された患者血清を使用して評価した。

分担研究者

上阪 等 （独立行政法人理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 自己免疫病・ユニットリーダー）

諏訪 昭 （東海大学医学部内科学リウマチ内科・助教授）

A. 研究目的

免疫系は、当初は外来微生物に対する生体の防御機構と考えられてきたが、近年の免疫学の進歩は、免疫系が中枢神経系と同様に、生体の高次機能の一つであると位置づけるようになった。免疫系は、非特異的な防御機構である自然免疫と、自然免疫を補完する細胞内外の抗原に対する特異的な防御機構である獲得免疫に大別されるが、健康な状態では、自己細胞成分に対して免疫応答が起こらないような「免疫学的寛容」が成立、維持される仕組みが構築されている。しかし、自己免疫疾患は免疫系が内因性自己抗原に反応して起こる疾患で、全身の諸臓器を障害する慢性炎症性疾患である。自己免疫疾患の発症には、免

疫学的寛容の破綻が主要な要因であることが、これまでに明らかとされているが、その詳しい機構は未解明のままである。そのため、治療法が確立されておらず、生命予後不良な疾患も多く、難病とされる。その発症には、遺伝的因子と環境因子の関与が示唆されているものの、病因はいまだ不明である。

自己免疫疾患では、自己細胞成分に対する種々の自己抗体が血清中に産生されることを基本的特徴とするが、これらの自己抗体は特定の臨床像と密接に関連し、疾患の診断や病型分類、治療効果判定、生命予後推定など臨床的に極めて重要である。さらに、自己抗体が特定の細胞内分子を特異的に認識することから、基礎生物学の分野においても細胞内外分子の構造と機能解明にも役立つプローブとして応用されてきた。しかしながら、現在の抗体測定法は、個々の自己抗原を単独で測定するものであるため、多数の抗体の解析に適さず、かつ旧来の ELISA 法に基づく方法であるため測定できる抗原の種類も限られていた。

そこで、本研究では、申請者らが開発した抗原マイクロアレイを応用し、数千におよぶ細胞内外の分子に対する自己抗体およびこれら分子発現や相互作用を自己免疫疾患患者において解析するものである。この技術の特徴は、

- 1) どのような生体分子も共有結合で安定にマイクロアレイ固定化可能。
- 2) ランダム配向で固定化でき、固定化物の有効濃度が高い。
- 3) 非特異的吸着を抑制して高い S・N 比を実現

であり、この技術を用いれば、多数の自己抗体を短期間に検出でき、かつ従来にない自己抗体も検出可能であることから、疾患の早期診断や従来診断が困難だった自己免疫疾患の診断を容易にするものと期待される。かかる研究は、自己免疫疾患の診断や病態の把握、治療効果判定など日常臨床に直ちに応用可能なばかりでなく、病因解明の端緒となる先駆的な技術となることが期待される。

B. 研究方法

自己免疫疾患診断チップの作製は以下のように行った。

- 1) チップ(ハイインパクトポリスチレン)表面の UV、オゾンによる親水化処理。
- 2) 20% PEG methacrylate ポリマーをそれぞれ終濃度 5% になるよう、1% ビスアジドをそれぞれ終濃度 0.25% (ポリマーに対して 5%) になるよう混合し、ポリマーサンプルを調製した。
- 3) スピンコート (5000rpm×30sec) によってチップ上へ調製したポリマーサンプルのプレコートを行った。
- 4) 0.09Mpa で 15 分間減圧乾燥した。
- 5) ブラックライトにて 7 分間 UV 照射した。
- 6) ビスアジドを自己抗原(表 1)に対して 10% となるように抗原と混合し、抗原サンプルを調製した。

- 7) 調製した抗原サンプルをプレコートしたチップ上にアレイヤーを用いてスポットした。
- 8) 常温常圧で7分間乾燥後、ブラックライトにて7分間 UV 照射した

表1 今回の実験で使用した抗原

使用自己抗原	メーカー	Catalog code	固定化濃度
SS-A52kDa recombinant(baculovirus)	DIARECT AG	12700	1.25mg/ml
SS-A60kDa recombinant(bovine)	DIARECT AG	15500	1.25mg/ml
SS-B(La antigen)	Fitzgerald	FZ30-AS74	1.25mg/ml
1snRNP68Protein(68kDa)	DIARECT AG	13000	1.25mg/ml
U1snRNP複合体	慶応義塾大学病院		1.25mg/ml
U-snrNP Protein B/B' (Smith antigen)	DIARECT AG	13300	1.25mg/ml
Topoisomerase(Scl-70)	Fitzgerald	FZ30-AS70	1.25mg/ml
Histidyl-tRNA Synthetase(Jo-1)	DIARECT AG	12900	1.25mg/ml
dsDNA(Plasmid)	DIARECT AG	12300	1.25mg/ml
Centromere ProteinB(CENP-B)	DIARECT AG	12500	1.25mg/ml

