

〈原著〉

## 抗ヒツジ赤血球膜抗体測定法の作製と自己免疫疾患への応用

宮川 朱美<sup>1)</sup>、天川 雅夫<sup>2)</sup>、加藤 亮二<sup>2)</sup>、立石 謹也<sup>2)</sup>、横田 嘉弘<sup>3)</sup>

### Measurement of anti-sheep red blood cell membrane antibodies and application to autoimmune disease

Akemi Miyagawa<sup>1)</sup>, Masao Amakawa<sup>2)</sup>, Ryoji Kato<sup>2)</sup>,  
Kinya Tateishi<sup>2)</sup> and Yoshihiro Yokota<sup>3)</sup>

**Summary** While an anti-sheep red blood cell membrane antibody is able to reveal infectious mononucleosis, rheumatoid arthritis and viral hepatitis are also often detected. We combined the simple agglutination method and ELISA to produce a sheep red blood cell membrane antigen, and searched for the significance of the antibody in various autoimmune diseases.

As a result, systemic lupus erythematosus (SLE) showed a highly positive percentage by both methods. In addition, the antibody titer of the agglutination method tended to show a negative correlation with C4, and was assumed to be effective also to understand SLE. This method provided a possible tool for the screening examination for SLE.

**Key words:** Autoimmune disease, Anti-sheep red blood cell membrane antibody, SLE

#### I. 諸言

血中の異好抗体は動物血球を使用した免疫学的測定法をしばしば妨害する抗体として知られ、特にヒツジ赤血球に対する抗体はEBウイルス感染症診断のための伝染性単核症検査で検出される<sup>1),2)</sup>。このヒツジ赤血球に対する抗体はウイルス性肝炎、関節リウマチ、白血病で陽性を示すことが

あり<sup>1)</sup>、自己免疫疾患等で出現する様々な自己抗体<sup>3),4)</sup>との関連が興味深いと考えられている。

そこで、自己免疫疾患および感染症等におけるこの抗体の陽性率を調べるために、ヒツジ赤血球から膜抗原を精製後、これを用いた新たな酵素標識免疫測定法 (ELISA法) を構築し、自家製ホルマリン固定ヒツジ赤血球凝集法と合わせて臨床的意義を検索した。

<sup>1)</sup>キナシ大林病院 検査科

〒761-8024 香川県高松市鬼無町藤井435-1

<sup>2)</sup>香川県立保健医療大学 臨床検査学科

〒761-0123 香川県高松市牟礼町大字原281-1

<sup>3)</sup>宇多津浜クリニック 検査科

〒769-0205 香川県綾歌郡宇多津町浜五番町66-1

受領日 平成20年4月24日

受理日 平成20年9月8日

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, Kinashi Obayashi Hospital, 435-1 Fujii, Kinashi-cho, Takamatsu, Kagawa 761-8024, Japan

<sup>2)</sup>Kagawa Prefectural College of Health Sciences, 281-1 Hara, Mure-cho, Takamatsu, Kagawa 761-0123, Japan

<sup>3)</sup>Department of Clinical Laboratory, Utazuha Clinic, 66-1 Hama-5 ban-cho, Utazu-cho, Ayauta-gun, Kagawa 769-0205, Japan

## II. 対象および方法

### 1. 対象

キナシ大林病院で診断が確定した120例（肝炎ウイルス等感染症40例、甲状腺疾患40例、糖尿病40例）の患者血清、および、宇多津浜クリニックから供与された自己免疫疾患54例（全身性エリテマトーデス；以下SLE 16例、関節リウマチ31例、その他自己免疫疾患7例）の患者血清と、キナシ大林病院において人間ドック受診者のうち、生化学的検査結果および問診等から健常者として認められた24例を対照血清として使用した。これらの血清は、すべて患者から同意があったものを使用した。

