

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業
(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～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 伊藤 嘉浩

平成 20 (2008) 年 4 月

目次

I. 総合研究報告	
免疫疾患診断用プロテイン・チップの開発に関する研究……………	3
伊藤 嘉浩	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	33
III. 研究成果の刊行物・別刷……………	41

I. 総合研究報告

総合研究報告書

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

第一部 自己免疫疾患における病態把握は、血清中に産生される自己抗体の測定が重要であり、間接蛍光抗体法および ELISA 法が従来の測定法として挙げられる。間接蛍光抗体法は、スライドガラス上に Hep2 細胞を固定化し、血清反応、続いて蛍光標識抗体の反応を行い、細胞の染色パターンによってどのような自己抗体が存在するか観測する方法であり、非常に感度がよいが、健常人での陽性率が高く、特異度が低いこと、施設内および施設外変動の存在などの問題点が指摘されている。さらに、この方法は操作が煩雑で、判定が目視のため客観性に乏しい上に、検査に習熟を必要とする。そこでこれらの欠点を改善するために、自己抗体に対する自己抗原をウェル上に固定化し、化学発光によって観測する ELISA 法が確立されたが、ひとつのウェル上に 1 種の抗原しか固定化することができないため、多数の抗体の解析に適さず、また測定できる抗原の種類も限られていた。そこで我々は、本研究室で開発した光固定化技術と抗原マイクロアレイを応用し、これら従来法にかわる新たな自己免疫疾患診断ツール開発を目指し、研究を行った。

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を行った。結果、従来法である ELISA 法との高い相関性を示し代替可能であることを明らかにするとともに、作製した診断チップの保存安定性が高いことを明らかにし、実用化できることを示した。このような診断チップの開発とともに、チップを装填し、血清の入った試験管を装填するだけで自動的に検査結果を表示できる自動化装置を開発し、多項目同時測定を可能とする臨床診断システムを構築した。また本システムをより臨床診断応用しやすいような多検体並行測定可能なシステムに改良し、最終的な成果として完成させた。

第二部 新たに開発したプロテインチップを用いて、自己免疫疾患の成因を探るために、(1) ペプチドレベルでの自己抗原反応性を解析する方法を模索し、(2) 多発性筋炎・皮膚筋炎 (PM/DM) の免疫診断に使われる抗 Jo-1 抗体について、チップによって疾患の早期発見と病態解明に役立つモデルを作ることを試みた。[方法] 従来法である ELISA で患者血清により自己抗原ペプチドとして認識されるペプチドをプロテインチップで解析した。一方で、骨格筋 C タンパクを用いて多発性筋炎のモデルマウスを開発し、そのマウスの血清中の自己抗体を解析した。さらに、マウスの抗 Jo-1 抗体の抗原であるヒスチジル tRNA 合成酵素 (Jo-1) タンパクを作成した。[結果] 従来法の ELISA においても peptide の固相化は容易ではないが、プロテインチップにおいてはさらに困難である。多発性筋炎モデルでは C タンパクの免疫で筋炎を惹起することが出来、抗核抗体が検出された。作成した組換え Jo-1 タンパクは可溶性でプロテインチップへの搭載が可能なレベルに精製できた。新しいマウスモデルとチップを用いて、Jo-1 抗体の関与を研究する展望が開けた。

第三部 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piteープの多様性が示唆された。つぎに多数の日本人膠原病患者血清を対象とし、抗 ribosome 抗体の免疫学的特異性と臨床的意義を追究した。RNA 免疫沈降法 (RNA-IPP 法) により膠原病血清をスクリーニングし、76 例の抗 ribosome 抗体陽性血清を得た。さらに免疫沈降物中の蛋白成分を分析した結果、抗 ribosomal P 抗体 31 例に加え、3 例の抗 L5/5S RNP 抗体陽

性血清を新たに見出した。抗 ribosomal P 抗体陽性例の臨床診断では、SLE が 15 例と最も高頻度であったが、シェーグレン症候群 5 例、亜急性皮膚ループス症候群 2 例、混合性結合組織病 2 例、全身性硬化症 2 例、抗リン脂質症候群 1 例、結節性多発動脈炎 1 例、リウマチ性多発筋痛症 1 例、関節リウマチ 1 例、未分類膠原病 1 例など他の膠原病にも低頻度ながら検出され、注目された。つぎに SLE 672 例を対象として抗 ribosomal P 抗体の有無により臨床特徴を比較検討したが、差はみられなかった。本研究において見出された抗 L5/5S RNP 抗体陽性例の臨床診断はいずれも SLE で、同抗体が SLE 診断に有用な新たな疾患特異自己抗体と考えられた。さらに、SLE 患者における抗ヒストン抗体とその対応抗原エпитープにつき追究した。ELISA による抗ヌクレオソーム抗体は SLE 123 血清中 112 血清が陽性（陽性率 91.1%）で、ヌクレオソームが主要な自己抗原であることが確認された。一方、SLE 患者血清中には抗 dsDNA 抗体も高頻度に検出され、抗ヌクレオソーム抗体との間に強い相関が認められた。さらに免疫プロットでヒストン各サブユニットに対する自己抗体を検討したところ、H1 と H2B に対する自己抗体が高率で、一部は H3 とともに反応したが、H2A および H4 との反応はまれであった。SLE モデルマウスにおいて抗ヒストン抗体の主要なエピトープとされた H1⁰₂₂₋₄₂ は、ヒト SLE 患者血清中の抗ヒストン抗体では認識されず、SLE 患者における T 細胞および B 細胞エピトープの解析が必要と考えられた。

本研究において得られ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。

分担研究者

上阪 等：東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 膠原病・リウマチ内科学 准教授
諏訪 昭：東海大学 医学部内科学系 リウマチ内科 准教授

第一部、第二部、第三部の順に、研究目的、研究方法、研究結果、考察を記載し、最後に結論、研究業績をまとめて記す。

第一部

A. 研究目的

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、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。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。本研究では、我々が開発した生体分子の光固定化技術および抗原マイクロアレイを応用し、細胞内外の分子に対する自己抗体を自己免疫疾患患者において解析することを目的としている。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が可能。
- 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、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应用可能なばかりでなく、病気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

・H17-H18 までの研究における自己免疫疾患診断チップの作製は以下に行った。

- 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%となるよう、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。

・ H19 の研究における自己免疫診断チップの作製は以下のように行った。

- 1) フェニルアジド基と分子量約 500 のポリエチレングリコール基を側鎖にもつメタクリル系ポリマーを光反応性マトリックスとし、終濃度 1% となるように調製した。
- 2) スピンコート(5000rpm×30sec)によってポリスチレンあるいは金属蒸着ガラス 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。
- 3) 0.09Mpa で 15 分間減圧乾燥した。
- 4) ブラックライトにて 7 分間 UV 照射した。
- 5) ビスアジドを抗原に対して 10% となるように混合し、抗原サンプルを調製した。
- 6) 調製した抗原サンプルをプレコートしたチップ上に DNA アレイヤーを用いてスポットした。
- 7) 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

・ 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%Tween20)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) 固定化した抗原に対応する抗体または血清 (各種自己抗体陽性血清、インフォームドコンセントのもとに頂いた患者血清 (リン酸緩衝液で 100 倍希釈) など)を一次反応溶液とし反応させた。
- 4) PBS(0.1%Tween20)でミキサーにて 3 分間洗浄した。
- 5) HRP labeled anti-rabbit IgG(GE healthcare 製、10%BSA 入り PBS にて 100 倍希釈) または HRP labeled anti-human IgG(Amersham 製、10%BSA 入り PBS にて 4000 倍希釈)を滴下し、ミキサーにて 20 分間反応した。
- 6) PBS(0.1%Tween20)でミキサーにて 3 分間洗浄した。
- 7) ECL Advance(GE healthcare 製)を用いて化学発光法による検出を行った。