※使用抗原の表記はデータシートに基づく

化学発光法による検出は以下のように行った。

- 1) チップを PBS (0.1% Tween 20) でミキサーにて 3 分間洗浄した。
- 2) 0.1MPa で 5 分間減圧乾燥した。
- 3) 100 倍希釈した患者血清を滴下し、ミキサーにて 20 分間反応した。
- 4) PBS (0.1% Tween 20) でミキサーにて 3 分間洗浄した。
- 5) 10%BSA 入り PBS で 4000 倍希釈した anti-human IgG (Amasham 製) を滴下し、ミキサーにて 20 分間反応した。
- 6) ECL Advance (Amasham 製) を用いて化学発光による検出を行った。

(倫理面への配慮)

患者血清は、慶応義塾大学倫理委員会での承認をへてインフォームドコンセントを得て取得し、独立行政法人理化学研究所での倫理委員会の承認をへて研究に供している。

C. 研究結果

まず、本チップシステムの高い再現性を得たので、本方法と MBL 社製の ELISA 法との相関をとり、そのグラフを図 1 に示す (Jo-1 については評価対象となる検体がなかった)。抗 SS-B 抗体で 0.93、抗 1snRNP68 プロテイン抗体

で、0.84、抗dsDNA抗体で0.89、抗Centomere Protein B抗体で0.97と高い相関性が得られた。

図1 ELISA法による評価結果との比較

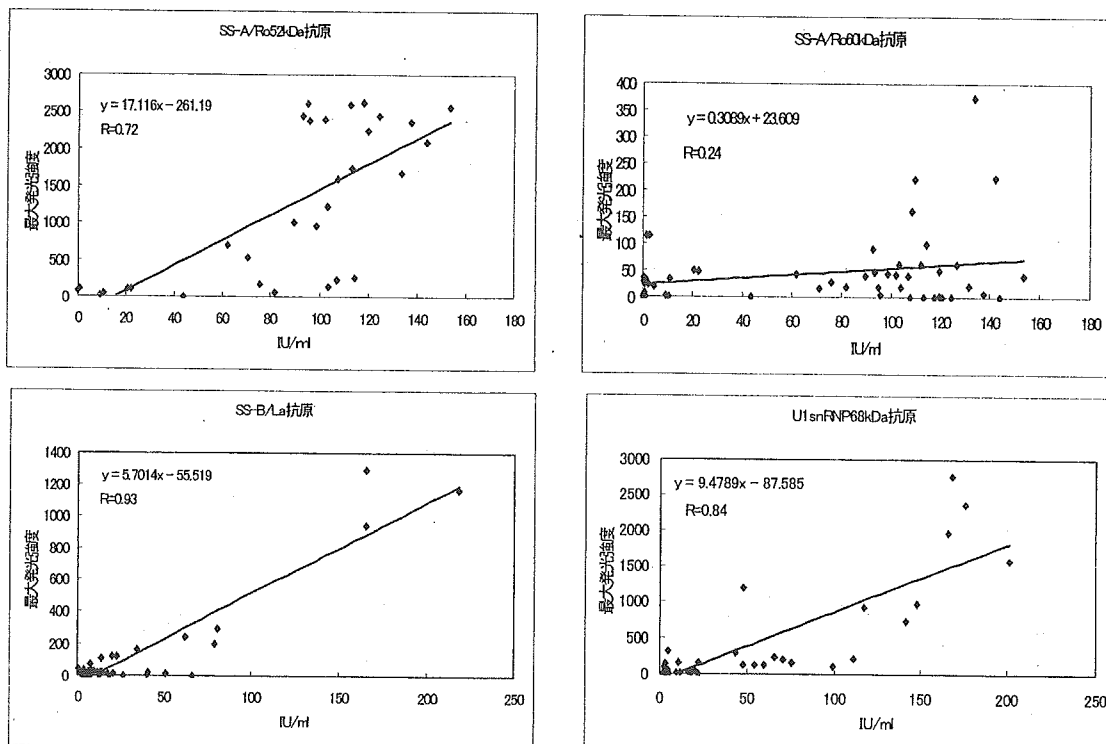
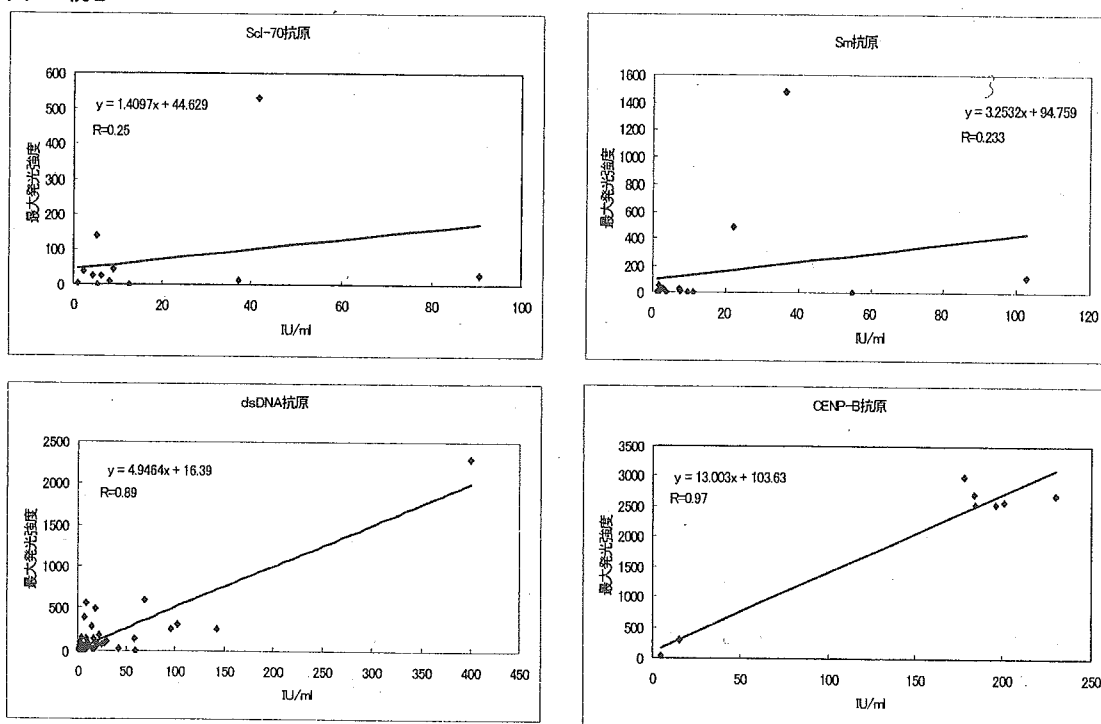