### 2. 方法

#### 1)ELISA法の確立

##### (1) ヒツジ赤血球膜抗原の抽出と精製

ヒツジ血球を上清が透明になるまで生理食塩水（以下生食）で洗浄後、超純水で溶血させた。その溶血液を100,000g 30分間遠心後、沈渣を収集し、その沈渣が白っぽくなるまで0.06Mリン酸緩衝液（0.9%NaCl pH7.2；以下PBS）で同様に遠心洗浄した。沈渣に75%エタノールまたは0.1%トライトンXを少量加えて可溶化させ、遠心後、上清をヒツジ赤血球膜抽出抗原とした。この抽出抗原のタンパク濃度は紫外部280 nmで

測定した（図1）。

##### (2) ELISA法の構築

ヒツジ赤血球膜抽出抗原を96穴マイクロプレートに1  $\mu$ g/wellの濃度で固相化し、ブロッキングは1%ウシ胎児血清（以下FCS）を用いて実施した。このプレートにPBSで20倍希釈した患者血清100  $\mu$ Lを加えて室温で30分間反応させ、洗浄後、10,000倍した抗ヒトIgM標識抗体（Dako Cytomation社）100  $\mu$ Lを入れて室温で30分間反応させた。洗浄後、基質のテトラメチルベンチジン（以下TMB；フナコ社）100  $\mu$ Lを入れ、30分間発色後、540 nmで比色して抗体価を求めた（図1）。

ELISAで測定した検体は固定ヒツジ赤血球凝集法を実施した174例のうち、無作為に40例（凝集法陽性患者血清22例および陰性患者血清18例）を選定し、また、陰性対照には健常者24例、陽性対照にはヒツジ血球をウサギに免疫した市販の抗血清（以下抗ヒツジ赤血球抗体；シスメックス社）を使用した。

##### 2)イムノプロットの実施

ヒツジ赤血球膜抽出抗原の性質を調べるためこの抗原をSDS-PAGEとニトロセルロース膜を用いたブロッティングを実施し、固定ヒツジ赤血球凝集法とELISA法で陽性を示した患者血清を反応させた。対照には健常者血清と抗ヒツジ赤血球抗体を同様に反応させてバンドの出現の有無を確認した。なお、電気泳動の条件は、

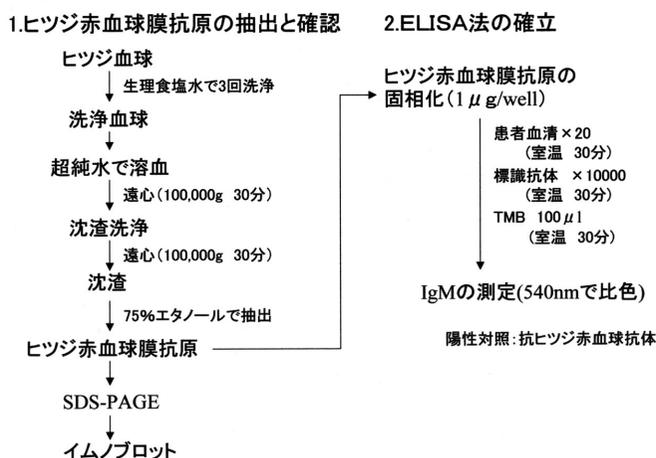


図1 ELISA法による抗ヒツジ赤血球膜抗体測定法

6℃の冷所環境にて(循環冷却装置ATTO AB-1,600スーパースタットミニPIDを使用)、20 mAで1時間泳動した。また、プロットィングは70 mAで1時間実施した。

3) 固定ヒツジ赤血球凝集法の確立

(1) ヒツジ固定血球の作製

ヒツジ血球(日本バイオテスト社)を上清が透明になるまで生食で洗浄し、その血球を用いてPBSで希釈した10%ホルマリンと1:4の割合で加え、室温で1晩固定した。

これを、PBSで3回洗浄した後、1%FCSを添加したPBSで2%固定ヒツジ赤血球浮遊液を作成した。防腐剤として、アジ化ナトリウムを0.1%の濃度で加え、使用まで冷蔵保存した(図2)。