表 1 今回の研究で使用した自己抗原

Autoantigen	Detected	Provider	Conc.(mg/ml)
Ro/SS-A (52kDa)	Anti SS-A antibody	DIARECT	1.25
Ro/SS-A (60kDa)	Anti SS-A antibody	DIARECT	1.25
SS-A	Anti SS-A antibody	MBL	1.0
SS-B/La	Anti SS-B antibody	Fitzgerald	1.0
U1snRNP (68kDa)	Anti U1RNP antibody	DIARECT	1.0
U1snRNA Protein B/B' (Smith antigen)	Anti Sm antibody	DIARECT	1.25
Sm	Anti Sm antibody	MBL	1.0
Topoisomerase I (Scl-70)	Anti Scl-70 antibody	Fitzgerald	1.0
dsDNA (Plasmid)	Anti dsDNA antibody	DIARECT	1.0
λ DNA	Anti dsDNA antibody	MBL	0.1-1.0
Centromere Protein B (CENP-B)	Anti Centromere antibody	DIARECT	1.0
Histidyl-tRNA Synthetase (Jo-1)	Anti Jo-1 antibody	DIARECT	1.0
Goat IgG	IgM-RF	SIGMA	0.25

・ Hep-2 細胞からの核画分の抽出は PIERCE 社製の抽出キットを用いてプロトコールに従って行った。

- 1) PBS にて 2 回洗浄を行い、回収した細胞 : 1.4×10^7 cells に CERI を加えた。
- 2) ボルテックスにて 15 秒間激しく攪拌した。
- 3) CERII を加え、5 秒間ボルテックスにて激しく攪拌を行い、その後氷中で 1 分間、インキュベートした。
- 4) ボルテックスにて 5 秒間、再度激しく攪拌し、15000rpm にて 5 分間遠心した。
- 5) 得られた上澄みを冷やしておいたチューブに移し、これを細胞質画分とした。
- 6) NER を加えて 15 秒間ボルテックスにて激しく攪拌、その後氷中で 10 分間、インキュベートした。これを 4 回繰り返す、その後 15000rpm にて 5 分間遠心した。
- 7) 得られた上澄みを冷やしておいたチューブに移した。これを核画分とし、 -80°C で保存した。

※CERI、CERII、NER にはあらかじめ protease inhibitor を加えておいた。

(倫理面への配慮)

患者血清は、慶應義塾大学倫理委員会での承認を経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を行った。

C. 研究結果

1. 自己免疫疾患診断チップの開発

複数種の自己抗原を固定化したチップについてまず評価結果の安定性評価を行った。結果、Cv 値 10%以下と高い再現性で測定結果が得られることを確認した。これを自己免疫疾患診断チップとして確立していくために以下の事項について取り組んだ。

- 1) 従来法との比較
- 2) 光固定化法の有用性
- 3) 保存安定性評価
- 4) 診断チップに伴う自動測定装置の開発

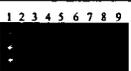
1-1. 従来法との比較

従来法との比較として、従来法の中でも評価結果が数値化されており、さらに検出方法がほぼ同じである ELISA 法の評価結果との相関を求めた。結果を表 2 に示す。自己免疫疾患に関与する 8 種の自己抗原について評価を行ったところ、すべてにおいて高い相関を得ることができた。

表 2 ELISA 法との相関性

Autoantigen	Detected	Correlation coefficient
SS-A	Anti SS-A antibody	0.94
SS-B/La	Anti SS-B antibody	0.92
U1snRNP68kDa	Anti U1RNP antibody	0.83
Sm	Anti Sm antibody	0.92
Scl-70	Anti Scl-70 antibody	0.97
dsDNA(Plasmid)	Anti dsDNA antibody	0.89
CENP-B	Anti Centromere antibody	0.97
IgG from goat serum	IgM-RF	0.85

図 1 では、評価した検体のうちいくつか例に挙げているが、ELISA の評価結果と、マイクロアレイチップの化学発光画像が一致しているのが確認できる。自己免疫疾患にはそれぞれ特異的な自己抗体が存在しており、それらの出現頻度および組み合わせにより病態を把握することができる。作製したマイクロアレイチップは、多項目同時測定が可能であるため、そのような点で臨床診断しやすいと考えられ、従来法にかわる新たな検査法となりうると考えられる。

Disease	Disease-specific autoantibody / Expression ratio	Serum No.	Result of ELISA	Image of assay using biochip
MCTD	Anti U1RNP antibody / 100%	13	Anti SS-A antibody: + Anti SS-B antibody: + Anti U1RNP antibody: +	
SSc	Anti Scl-70 antibody / 15-30% Anti Centromere antibody / 40-70%	42	Anti Centromere antibody: +	
SLE	Anti Sm antibody: 15-30% Anti dsDNA antibody: 40-70%	46	Anti SS-A antibody: + Anti U1RNP antibody: + Anti Sm antibody: + Anti dsDNA antibody: +	
SS	Anti SS-A antibody: 50-70% Anti SS-B antibody: 20-30%	4	Anti SS-A antibody: +	
		51	Anti SS-A antibody: + Anti SS-B antibody: +	

1. Ro/SS-A(52kDa) 4. U1snRNP68kDa 7. Jo-1
2. Ro/SS-A(60kDa) 5. U1snRNP B/B' 8. dsDNA
3. SS-B/La 6. Scl-70 9. CENP-B

図 1 自己免疫疾患診断チップによる診断例

1-2. 光固定化法の有用性

自己免疫疾患診断チップを従来法に代わる診断システムとして確立するために、本システムにおける光固定化法と、従来の固定化法として利用される物理吸着との比較を化学発光法に基づき行い、生体分子の固定化法として本システムの有用性を検討した。結果を図2に示す。

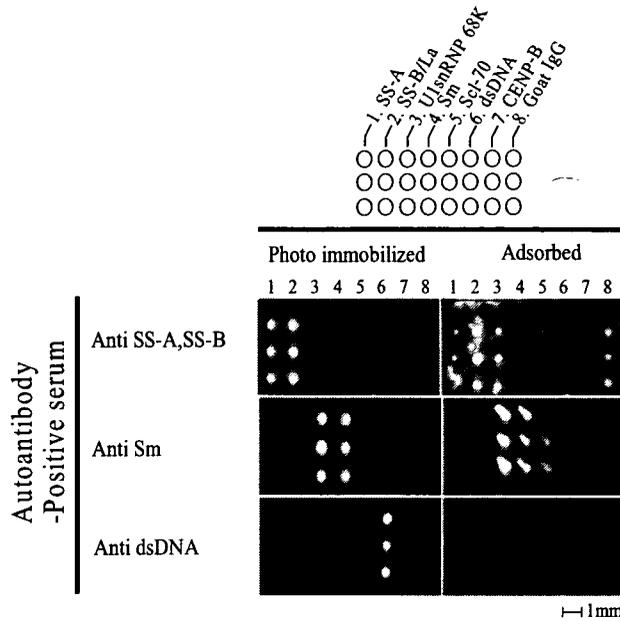


図2 光固定化法と物理吸着の比較

物理吸着では非特異的吸着を示す顕著なバックグラウンドおよびスポットの乱れが確認された。また抗 dsDNA 抗体陽性血清では抗体に依存したシグナルを検出することができなかった。一方、光固定化法は、各陽性血清に依存した発光強度が確認され、抗 dsDNA 抗体陽性血清でも、抗体結合を示す顕著な発光を確認することができた。また物理吸着の方で見られるスポットの乱れが見られなかった。

1-3. 保存安定性評価

保存温度を -20°C 、保存期間を3ヶ月間とし、抗 SS-A, SS-B 抗体、抗 Sm 抗体、抗 Centromere 抗体陽性血清を用いて、診断チップの保存安定性の評価を行った。結果を図3、図4に示す。結果、発光強度の顕著な変化は見られず、保存安定性を示すことができた。