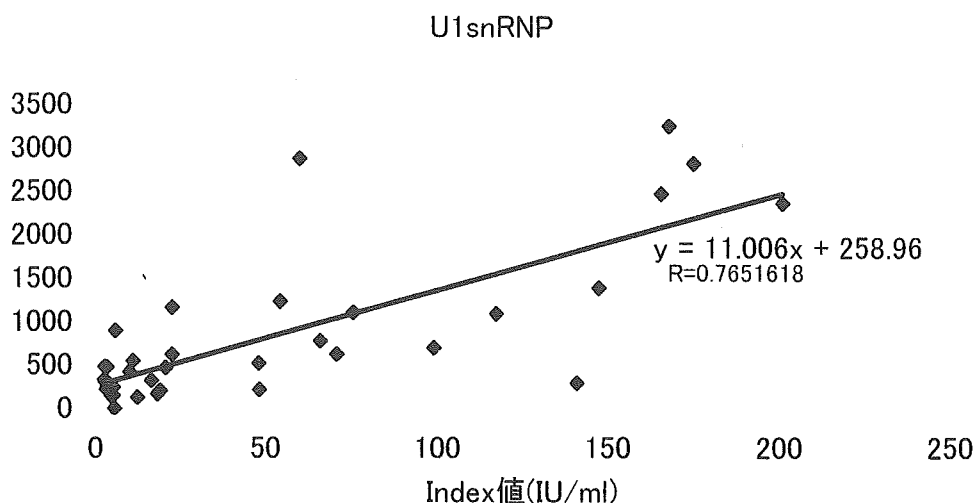
図1の続き



一方、抗 SS-A52kDa 抗体で 0.72 と中程度の相関、抗 SS-A60 kDa 抗体、抗 U-snRNP Protein B/B' (Sm) 抗体、抗 Topoisomerase (Sc1-70) では、0.24、0.23、0.25 と非常に低い相関関係となった。これらについては、本チップでは、非常に低い発光強度しか得られておらず、抗原の入手先が異なることを考えると、その相違が影響したためと考えられる。ただ、SLE 患者には、抗 Sm 抗体とともに抗 U1RNP の発現がみられ、チップでも抗 Sm 抗体が検体中に存在する場合、ほぼ全例で抗 U1RNP も陽性となるとされており、この結果と一致していた。

U1snRNP は U1snRNP68kDa、A、C からなる複合体である。以前の MCTD 患者と SLE 患者間ではそれぞれの患者血清中の抗 RNP 抗体の認識部位が違うということが報告されている。今回使用した U1snRNP68kDa のみ評価を行っている。MBL 社の ELISA 法で抗 RNP 陽性と診断されたものに対し、今回発光が検出できなかったものは、他のサブユニットを基質として認識するのかもしれないと考え、我々の方法で、U1snRNP 複合体を使用して検討した結果を図 2 に示す。しかし、相関性は高まるより、むしろ低くなる結果となった。