(2) 固定ヒツジ赤血球凝集法の実施

患者血清を生食で10倍希釈し、V型プレート

に50μlずつ分注した。その他の穴には、あらかじめ、生食を25μlずつ分注した。マイクロタイターで倍々希釈を実施し、2%固定ヒツジ血球をそれぞれ25μl分注し、トレイミキサーで混和後、プレートにふたをし、室温で2時間反応させた後、凝集の有無を確認した(図3)。測定検体は174例の患者血清を使用し、陰性対照として前述した健常者血清24例、陽性対照には抗ヒツジ赤血球抗体を使用した。

また、血球対照として、固定ヒツジ血球の代わりに同様に作成した固定ヒトO型血球および1%ゼラチン粒子(富士レリオ社より供与)を用い、各疾患の陽性血清および健常者をそれぞれ5例ずつ無作為に選定し実施した。

Ⅲ. 結果

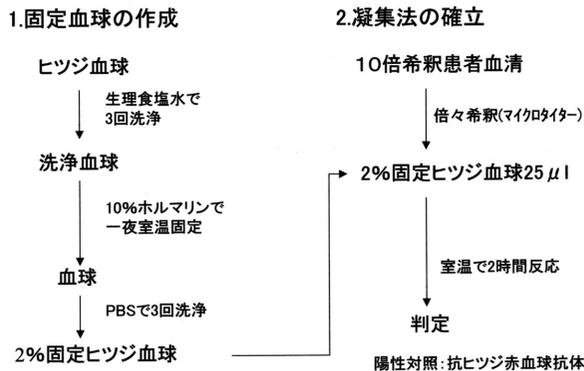


図2 凝集法による抗ヒツジ赤血球膜抗体測定法

WELL.NO.	1	2	3	4	5	...	12
生理的食塩水		25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	...	25 μl
10倍希釈患者血清または陽性コントロール	50 μl →	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	...	25 μl
血清希釈倍数	10	20	40	80	160	...	20480
対照(生理食塩水)	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	...	25 μl
2%ヒツジ固定血球	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	...	25 μl
最終希釈倍数	20	40	80	160	320	...	40960

トレイミキサーにかけ、プレートにふたをして室温静置2時間後、判定

図3 凝集法の手順

1. 固定ヒツジ赤血球凝集法における疾患別陽性率

健常者24例における本法の抗体価は全て20倍未満であった。したがって、凝集法の陽性を20倍以上とした時、自己免疫疾患では54例中35例(64.8%)、肝炎ウイルス等感染症疾患では40例中2例(5.0%)、甲状腺疾患では40例中2例(5.0%)、糖尿病では40例中3例(7.5%)がそれぞれ陽性を示し、中でも自己免疫疾患が最も高い陽性率を示した。

自己免疫疾患54例をさらに疾患別に分類すると、SLEで16例中13例(81.3%)、関節リウマチで31例中17例(54.8%)、強皮症・シェーグレン症候群等で7例中5例(71.4%)が陽性となり、特にSLEが最も高い陽性率を示した(表1)。

一方、固定ヒトO型血球およびゼラチン粒子による凝集法では、陽性抗体価を20倍以上とした時、自己免疫疾患、甲状腺疾患、糖尿病およ

び感染症の各症例において、すべて陰性であった。

2. ELISA法による疾患別出現率

固定ヒツジ赤血球凝集法で陽性22例と陰性例18例についてELISA法を実施したところ、凝集法の陰性群は健常者群と有意差がなかったが、陽性群は明らかに高い値(吸光度)を示し、中でも、SLE、関節リウマチおよび膠原病患者血清は健常者群に比べて高値を示した。また、糖尿病、甲状腺疾患患者血清においても高値を示す例もあり、今回の結果においては疾患別の特異性は認められなかった(図4)。