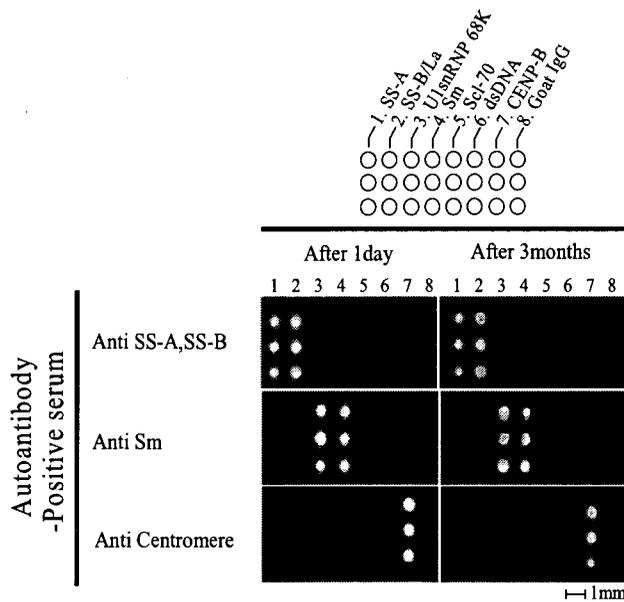


図3 保存安定性評価 (写真)

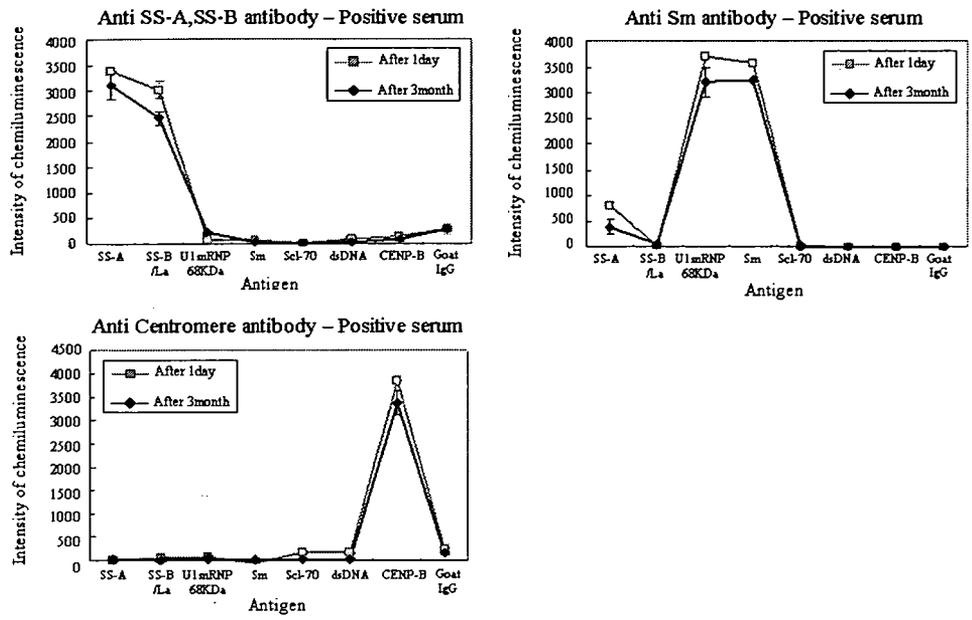


図4 保存安定性評価 (グラフ)

1-4. 診断チップに伴う自動測定装置の開発

診断チップの開発とともに抗原抗体反応とその検出を自動的に行う抗原抗体反応自動測定装置(以下、自動装置)を株式会社モリテックス社との共同で開発した。装置写真を図5に示す。

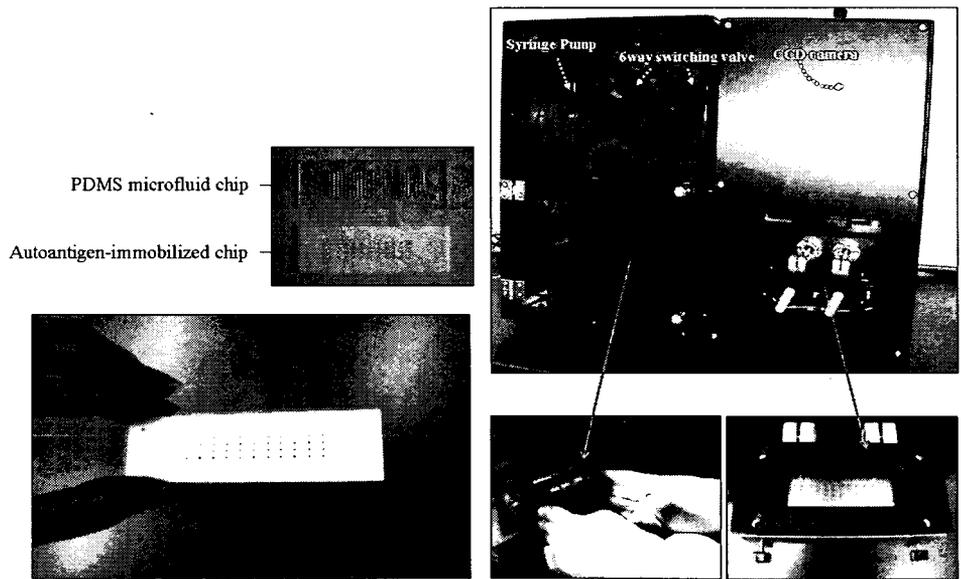


図5 抗原抗体反応自動測定装置

この装置は診断用チップをセットして、測定したい溶液をチューブ (試験管) に入れて装填するだけで自動的に測定データを得ることができるため、診断の効率化、簡便化を図ることができる。作製した自己免疫診断チップを用いて、実際に自動装置における血清評価が可能であるかどうかを検討した。結果を図6に示す。

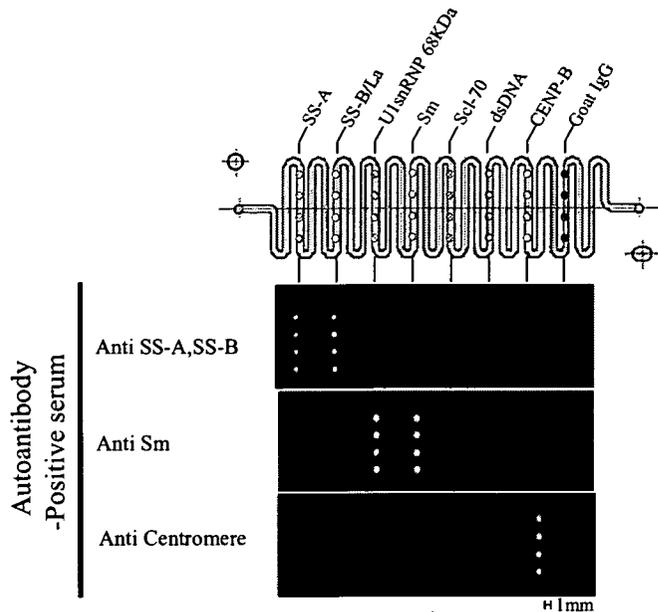


図6 抗原抗体反応自動測定装置による自己免疫疾患陽性血清中の自己抗体の検出

その結果、それぞれ陽性血清に依存した特異的な発光が認められ、自動装置で血清を使用する評価が可能であることが確認された。さらにこの自動装置について測定処理時間の短縮化を目的として検討を行い、検体の供給から、化学発光の撮影まで1検体30分以内で行うことができるようになり、装置による短期間での疾患診断も可能であることが示された。

2. 多項目多検体同時測定システムの構築

上述の通り、多項目同時測定を可能とするシステムを構築することができたが、医療分野で多く求められるのは、多検体を同時に測定する方法であり、構築した本システムではそれが難しい。そこでこのような背景をもとに、本システムをより臨床診断応用しやすいようなシステムに改良し、最終的な成果として完成させた。