図2 慶應義塾大学病院調製U1snRNPでの血清評価



D. 考察

自己抗原マイクロアレイ・チップを自己免疫診断に用いる取り組みは、Robinson et al., Nat. Med., 2002; 8, 1-7 や Feng et al., Clin. Chem., 2004; 50, 416-422 で報告されている。自己免疫疾患は複数の抗体の組み合わせで起こる疾病であるため、マイクロアレイで抗体を検査することは診断にとって重要になることが考えられるとともに、従来は関係が明らかでなかった抗体と疾病と

の関係が一部明らかになってきている。

今後は、MBL社から抗原提供が可能となったので、同じ抗原を用いてチップを作成し、相関性を定量する。

E. 結論

本年度は、既知で臨床診断に用いられている自己抗原をマイクロアレイ固定化することに成功し、患者血清を用いた1次評価を行うことができた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Ito, T. Yamauchi, M. Uchikawa, Y. Ishikawa, "Photoimmobilized array of panel cells for assay of antibodies," *Biomaterials*, **27**, 2502-2506 (2006)
2. K. Ohyama, K. Omura, Y. Ito, "A photo-immobilized allergen microarray for screening of allergen-specific IgE," *Allerg. Int.*, **54**, 627-631 (2005)
3. Y. Ito, H. Hasuda, H. Terada, T. Kitajima, "Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor," *J. Biomed.Mater.Res.*, **74**, 659-665 (2005)
4. Y. Ito M. Nogawa, M. Takeda, T. Shibuya, "Photo-reactive polyvinylalcohol for photo-immobilized microarray," *Biomaterials*, **26**, 211-216 (2005)
5. T. Konno, H. Hasuda, K. Ishihara, Y. Ito, "Photo-immobilization of a phospholipids polymer," *Biomaterials*, **26**, 1381-1388 (2005)
6. 伊藤嘉浩、大村馨、「なんでも固定化バイオチップ」、バイオニクス, 2(9), 68-69 (2005)
7. 伊藤嘉浩、「幹細胞の体外増幅」、Organ Biology, 12(1), 47-55 (2005)
8. 伊藤嘉浩、O. H. Kwon, I.-K. Kang、「再生医療用ナノファイバー」、バイオインダストリー, 22(5), 41-46 (2005)
9. 横山昌幸、伊藤嘉浩、「ナノメディシン—特集にあたって」、バイオインダストリー, 22(4), 7-8 (2005)
10. 伊藤嘉浩「マイクロアレイ・バイオチップ最前線」「バイオテクノロジー総覧」日本能率協会総合研究所、通産資料出版会、p. 662-670 (2005)
11. 伊藤嘉浩「再生医療材料」「図解高分子新素材のすべて」国武豊喜監修、工業調査会、p. 94-97 (2005)

2. 学会発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

免疫疾患診断プロテイン・チップ開発用のコンテンツ（アレルゲン）
の確立に関する研究

分担研究者 上阪 等

独立行政法人理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター
自己免疫病・ユニットリーダー

研究要旨

新しいプロテイン・チップによる自己免疫疾患診断システムの開発を目指して、チップ上に搭載する新たな抗原の探索検討を、（１）既知の自己抗原のペプチド、（２）未知の自己抗原探索の観点から行った。

A. 研究目的

本研究では、チップ上に搭載する新たな抗原の探索検討を行った。次の２点からの検討を行った。（１）既知の自己抗原のペプチドの固定化と血清との反応評価、（２）未知の自己抗原探索のための細胞試料調製。以下に各々の項目について検討結果を記す。

（１）自己抗体として知られる抗 U1snRNP 抗体が対応する U1snRNP 分子は、U1snRNP と 9 種の蛋白(70 k, A, B' /B, C, D, E, F, G)の複合体である。この中で直接に反応する抗原は、70 k, A, C 蛋白である。U1snRNP は、核内に存在する small nuclear RNP (snRNP) 群に属している。snRNP は、spliceosome を構成する蛋白で pre-mRNA から mRNA へのスプライシング機能をもつ蛋白である。抗 U1snRNP 抗体が陽性であることは、混合性結合組織病(MCTD)の厚生省基準の必須項目である。陽性例は、他の多くの疾患でも見られるが、MCTD に共通する臨床所見が高率である。

この研究では、抗 U1snRNP 抗体の臨床的重要性に着目し、U1snRNP (70K, A, C) タンパクのオーバーラップペプチドをポリスチレン基盤上に光固定しプロテインチップを作成し、患者血清と反応させて詳細な認識エピトープ解析を行なう。さらに、その認識パターンのクラスター解析を行なうことで、特徴的症状や予後に結びつけることを目的とする。これによって、従来の抗核抗体検査法では得られなかった情報が得られ、治療方法決定や予後予測など臨床的に役立つこ