3. SLE患者における補体量(C4、C3)と固定ヒツジ赤血球凝集法の関係

SLE患者16例のうちC4を測定していた15例について補体C4と凝集法の関係を検索した。C4と

表1 凝集法の疾患別陽性率

疾患名	症例数	陽性数	陽性率(%)
健常者	24	0	0
全身性エリテマトーデス(SLE)	16	13	81.3
関節リウマチおよびその他自己免疫疾患	38	22	57.8
肝炎ウイルス等感染症	40	2	5.0
甲状腺疾患	40	2	5.0
糖尿病	40	3	7.5
計	174	42	24.1

陽性：20倍以上

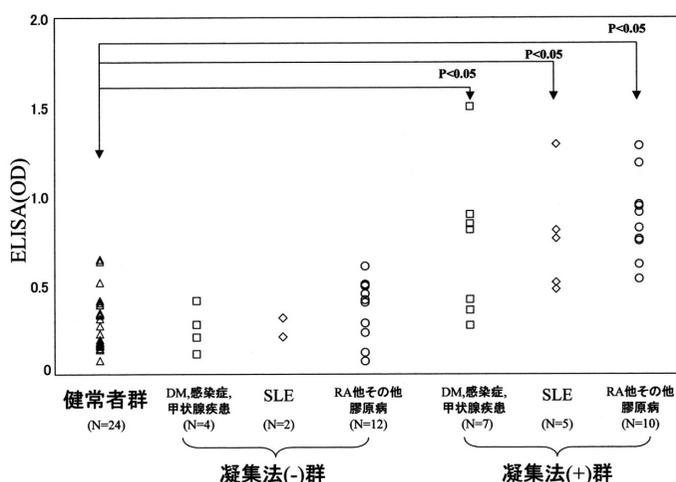


図4 ELISA法による抗ヒツジ赤血球膜抗体の出現率(陽性率)

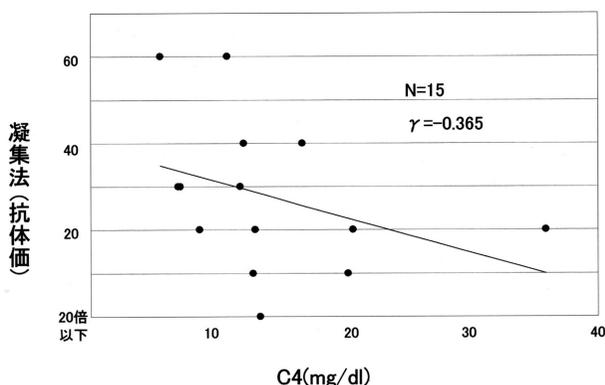


図5 C4測定値と凝集法の相関

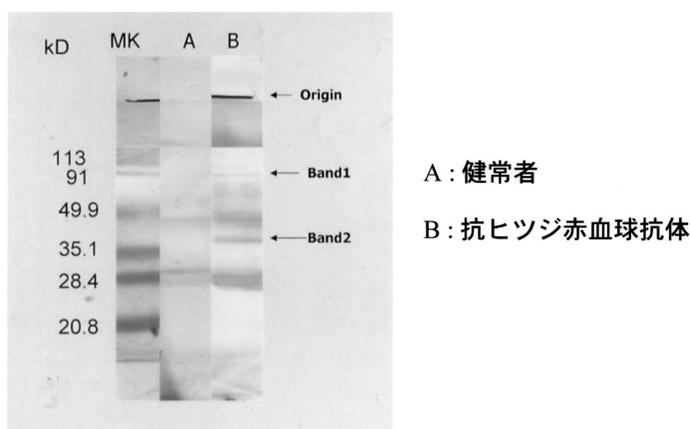


図6 イムノプロットの結果

固定ヒツジ血球凝集法の関係では逆相関関係を示し、相関係数は $r=-0.365$ であった(図5)。同様にC3と固定ヒツジ血球凝集法の関係についても若干の逆相関傾向はみられたものの、C4ほど顕著ではなかった。