2-1. スタンプタイプアレイヤーの導入

これまで全身性の自己免疫疾患を対象とし抗核抗体を中心とした検査項目を搭載して、評価を行ってきたが、さらに肝臓、甲状腺、腎臓など局所的な自己免疫疾患に関与する自己抗体も新たなコンテンツとして追加し、より多項目を同時に検査できる自己免疫疾患診断チップの確立を目指したい。そのためには、これまでよりも高密度にアレイデザインされたチップが要求されるが、これまで使用していたインクジェット式のマイクロアレイヤーでは難しいと考えられ、微小領域へのマイクロアレイを可能にし、より少ない試料から多くの情報が得られるように、スタンプタイプ(接触型で、DNAマイクロアレイに多用される)のアレイヤーを用いるようにした。この変更に伴い、抗原固定化量、スポット間隔等、これまでの診断チップの作成条件を見直し、新規アレイヤーでの最適化を図った。

その結果、サンプル濃度はインクジェットタイプよりも高い濃度が求められると考えられるが、新規アレイヤーによって2.5mm²に1~64スポットができるようになり、アレイの高密度化を図ることができた(図7)。

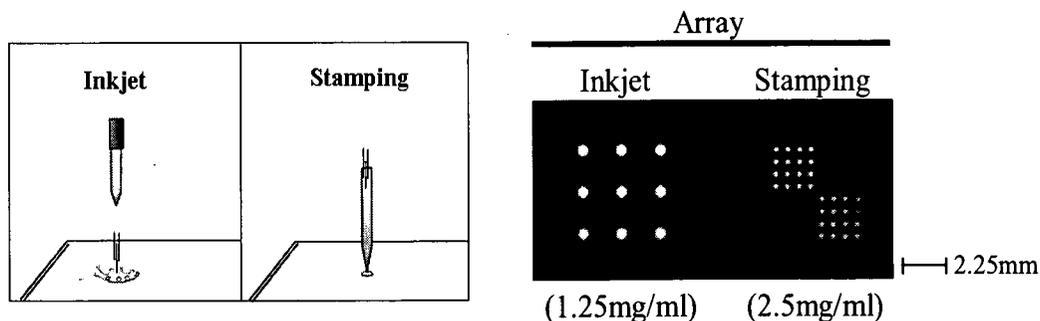


図7 インクジェットタイプとスタンプタイプの違い

2-2. 新規アレイヤーによる自己免疫診断チップの作製

新規アレイシステムによって自己免疫診断チップを作製できるかどうかを、λ DNA をマイクロアレイ固定化し、段階希釈した抗 dsDNA 抗体陽性血清を用いて評価を行った。結果を図 8 に示す。

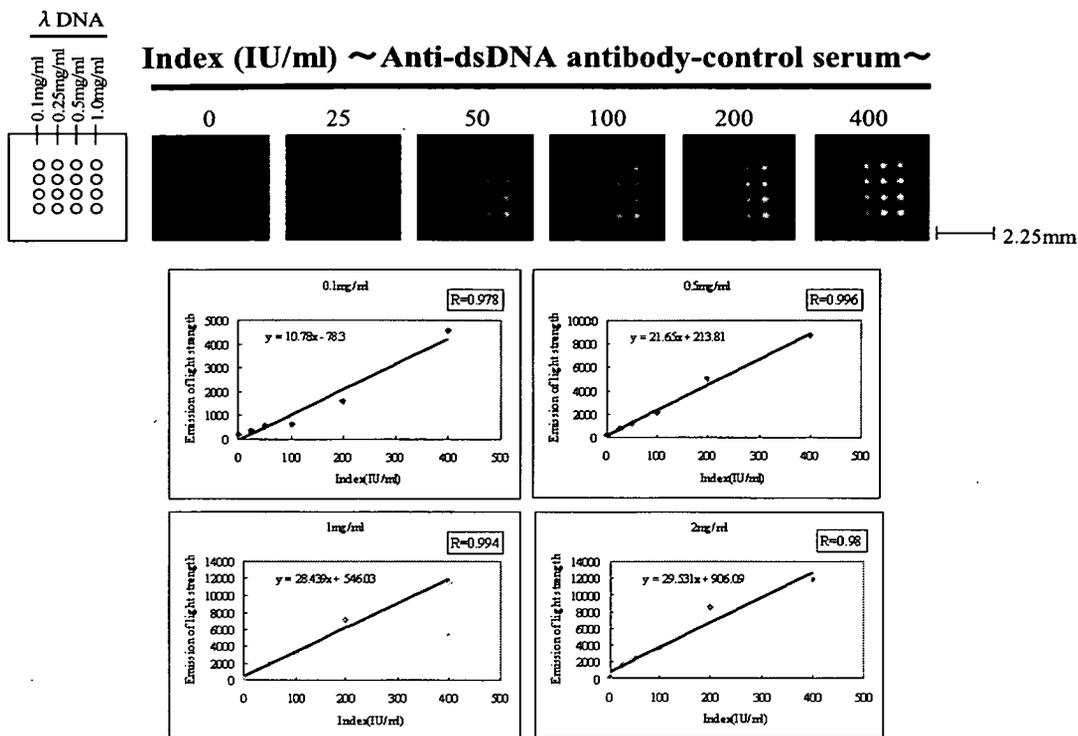


図 8 λ DNA を用いた抗 dsDNA 抗体検査

その結果、ELISA データとの高い相関を示し、および新規アレイシステムによる診断チップの作製が可能であることが示された。

2-3. マイクロアレイ・チップによる抗核抗体検査

自己抗体の検出ツールにおいて、いまだに顕微鏡により細胞の蛍光観察を行う手法（間接蛍光抗体法）がとられているスクリーニングの抗核抗体検査について、検査項目としてマイクロアレイ・チップに組み込むことを目的として、HEP-2 細胞より抽出した核画分溶液をマイクロアレイ固定化し、化学発光による測定を行った。その結果、各種血清に対応した結果が得られ、アレイ型検査でも測定可能であることがわかった。また異なる日に抽出した核画分溶液でも同様の結果が得られ、再現性を確認することができた（図 9）。

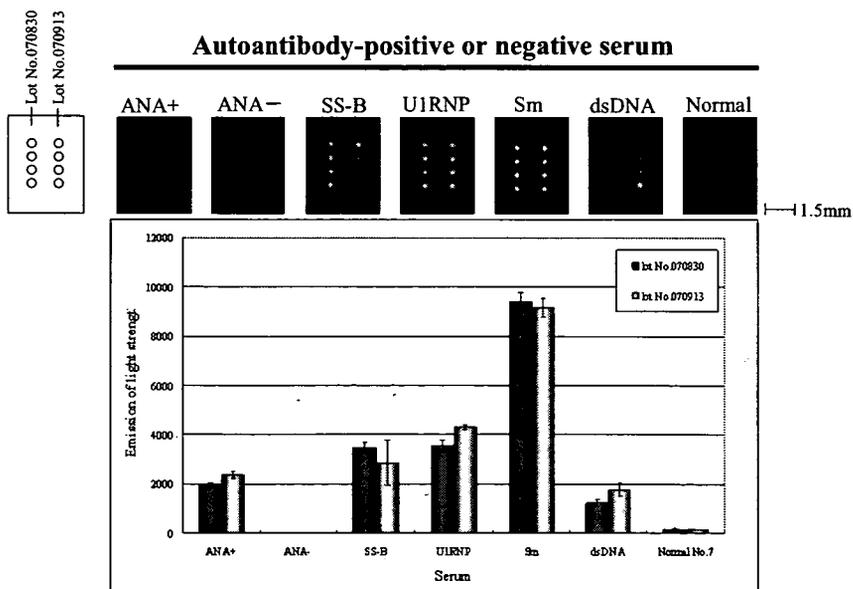


図 9 マイクロアレイによる抗核抗体検査

2-4. 金属基板の評価

これまでハイインパクトポリスチレン(HIPS)基板を使用してきたが、HIPSは材質上、加工時に反り、傷がつきやすく、また比較的しなるため、基板に接触させてアレイする新規アレイヤーではその特徴が欠点となり、評価に影響すると考えられる。このような材質上の問題がないのは金属基板と考えられ、性能としてもHIPSと同等の基板があれば代替基板となりうると考えられる。そこで、金属基板として金蒸着基板(Au)、クロム蒸着基板(Cr)を候補として考え、固定化サンプルとして λ DNAを用いて検討を行った。結果を図10に示す。その結果、Auではシグナルが非常に低かったのに対し、Cr基板は高いシグナルが示され、S/N比はHIPS基板と同等であった。の代替基板となりうることが示唆された。