とを期待している。今年度は、予備検討としてペプチドがポリスチレン基板上に光固定できることを確認することを目的として実験を行った。

(2) 真核細胞の核内の抗原性物質に対する抗体群を総称して、抗核抗体 (antinuclear antibody ; ANA) と呼ぶ。対応する抗原は多数あるため、その抗原特異性に基づいて抗核抗体は多種類に細分類される。膠原病各疾患の患者血清中には、その疾患に特有な自己抗体群が検出される。その中心となるものは、細胞の核や細胞質の構成成分に対する自己抗体、すなわち抗核抗体と抗細胞質抗体とである。これらはともに臨床検査としての有用性が高い。

この研究では、疾患特異性が高い、症状をよく反映する、などのより臨床的有用性の高い新規抗核抗体を、光固定化を用いたプロテインチップを利用して探索する事を目的とする。従来、ウエスタンブロット法や免疫沈降法などを用いて自己抗体の探索がなされてきたが、より多種の核タンパクを抗原として分画し、ポリスチレン基板上に固定することで新規の抗核抗体が見つかる可能性が高い。また、プロテインチップを利用することで従来の方法に比べ、より多くの患者血清を用いた探索を行なうことが可能である。そのため、より疾患特異性が高く臨床的有用性の高い新規抗核抗体が発見できることが期待される。

B. 研究方法

(1) 多くの患者血清において U1snRNP タンパクのエピトープとして認識されていることが報告されているペプチドを探索し、これを合成し、ポリスチレン基板上に光固定しチップを作成する。同時に、U1snRNP 複合タンパク及び個々の 70K, A, C のタンパクも同様の方法で固定する。

(2) HeLa 細胞より核タンパクを抽出し、SDS-PAGE の原理を利用した方法で分画する。分画した核タンパクをポリスチレン基板上に光固定し、プロテインチップを作成する。作成したプロテインチップに患者血清を反応させる。化学発光により検出を行い、陽性反応を示すチップ上のスポットを確認する。

陽性反応を示した分画中に含まれているタンパクを質量分析器で同定し、未知の自己抗原を同定する。

研究方法 (倫理面への配慮)

慶応義塾大学医学部よりインフォームド・コンセントに基づき、来院者へ医師が個別に依頼し抹消静脈より採血、血清を分離する。病院において、連結可能匿名化を行った後、作成したペプチドチップにかけ反応させる。化学発光により検出を行い、ペプチドを光固定できるか否かを検証する。

C. 研究結果

(1) コントロールとしてポリスチレン基板上に光固定した U1snRNP 複合タンパク及び 個々の 70K, A, C のタンパクに対する陽性反応が見られた。これに対して、患者血清において U1snRNP タンパクのエピトープとして認識されていることが多く報告されている配列の合成ペプチドに対する陽性反応は見られなかった。

(2) HeLa 細胞から、低張液を用いて細胞膜を破壊し核のみを精製する方法を用いて核タンパクを抽出した。5×10⁸ 個の細胞から、23 ミリグラムのタンパクが得られた。このすべてを可溶化して分画するには SDS による可溶化が必須である。そこで、SDS-PAGE の原理を利用したタンパクエリユージョン用の機械であるプレップセル(Bio Rad)を用いて、核タンパクを SDS 存在下に大量分画することを試みた。その結果、ゲル中でのタンパクの拡散が激しく、期待した分離能は得にくいことがわかった。また、この機器を用いると、一日では高分子量の核タンパクを抽出することも困難であった。

D. 考察

(1) 用いた患者血清が、今回のペプチド配列を認識しているとは必ずしも確認されていない。人種間での差や施設間での差も考えられ、用いた患者血清中の抗体にエピトープとして認識されていない可能性もある。そのため、ペプチドがポリスチレン基板上に光固定できるか否かの結論は得られなかった。血清の反応性を検討した上で再度評価を行い、改良点すべき点を考える必要がある。

(2) プレップセル(Bio Rad)は、本研究のように様々な分子量のタンパクが広範囲にわたって含まれている核タンパクを細かく分画することには不向きであった。これ以外にも核タンパクの分画方法として SDS-PAGE のゲルからバンドを切り出す方法や HPLC を利用した方法などが考えられる。しかしこれらの方法では、従来、自己抗体探索に用いられてきたウエスタンブロット法をしのぐ分離能で、より多種のタンパクを分画することは困難であると考えられる。

E. 結論

(1) ペプチドのマイクロアレイはすることは、できたが、明確な陽性反応は得られなかった。今後、新しい方法で、まずペプチドそのものの反応性を検討し、陽性反応が明らかに見られるものについて、光固定化による検討を行う。

(2) プロテインチップを用いて新規自己抗体を探索するためには、従来行なわれてきたウエスタンブロットや免疫沈降法をしのぐ分離能でより多種の核タンパクを抽出してくる必要性が高かった。しかし、SDS-PAGE ゲルでは、従来方法をしのぐ分離能で核タンパク分画を得ることは困難であった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Liu, H. Kohsaka, M. Suzuki, R. Takagi, K. Hashimoto, Y. Uemura, H. Ohyama, S. Matsushita, “Positional effect of amino acid replacement on peptide antigens for the increased IFN-gamma production from CD4 T cells”, *Allerg. Int.* **54** (1), 117-122, (2005)
2. F. Suzuki, T. Nanki, T. Imai, H. Kikuchi, S. Hirohata, H. Kohsaka, N. Miyasaka, “Inhibition of CX3CL1 (fractalkine) improves experimental autoimmune myositis in SJL/J mice.” *J Immunol* **175**(10) :6987-6996 (2005)
3. 上阪 等「これだけは知っておきたい検査のポイント第7集 抗 Sm 抗体」*medicina* 第42巻 第12号増刊号 424-425 (2005)
4. 上阪 等「これだけは知っておきたい検査のポイント第7集 抗 Scl-70 抗体」*medicina* 第42巻 第12号増刊号 426-427 (2005)

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

分担研究報告書

免疫疾患診断プロテイン・チップ開発用の自己抗体標準血清の確立に関する研究

分担研究者 諏訪 昭

東海大学医学部内科学系 助教授

研究要旨

膠原病患者 92 血清中の自己抗体を蛍光抗体法，酵素免疫抗体法（ELISA 法）および免疫沈降法（IPP 法）を用いて解析した．ELISA 法と IPP 法によって，抗 SS-A 抗体陽性 43 血清，抗 SS-B 抗体陽性 14 血清，抗 U1 RNP 抗体陽性 32 血清，抗 Sm 抗体陽性 6 血清を同定した．多くの血清が両検査法で陽性を示したが，一部の血清は検査法によって異なる反応性を示し，抗原エピトープの多様性が示唆された．つぎに ELISA 法によって，抗 dsDNA 抗体陽性 20 血清，抗セントロメア抗体陽性 9 血清，抗 Scl-70 抗体陽性 3 血清，抗カルジオリピン抗体陽性 11 血清，抗カルジオリピン・ β 2GPI 抗体陽性 1 血清，RF 陽性 19 血清を同定した．さらに，IPP 法によって，抗リボゾーム抗体陽性 3 血清，抗 7-2 RNP 抗体陽性 2 血清，抗 U1/U2 RNP 抗体陽性 1 血清，抗 Ku 抗体陽性 3 血清，抗 PCNA 抗体陽性 1 血清，抗 Mi-2 抗体陽性 1 血清を同定した．これらの自己抗体陽性血清が，免疫疾患診断プロテインチップの標準血清として有用なツールになる可能性が示唆された．

A. 研究目的

膠原病は原因不明の炎症性疾患で，自己細胞成分に対する多彩な自己抗体産生を特徴とする．これらの自己抗体は特定の臨床像と密接に関連し，診断や治療法の選択，予後推定など臨床的に有用であるばかりでなく，細胞内分子の構造と機能の解明にも役立つ．われわれはこれまでに，免疫沈降法（IPP 法）を用いた自己抗体検出法を開発し，本方法が感度と特異性に優れていることを明らかとてきた．本研究では，酵素免疫抗体法（ELISA 法）などの従来抗体測定法に加え，免疫沈降法を用いて，膠原病患者血清中の自己抗体を同定し，免疫学的特異性を明確にすることで，免疫診断プロテインチップ開発のための標準血清を確立することを目的とした．

B. 研究方法

1. 血清

慶應義塾大学病院を受診した膠原病患者 91 例（全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) 29 例, 原発性シェーグレン症候群 (primary sjogren' s syndrome; SjS) 24 例, 全身性硬化症 (systemic sclerosis; SSc) 13 例, 混合性結合組織病・膠原病重複症候群 (mixed connective tissue disease/overlap syndrome; MCTD/ OL) 9 例, 関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) (悪性関節リウマチ (malignant rheumatoid arthritis; MRA) を含む) 8 例, 多発性筋炎・皮膚筋炎 (polymyositis/dermatomyositis; PM/DM) 2 例, 血管炎症候群 2 例, 強直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis; AS) 1 例), 未分類膠原病 (unclassified connective tissue disease; UCTD) 3 例) と健常人 35 例より血清を得た.