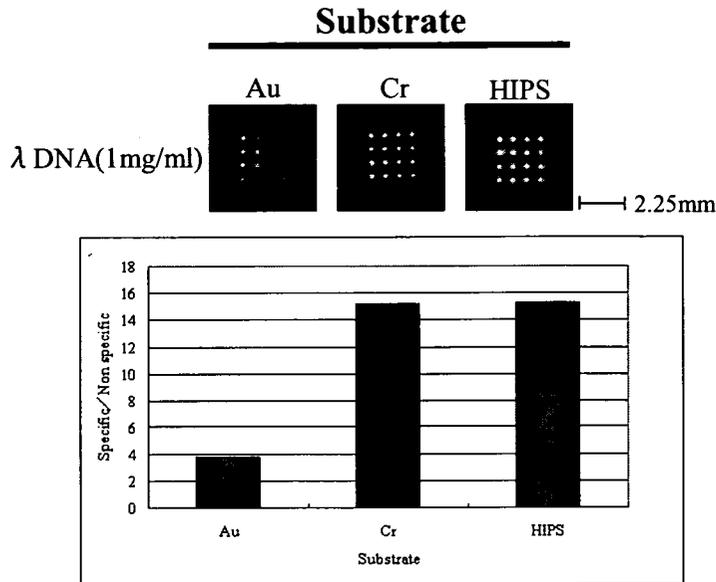


図10 金属基板の検討

2-5. 新規自動装置の開発

自己免疫疾患診断プロテインチップをより臨床診断に応用しやすくするためには、多項目多検体同時測定系へ改良することが重要である。これまで開発した多項目同時測定が可能なマイクロ流路デバイスは、一測定に40-50分を要し、複数検体の同時測定を行うためには、装置がさらに大型化かつ高価になってしまうという問題点があった。そこでマイクロプレートを用いたウェル型の開放系測定システムとすることにより、それが可能となるのではないかと考えた。装置の開発を株式会社モリテックスとの共同で行いとして完成させた(図11)。マイクロアレイ・チップにウェル(黄色)を載せ、自動化装置へ装填し(図12では手前)、装置内で血清サンプル滴下、洗浄、反応を経て化学発光を測定する。分注用のピペットチップを図7奥のように配し、サンプル分、洗浄液、および反応液分注のたびに交換できるようにした。最高48検体を並行して連続的に処理できるようにした。

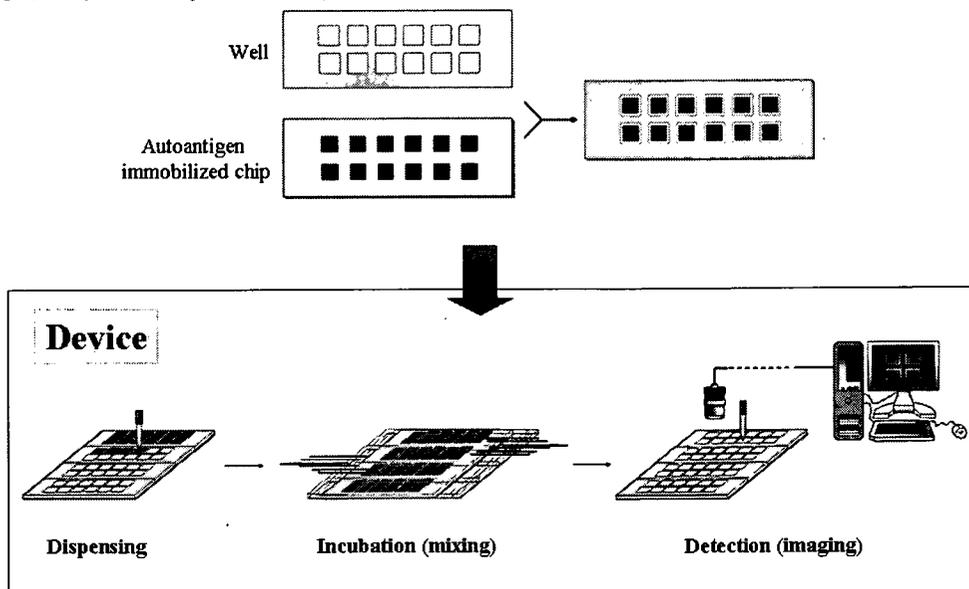


図11 新規自動装置の概要

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。

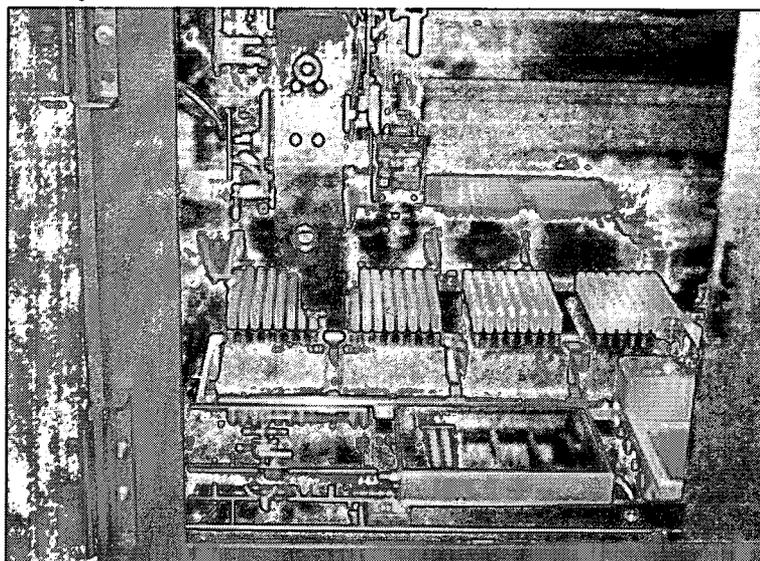


図12 本研究で開発したプロテイン・チップを用いて完全自動測定可能な装置の内部写真

そのため、同一チップ上で複数の自己抗体を検出することは臨床診断上、極めて重要であると考えられる。しかし、自己抗原はDNAから蛋白まで様々であり、同じ方法で同一チップ上へ複数種の自己抗原をマイクロアレイ固定化することは本質的に困難である。固定化する方法として疎水性相互作用である物理吸着という手段があるが、安定した診断結果が望めず、定量的な診断を行うことは難しいと考えられる。

そこで我々は、本研究室で開発した光固定化技術と抗原マイクロアレイを応用し、これら問題を解消した新たな自己免疫疾患診断ツール開発を目指し、研究を行ってきた。その結果、多項目同時測定チップおよびそれに伴う診断システムの構築を行うことができ、従来法にかわる検査システムとして確立した。しかし、多項目同時測定システムとして確立したものの、30分で一検体の測定では現在の臨床ニーズには対応できず、広く求められるのは多検体同時測定であった。そこで、より臨床応用しやすいように考えたのがマイクロプレートを応用したウェル型の開放系測定システムであったが、同時にスライドガラスサイズのチップ上での複数検体測定が要求された。これには従来使用していたインクジェットタイプのマイクロアレイヤーでは対応できなかったが、DNAアレイに広く用いられるスタンプタイプのアレイヤーを導入することでアレイの高密度化を図ることができ、また従来の抗核抗体を中心とした検査項目に加え新たな検査項目の追加が可能となり、最終的に検査の効率化に向けた基盤を作ることができた。