(倫理面への配慮)

適切なインフォームド・コンセント, 身体的安全性とプライバシー保護への配慮を行い, 試料等提供者の尊厳および人権を尊重した. 研究への協力は任意であり, 同意後もいつでも撤回できること, 提供を拒否することにより不利益を被らないことを保証した. 本研究計画については, 独立行政法人理化学研究所および慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得た

2. 蛍光抗体法 (Fluorescent anti-nuclear antibodies; FANA)

フルオロ HEPANA テスト (MBL 社) により, HEp-2 細胞を基質とし, 血清中の抗体を蛍光抗体法で検出した.

3. RNA 免疫沈降法 (RNA-immunoprecipitation assay; RNA-IPP 法)

1) HeLa 細胞抽出物の作製と免疫沈降反応

IPP 法は, Lerner & Steiz の方法に準じた. HeLa 細胞 (6×10^6 個/1 検体) を回収後, HeLa 細胞を NET-2 バッファー (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5) に浮遊, 超音波破碎後その上清を細胞抽出物として使用した.

プロテイン A セファロース (Pharmacia 社) 3 mg に IPP バッファー (10mM Tris, pH 8.0, 500mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40) $500 \mu\text{l}$, 被験血清 $10 \mu\text{l}$ を加え, 室温で混和した. この IgG 結合セファロースに IPP バッファー $500 \mu\text{l}$ を添加した. IPP バッファーで洗浄後のセファロース粒子に, IPP バッファー $400 \mu\text{l}$ と HeLa 細胞抽出物 $100 \mu\text{l}$ を加え, 4°C で 2 時間混和した. 洗浄操作を 5 回繰り返した後, セファロース粒子に NET-2 バッファー $300 \mu\text{l}$, 20% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) $15 \mu\text{l}$, 3M 酢酸ナトリウム $30 \mu\text{l}$, フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (PCA) $300 \mu\text{l}$ を加え, 遠心した. 同時に全 RNA マーカーとして細胞抽出物 $10 \mu\text{l}$ をとり, 同様にフェノール抽出した. 水層を回収し, 冷却 100% エタノール $900 \mu\text{l}$ を加え, -20°C で核酸成分を沈降させた. その後遠心し, 上清を捨てた. 冷却 70% エタノール $300 \mu\text{l}$ で洗浄後, 乾燥させた.

2) 電気泳動および銀染色

核酸成分を 7M 尿素-ポリアクリルアミド電気泳動 (Urea-PAGE) で分画した。泳動後のゲルに 10%酸化反応液を加え、脱イオン水で洗浄後、10%硝酸銀水溶液を加えた。さらに洗浄後、現像液 (silver stain developer, BIO RAD 社) で核酸バンドを染色し、5%酢酸で反応を停止させた。この後ゲルを乾燥させた。

4. 蛋白免疫沈降法 (protein immunoprecipitation assay; P-IPP 法)

1) 標識 HeLa 細胞の抽出と免疫沈降反応

HeLa 細胞 (2×10^6 個/1 検体) をメチオニン除去 RPMI1640 (GIBCO 社) 培地に浮遊させ、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン (Tran- ^{35}S label, ICN 社) 18.5 MBq を加え、培養し標識した。細胞を回収後、IPP バッファーに浮遊させ、超音波破碎装置で破碎後、その上清を細胞抽出物として使用した。

RNA-IPP 法と同様に プロテイン A セファロース (Pharmacia 社) 3 mg に IPP バッファー $500 \mu\text{l}$, 被験血清 $10 \mu\text{l}$ を加え、室温で混和した。この IgG 結合セファロース粒子を遠心し、上清を捨て、IPP バッファー $500 \mu\text{l}$ を加え混和し、遠心した。この洗浄操作を 3 回繰り返した。洗浄後のセファロース粒子に IPP バッファー $400 \mu\text{l}$ と、標識 HeLa 細胞抽出物 $100 \mu\text{l}$ を加え、 4°C で 2 時間混和した。洗浄操作を 5 回繰り返した後、 $3 \times$ SDS サンプルバッファー (62.5mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール, 10% グリセロール, 0.005% ブロムフェノールブルー, pH 6.8) を $30 \mu\text{l}$ 加え、5 分間 100°C で加熱し、蛋白成分を抽出した。

2) 電気泳動およびオートラジオグラフィ

免疫沈降物中から抽出した蛋白成分を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、ゲルを乾燥させ、X 線フィルム (Kodak 社) に -70°C で 7 日間感光させ、現像した。

5. 固相化酵素免疫抗体法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA 法)

ELISA 法により各種自己抗体を定量的に測定した。抗 SS-A 抗体は MESACUP-2 テスト SS-A (MBL 社), 抗 SS-B 抗体は MESACUP-2 テスト SS-B (MBL 社), 抗 U1 RNP 抗体は MESACUP-2 テスト RNP (MBL 社), 抗 Sm 抗体は MESACUP-2 テスト Sm (MBL 社), 抗 Scl-70 (トポイソメラーゼ I) 抗体は MESACUP-2 テスト Scl-70 (MBL 社), 抗 dsDNA 抗体は MESACUP DNA-II テスト [ds] (MBL 社), 抗セントロメア抗体は MESACUP-2 テスト CENP-B (MBL 社), 抗カルジオリピン抗体は MESACUP カルジオリピンテスト (MBL 社), リウマトイド因子 (RF) は N ラテックス RF キット 2 (デイドベリング社) を測定用試薬として用いた。

また、抗 Jo-1 抗体はエスアールエル社に測定を依頼した (試薬は非売品)。抗セントロメア抗体は、MBL MESACUP-2 テスト CENP-B (MBL 社) を用い、抗カルジオリピン $\beta 2$ グリコプロテイン I (GPI) 抗体は、抗カルジオリピン $\beta 2$ GPI キット「ヤマサ」EIA (ヤマサ醤油) を用い、エスアールエル社に測定を依頼した。

C. 研究結果

ELISA 法と IPP 法によって同定された自己抗体を表 1 に示す. 抗 SS-A 抗体は, ELISA 法と IPP 法ともに陽性が 39 例, ELISA 法のみで陽性が 3 例, IPP 法のみで陽性が 1 例で, 計 43 例がいずれかの方法で陽性となった. 抗 SS-B 抗体は, ELISA 法と IPP 法ともに陽性が 7 例, ELISA 法のみで陽性が 6 例, IPP 法のみで陽性が 1 例で, 計 14 例がいずれかの方法で陽性となった. 抗 U1 RNP 抗体は, ELISA 法と IPP 法ともに陽性が 26 例, IPP 法のみで陽性が 6 例で, 計 32 例が陽性となった. ELISA 法のみでの陽性例はなかった. 抗 Sm 抗体は, ELISA 法と IPP 法ともに陽性が 4 例, ELISA 法のみで陽性が 2 例, 計 6 例が陽性となった. IPP 法のみでの陽性例はなかった.

ELISA 法によって同定された自己抗体を表 2 に示す. 抗 dsDNA 抗体は 20 例, 抗セントロメア抗体は 9 例, 抗 Scl-70 抗体は 3 例で陽性であった. 抗 Jo-1 抗体陽性例はなかった. 抗カルジオオリピン抗体は 11 例で陽性で, 抗カルジオオリピン β 2GPI 抗体は 1 例のみ陽性であった. RF 陽性は 19 例あった.

IPP 法によって同定された自己抗体を表 3 に示す. RNA-IPP 法では, 5S, 5.8S, 7SRNA の全てまたはいずれかを免疫沈降する自己抗体が 3 例で認められ, これらは抗リボゾーム抗体陽性と考えられた. 抗 7-2 RNP 抗体は 2 例に認められた. U1 RNA と同時に U2 RNA を免疫沈降する自己抗体が 1 例で認められ, これは抗 U1/U2 RNP 抗体陽性と考えられた. P-IPP 法で抗 Ku 抗体標準血清と同様に 70kDa 蛋白と 80kDa 蛋白を免疫沈降する自己抗体が 3 例で認められ, これらは抗 Ku 抗体陽性と考えられた. 1 例では, FANA による染色型が PCNA 様を示し, P-IPP 法で 37kDa 蛋白を免疫沈降する自己抗体が陽性で, これは抗 PCNA 抗体陽性と考えられた. また, 1 例では, P-IPP 法で抗 Mi-2 抗体標準血清と同様に 240kDa 蛋白を免疫沈降する自己抗体が陽性で, これは抗 Mi-2 抗体陽性と考えられた.

なお, いずれの方法によっても, 健常人血清中には自己抗体は検出されなかった.

表 1 ELISA と IPP によって同定された自己抗体

	ELISA(+) IPP(+)	ELISA(+) IPP(-)	ELISA(-) IPP(+)	計
抗 SS-A 抗体	39 例	3 例	1 例	43 例
抗 SS-B 抗体	7	6	1	14
抗 U1 RNP 抗体	26	0	6	32
抗 Sm 抗体	4	2	0	6

表2 ELISA 法によって同定された自己抗体

自己抗体	陽性数
抗 dsDNA 抗体	20 例
抗セントロメア抗体	9
抗 Scl-70 抗体	3
抗 Jo-1 抗体	0
抗カルジオリピン抗体	11
抗カルジオリピン・ β 2GPI 抗体	1
RF	19

表3 IPP 法によって同定された自己抗体

自己抗体	陽性数
RNA-IPP 法 抗リボゾーム抗体	3 例
抗 7-2 RNP 抗体	2
抗 U1/U2 RNP 抗体	1
P-IPP 法 抗 Ku 抗体	3
抗 PCNA 抗体	1
抗 Mi-2 抗体	1