第二部

A. 研究目的

1. 膠原病各疾患の患者血清中には、その疾患特有な自己抗体群が検出される。そして、自己抗体によって認識されるペプチドも各疾患や患者の症状に関連性が高いことが多い。そこで、プロテインチップを応用しタンパクの代わりにペプチドを用いた自己抗原のペプチドチップの開発を試みる。症状・疾患特異的なエピトープを見つけることは、予後のある程度予測することや診断・治療に役立つと考えられる。
2. さらに、完成した免疫診断用チップを疾患の早期発見、病態解明に役立てるため、膠原病の一つである多発性筋炎(PM)のモデルマウスを開発し、その自己抗体のできる過程を経時的に明らかにする。さらに、PMに特徴的な自己抗体とされる抗ヒスチジルtRNA合成酵素/Jo-1自己抗体を能動免疫によって人為的に誘導し、筋炎との関連を探索する。に病態解析や、特異的治療法開発が遅れてき

た。我々は、新しく多発性筋炎のマウスモデルを確立し、自己免疫性筋炎の病態解析とともに、とくにサイトカインを標的とした、新たな治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. 自己抗原である U1RNP 70K タンパク、U1RNP A タンパク、U1RNP C タンパク、それぞれの common epitope peptide (70K ペプチド、A-1 ペプチド、A-2 ペプチド、C ペプチド)とポジティブコントロールの U1RNP protein、U1RNP 70K protein、U1RNP A protein、U1RNP C protein、ネガティブコントロールの CENP-B protein を抗原としてプレートにコーティングし、あらかじめ U1RNP タンパク抗原に対して陽性が確認されている患者血清と反応させた。血清のネガティブコントロールとしては、健常者血清、CENP-B 陽性血清を用いた。

また、今回用いた common epitope peptide は下段の通りで、多くの U1RNP タンパク抗原陽性の患者血清が反応することが確かめられていた。A-1 peptide, A-2 peptide は、同じ合成 peptide を用いた ELISA によって患者血清との反応性が確認されたもの、70K peptide, C peptide は、recombinant タンパクを用いた ELISA により患者血清との反応性が確認された配列である。

- ・70K ペプチド (配列 NYDTTESKLRREFEYVGPIK) : U1 RNP 陽性 MCTD 患者血清の多くが反応する
- ・A-1 ペプチド (配列 SQFGQILDILVSRSLKMRGQAFV) : U1 RNP 陽性 MCTD 患者血清の 94%が反応する
- ・A-2 ペプチド (配列 AGAARDALQGFKITQNNAMKISFAKK) : 同様に反応性が高い
- ・C ペプチド (配列 MMPMMGPPPPGMMPVGPAPKK) : SLE、MCTD の U1RNP 陽性患者でも反応あり、反応なしのものが混在していた。

2. 2-1. ヒトまたはマウス骨格筋 C 蛋白フラグメント誘導性関節炎の樹立

ヒトまたはマウス骨格筋 C 蛋白フラグメントを遺伝子組み換え技術を用いてタンパク発現ベクター pQE-30 に挿入し、大腸菌内で発現させて精製した。このタンパクと Complete Freund's Adjuvant (CFA)と混合してアジュバントを作成、B6 マウスの背部と足底に 1 回皮内注射するとともに、百日咳毒素 (PT)を腹腔内投与した。このマウスの大腿筋について組織学的解析にて筋炎評価を行い、筋力低下も評価した。筋炎筋組織は、浸潤炎症性細胞の免疫組織学的検討も行った。血清中の自己抗体を HEp-2 細胞を基質として解析した。

2-2. 組換えマウス Jo-1 タンパクの作成と抗体誘導

pQE-30ベクターに、マウス Jo-1DNA を挿入し、大腸菌内で Jo-1 タンパクを発現誘導させた。これらは不溶画分にあるため、細胞膜破碎後、得られた上清を Ni-NTA gel を充填したカラムに通し精製を行った。その後エンドトキシン処理を施し、PBS を用いて段階的に尿素バッファの濃度を希釈しながら約 48 時間リフォールディングを行った。ブロードフォード法にてタンパク濃度及び収量を測定し、再生セルロース膜 3.000MWC0 のスピニングカラムで目的濃度 1mg/ml までタンパクを濃縮した。完成したタンパクを SDS-PAGE 及び銀染色を行い、分子量を確認した。また、多発性筋炎患者より採取した血清、抗 6xHis 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。さらに、この精製マウス Jo-1 を CFA と混合してマウスに免疫した。

C. 研究結果

1. U1RNP C common epitope peptide に関しては患者血清において強い反応がみられた。しかし、同じペプチドを固相化したプロテインチップを用いた解析では、ELISA において反応性が強かった患者血清でも反応性が低かった。その他の自己抗原の common epitope peptide に関しても、反応性が非常に低かった。

2. C 蛋白フラグメントを免疫し、21 日目に、筋組織を HE 染色で組織学的に評価したところ、筋束周囲の結合織である perimysium、perivascular area に比較して、筋束内の結合織である endomysium 優位に単核球の浸潤を認めた。また、PM 同様、未壊死筋線維への単核球の invasion の像が認められ、その大部分は CD8 陽性であった。さらに、Rotarod test で有意に走行時間の短縮を認めた。経時的な組織学的解析では、7 日目から筋組織への単核球浸潤を認め、14-21 日目をピークに軽快し、49 日目には筋炎はほぼ治癒した。

次に、免疫組織学的解析で、CD4、CD8 陽性細胞、マクロファージ、B 細胞の局在を検討した。CD4 陽性細胞は筋肉全体に局在していたのに対して、CD8 陽性細胞は endomysium に相対的に多く浸潤していた。マクロファージは各部位で最も多く浸潤しており、B 細胞は少数のみ浸潤していた。また、大部分のパーフォリン陽性細胞は、CD8 陽性細胞同様、endomysium の未壊死筋線維周囲に浸潤していた。抗核抗体は、免疫後 28 日では、抗細胞質抗体が、免疫 49 日後では抗核抗体が認められた (図 13)。

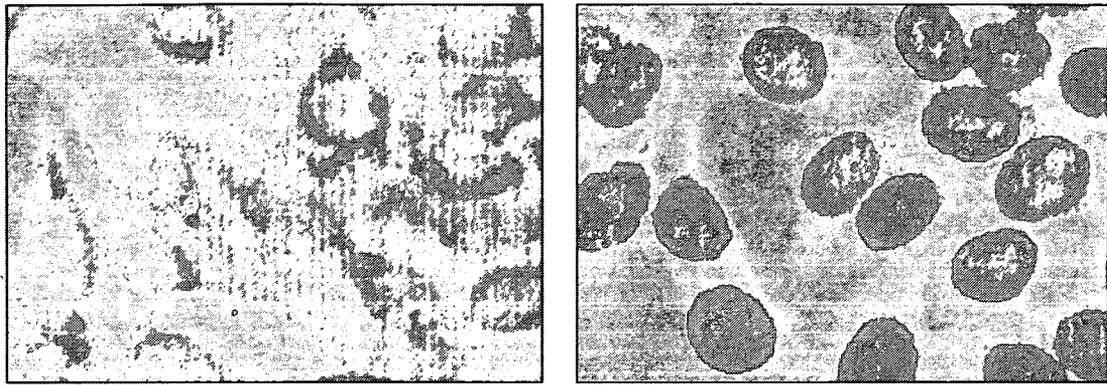


図 13 抗核抗体 実験筋炎誘導のための免疫後 28 日目と 49 日目のマウス血清中の自己抗体

また、組換えマウスJo-1タンパクをSDS-PAGEで展開して、Coomassie blueでcDNAから推測されると同じ分子量60kDa付近に染色されるタンパクが認められた。このタンパクを抗Jo-1抗体陽性の多発性筋炎患者血清で染色したところ、組換えタンパクが特異的に染色された。現在、この抗原をマウスに免疫している。

D. 考察

1. 少なくともU1RNP Cペプチドに関してはプロテインチップを用いた実験では陰性だった血清の一部がELISAでは陽性を示した。これらの結果から、今回用いた患者血清はU1RNP Cペプチドの配列を認識する自己抗体を含んでいると確認できた。従来法であるELISAにおいてもペプチドの固相化は容易ではないが、プロテインチップにおいては、タンパクの代わりにペプチドを固相化することが、さらに困難であると考えられる。
2. プロテインチップを使う応用研究の基盤として、自己抗体を血清中に産生する多発性筋炎のマウスモデルを作ることに成功した。この抗体の性格付けに重要となる組換えJo-1抗原の精製にも成功し、プロテインチップ搭載が可能となった。今後、Jo1抗原の免疫によって得られる自己抗体と、モデル動物の作る自己抗体についてチップでの解析を進めることにより、両者のエピトープの差、疾患発症と抗体産生の関連などが解析できる。

第三部

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にしてきた。本研究では、酵素免疫抗体法（ELISA法）などの従来の抗体測定法に加え、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. 試料

1-1. 基本的な自己抗体測定のための標準血清

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。

1-2. 抗 ribosome 抗体測定のための標準血清

1993年から2002年3月までに自己抗体測定の依頼があった慶應義塾大学病院および関連施設の膠原病患者のうち、6,870例と健常人60例を対象とした。各種自己抗体の標準血清は、教室で既報の方法によりその特異性を確認し、保存している血清を用いた。抗 L5/5S RNP 抗体の標準血清 (PF 血清) は、米国 Yale 大学 Craft 博士 より供与された。

1-3. 抗ヒストン抗体測定のための標準血清

1993年から2002年3月までに慶應義塾大学病院内科を受診した SLE 患者 123 例および DLE 患者 1 例の保存血清を用いた。米国 Albrecht Einstein 医科大学 Hardin 博士より供与されたヒトヒストン H1⁰ のアミノ酸 22-42 番目 (STDHPKYSDMIVAAIQAEKNR) 由来の合成ペプチド H1⁰₂₂₋₄₂ を免疫して得たマウスモノクローナル抗体 (C34) を、抗ヒストン H1⁰ 抗体の標準血清として用いた。SLE の診断は、米国リウマチ学会分類基準 (1982 年改訂, 1997 年小改訂) に従った。

1-4. ヒストン蛋白

既報の方法で精製され、Hardin 博士より供与されたヒストン蛋白を用いた。

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)

3-1. 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 (6×10⁶ 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 μl、被験血清 10 μl 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 μl 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 μl と HeLa 細胞抽出物 100 μl を加え、4℃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 μl、20% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 15 μl、3M 酢酸ナトリウム 30 μl、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (PCA) 300 μl 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 μl 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 μl を加え、-20℃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 μl で洗浄後、乾燥させた。

3-2. 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)

4-1. 標識 HeLa 細胞の抽出と免疫沈降反応

HeLa 細胞 (2×10⁶ 個/1 検体) をメチオニン除去 RPMI1640 (GIBCO 社) 培地に浮遊させ、^[35S]メチオニン (Tran-³⁵S 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 μl、被験血清 10 μl 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 μl 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 μl と、標識 HeLa 細胞抽出物 100 μl を加え、4℃で 2 時間混和した。洗浄操作を 5 回繰り返した後、3×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 μl 加え、5 分間 100℃で加熱し、蛋白成分を抽出した。

4-2. 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℃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)

5-1. 基本的な自己抗体の測定

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 (デイドベーリング社) 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 β 2 グリコプロテイン I (GPI) 抗体は、抗カルジオリピン β 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。

5-2. 抗ヌクレオソーム抗体の測定

抗ヌクレオソーム抗体は、Blue WELL NUCLEOSOME IgG Elisa キット (MBL 社) を用い、ELISA 法により行った。ヌクレオソームを固相化した ELISA プレートと 1:51 倍に希釈した血清を、室温で 30 分間反応させた。3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒト IgG モノクロナール抗体と室温で 30 分間反応させた。3 回洗浄後、テトラメチルベンチジン/過酸化水素水 (TMB/H₂O₂) を加え、室温で 10 分間反応させた。自動分光高度計 (BIO-RAD 社, Model 650) にて波長 450nm の吸光度 (OD 450) を測定した。判定にあたっては抗ヌクレオソーム抗体標準血清を用いた標準曲線により測定結果を標準化した。抗ヌクレオソーム抗体標準血清 S25 (25 U/ml) の示す OD 450 に 0.9 を乗じた値以下を示すものを陰性とした。

抗二本鎖 DNA 抗体 (抗 dsDNA 抗体) の測定

抗 dsDNA 抗体は、MESACUP DNA-II テスト「ds」Elisa キット (MBL 社) を用い、ELISA 法により行った。 λ ファージ由来の dsDNA を固相化した ELISA プレートと 1:101 倍に希釈した血清を、室温で 1 時間反応させた。4 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒト γ 鎖モノクロナール抗体と室温で 1 時間反応させた。4 回洗浄後、TMB/H₂O₂ を加え、室温で 30 分間反応させた。自動分光高度計にて、OD 450 を測定した。判定にあたっては、WHO First international standard, 1985 (WO/80) に準拠したヒト標準血清を用い、測定結果を Index 値に換算した。12.0 IU/ml 以下を示すものを陰性とした。

5-3. 抗ヒストン H1⁰ 抗体の測定

ヒトヒストン H1⁰ のアミノ酸 22-42 番目 (STDHPKYSMDMIVAAIQAEKNR) 由来のペプチド H1⁰₂₂₋₄₂ を抗原とした ELISA で抗ヒストン H1⁰ 抗体を測定した⁵⁾。すなわち、抗原をトリス緩衝液 (TBS, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.2) により 10 μ g/ml の濃度で希釈し、ELISA プレート (DYNATEC 社 IMMULON) に 4°C、14 時間反応させ、固相化した。ELISA 洗浄液 (0.1% Tween 20/TBS) にて 3 回洗浄後、1% ウシ血清アルブミン (BSA) /TBS と 4°C で 14 時間反応させた。3 回洗浄後、血清を 1% BSA/TBS で 1:200-6,400 倍に希釈し、室温で 2 時間反応させた。洗浄後、1:4,000 倍希釈したアルカリホスファターゼ (ALP) 標識抗マウス IgG モノクロナール抗体 (Promega 社) と、室温で 2 時間反応させた。3 回洗浄後、パラニトロフェニルリン酸 (PNPP, Sigma Aldrich 社) を 1mg/ml で溶解したジエタノールアミン酵素基質液 (pH9.8) と反応させた。自動分光高度計 (BIO-RAD 社, Model 650) にて、波長 405nm の吸光度 (OD 405) を測定した。

6. 免疫ブロット法 (Immunoblots)

免疫ブロット法は Towbin らの方法に準じた。すなわち、SDS-PAGE で分画した蛋白をニトロセルロース膜 (BA-85, Schleicher & Schuell 社) に転写、5% スキムミルク溶液でブロック後、200 倍希釈患者血清を一次抗体として、4°C で 1 時間反応させた。洗浄後、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG (Promega 社) を二次抗体 (1:5000 倍希釈) として、4°C で 1 時間反応させた。再度洗浄後、NBT/BCIP 発色反応により抗体を検出した。

7. 臨床的特徴の分析

自己抗体陽性患者についてその臨床的特徴を分析した。

(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、慶應義塾大学医学部および東海大学医学部倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 自己抗体特異性の解析と標準血清の確立

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U1RNP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。抗カルジオリピン抗体は11例で陽性で、抗カルジオリピンβ2GPI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5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、これらは抗リボソーム抗体陽性と考えられた。抗7-2RNP抗体は2例に認められた。U1RNAと同時にU2RNAを免疫沈降する自己抗体が1例で認められ、これは抗U1/U2RNP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3 ELISAとIPPによって同定された自己抗体

	ELISA(+)	ELISA(+)	ELISA(-)	計
	IPP(+)	IPP(-)	IPP(+)	
抗SS-A抗体	39例	3例	1例	43例
抗SS-B抗体	7	6	1	14
抗U1RNP抗体	26	0	6	32
抗Sm抗体	4	2	0	6

表4 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β2GPI抗体	1
RF	19

表5 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	
抗リボソーム抗体	3例
抗7-2RNP抗体	2
抗U1/U2RNP抗体	1
P-IPP法	
抗Ku抗体	3
抗PCNA抗体	1
抗Mi-2抗体	1

2. 抗 ribosome 抗体特異性の解析と標準血清の確立

2-1. RNA-IPP 法による抗 ribosome 抗体の検出

膠原病患者血清 6,870 例を対象として RNA-IPP 法により、自己抗体の検索を行った。一部の血清は 5.8S RNA または 5S RNA を免疫沈降し、これらの患者血清中には、リボソーム上の蛋白-核酸複合体に対する自己抗体 (抗 ribosome 抗体) が含まれると考えられた (図 14)。

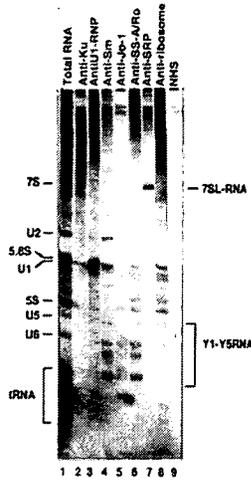


図 14 RNA-IPP法による抗ribosome抗体の認識する核酸成分の分析

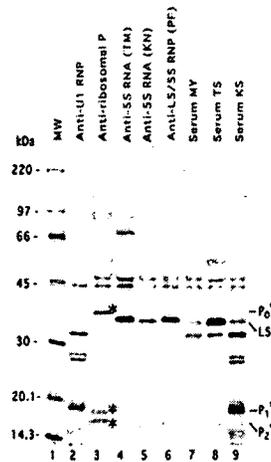


図 15 P-IPP法による抗ribosome抗体の認識する蛋白成分の分析

2-2. P-IPP 法による抗 ribosome 抗体の検出

RNA-IPP 法により抗 ribosome 抗体陽性とした 76 患者血清が免疫沈降する蛋白成分を P-IPP 法により分析した。代表例の SDS-PAGE の成績を図 15 に示す。抗 ribosomal P 抗体陽性血清は、P0 (37 kDa)、P1 (19 kDa)、P2 蛋白 (17 kDa) を免疫沈降した (レーン 3)。また 3 血清 (MY, TS, KS) は、34 kDa 蛋白を免疫沈降した (レーン 7-9)。この 34 kDa 蛋白は免疫プロット法で抗 L5/5S RNP 抗体標準血清 (PF) により認識され、これら 3 血清中には抗 L5/5S RNP 抗体が存在すると考えられた。(図は省略)

2-3. 抗 ribosome 抗体の特異性の検討

抗 ribosome 抗体陽性患者血清 76 例中の自己抗体を P-IPP 法により検討した成績のまとめを表 6 に示す。抗 ribosomal P 抗体が 31 例と最も多く検出された。抗 L5/5S RNP 抗体は 3 例に検出された。その他の自己抗体の中では、抗 U1 RNP 抗体が 19 例と最も多く、ついで抗 SS-A/Ro 抗体 12 例、抗 RNA helicase A 抗体 12 例が検出された。陽性患者数は少ないものの、抗 Ku 抗体、抗 Sm 抗体、抗 PL-7 抗体、抗 SRP 抗体も一部の血清で認められた。また、分子量約 200 kDa 蛋白、100 kDa 蛋白、75 kDa 蛋白、70 kDa 蛋白を免疫沈降する患者血清がみられ、これらの蛋白を対応抗原とする未同定の自己抗体の存在が示唆された。一方で、いずれの蛋白成分も免疫沈降しない血清も 8 例みられた。

2-4. 抗 ribosomal P 抗体の臨床的意義の検討

抗 ribosome 抗体陽性例のうち 31 例と最も多く認められた抗 ribosomal P 抗体についてその臨床的意義を検討した。抗 ribosomal P 抗体陽性例の臨床診断は SLE が 15 例と、約半数を示した。一方で、これまでの報告とは異なり、同抗体は SjS 5 例、亜急性皮膚ループス症候群 (SCLE) 2 例、混合性結合組織病 (MCTD) 2 例、全身性硬化症 (SSc) 2 例、結節性多発動脈炎 (PN) 1 例、リウマチ性多発筋痛症 (PMR) 1 例、抗リン脂質症候群 (APS) 1 例、関節リウマチ (RA) 1 例、未分類膠原病 (UCTD) 1 例にも検出された (表 7)。次に、教室の SLE 患者 672 例について、抗 ribosomal P 抗体陽性 SLE 患者 15 例について同抗体陰性 SLE 患者 657 例とその臨床特徴を比較した (表 8)。中枢神経病変は抗 ribosomal P 抗体陽性例の 33.3% に認められたが、一方で、陰性例にも 26.6% に認められ、その出現頻度に差は認められなかった。血液病変は、同抗体陽性例の全例に認められたが (白血球減少 66.7%、リンパ球減少 66.7%、血小板減少 53.3%、貧血 20%)、これは陰性例の 85.4% と比較して差はなかった。

表6 抗ribosome抗体陽性患者血清中の自己抗体

自己抗体	陽性患者数
抗ribosomal P抗体	31
抗L5/5S RNP抗体	3
抗U1 RNP抗体	19
抗SS-A/Ro抗体	12
抗RNA helicase A抗体	12
抗Ku抗体	5
抗Sm抗体	3
抗PL-12抗体	1
抗SRP抗体	1
未同定自己抗体 (対応抗原蛋白)	32
200kDa	3
100kDa	8
75kDa	3
70kDa	10
その他の蛋白	8
自己抗体陰性	8

表7 抗ribosomal P抗体陽性患者の臨床診断

診断	陽性患者数
全身性エリテマトーデス (SLE)	15
シェーフレン症候群 (SjS)	5
亜急性皮膚ループス症候群 (SCLE)	2
混合性結合組織病 (MCTD)	2
全身性硬化症 (SSc)	2
結節性多発動脈炎 (PN)	1
リウマチ性多発筋痛症 (PMR)	1
抗リン脂質症候群 (APS)	1
関節リウマチ (RA)	1
未分類膠原病 (UCTD)	1
計	31

表8 抗ribosomal P抗体陽性SLEの臨床特徴

臨床特徴	抗ribosomal P抗体	
	陽性 (N=15)	陰性 (N=657)
女性	73.3 (%)	91.2 (%)
発熱	80.0	76.9
リンパ節腫脹	40.0	37.8
顔面紅斑	46.7	67.0
Discoid疹	13.3	19.2
口腔内潰瘍	13.3	15.3
脱毛	13.3	28.9
光線過敏症	26.7	21.8
レイノー現象	40.0	49.7
関節病変	93.3	84.4
筋病変	13.3	34.4
腎病変	40.0	52.8
肺・胸膜病変	13.3	26.0
心病変	6.7	10.8
中枢神経病変	33.3	26.6
消化器病変	6.7	25.4
血液病変	100	85.4
低補体血症	73.3	58.9
梅毒血清反応生物学的偽陽性	20.0	17.9
自己抗体	76.9	61.9
抗dsDNA抗体	23.1	49.7
抗U1 RNP抗体	23.1	26.7
抗Sm抗体	23.1	53.6
抗SS-A/Ro抗体	0	12.1
抗SS-B/La抗体		

2-5. 抗L5/5S RNP抗体の臨床的意義の検討

抗L5/5S RNP抗体陽性3例の臨床特徴につき検討した(表9)。臨床診断は全例SLEであった。性別では、2例が男性で他の1例は女性であった。3例に共通して、顔面紅斑、レイノー現象、低補体血症の所見が認められた。腎症状は2例に認められ、腎生検で1例はループス腎炎WHO分類II型(focal segmental glomerulonephritis, no wire loop lesion)と診断され、他の1例はWHO分類IVb型(diffuse proliferative glomerulonephritis)と診断された。抗核抗体は3例とも陽性で、その染色型は1例が核小体型を示し、2例が均質型と斑紋型の両方を示した。抗細胞質抗体はいずれも陰性であった。