#### 4. イムノプロット

SLE患者抗体とヒツジ赤血球膜抽出抗原との反応ではイムノプロットにおいて特異バンドは検出されなかったが、免疫した抗ヒツジ赤血球抗体との反応では図6のように健常者にはみられずに陽性抗体とのみ存在する90kDa付近と38kDa付近にバンドが検出された(図6)。

### Ⅳ. 考察

ヒツジ赤血球と凝集を起こす抗体は、伝染性単核症の急性期の患者血清中のみ特異的に出現すると考えられ、伝染性単核症診断における異好抗体検出の意義として報告<sup>1),2)</sup>がなされてきた。一方、1969年Price, L.Aら<sup>5)</sup>及びCarter, R.Lら<sup>6)</sup>は関節リウマチやウイルス性肝炎等で抗ヒツジ血球抗体が陽性を示すことを報告し、自己免疫との関連が注目された。

通常、SLEの患者血清中には多彩な自己抗体が存在し、これらの自己抗体の多くは、特定の病態と密接な関係があることが知られ<sup>4)</sup>この疾患に出現する抗DsDNA抗体、抗Sm抗体の測定は<sup>7)</sup>、SLEの診断や病態の把握や治療経過に有用な指標として使用されている。

今回、筆者らはこれら抗核抗体と同様に日常検査の中で簡便でかつ、安価な測定ができるヒ

ツジ赤血球膜抗体を指標とする自己免疫疾患への臨床的意義について検索した。

まず、固定ヒツジ血球を用いた凝集法での自己免疫疾患における陽性率はSLEが他の疾患や健常者に比べて有意に高い結果であり、同じ検体を測定したELISA法でも同様な傾向を示した。これらの結果からSLE患者血清中には抗ヒツジ赤血球膜抗体が高頻度に出現している可能性が高いと考えられた。

これまで抗ヒツジ赤血球抗体の産生やその抗原性については幾つかの報告があるが、Carter<sup>8)</sup>は伝染性単核症患者に出現するいわゆるポールバンネル抗体はEBウイルスによるtransformationの結果なのかviral genomの生産物なのか不明であると述べている<sup>8)</sup>。さらに、この抗体はEBウイルス感染により、患者のリンパ球表面に出現すると考えられているポールバンネル抗原の刺激で生産される抗体であり、その抗原がヒツジ赤血球膜に存在する抗原と同一または類似していると推測している<sup>8)</sup>。また、狩野<sup>9)</sup>はヒツジ赤血球中にはごく少数ではあるが伝染性単核症患者血清中に認められる独特な抗原が存在するのではないかと述べている。

以上の結果等によりヒツジ赤血球膜抗体に対する抗原性について検索するため、ヒツジ赤血球から抽出した抗原と患者血清中の抗体との反応をイムノプロットにより検出した。イムノプロットにおけるバンドの分子量をヒトHEp-2細胞中に存在する分子から推測すると90kDaに検出されたバンドは核小体形成部位蛋白質が推測され、この蛋白質を対応抗原とする抗体は強皮症に臨床的意義が高い抗NOR-90抗体が報告されている<sup>10)</sup>。また、38kDaのバンドはリボゾーム60S粒子が推測され、この蛋白質を対応抗原とする抗体としてSLEに臨床的意義が高い抗リボゾーム抗体が知られている<sup>11)</sup>。しかし、これは推測であり自己抗体とヒツジ血球膜抗原との関連性については定かではない。

一方、今回、検索したヒツジ血球膜抗体価と補体のC4との間に逆相関を示す傾向があり、C3とは関係を認めなかった。C3に比べてC4と高い関係があることから補体の古典的経路の活性化に関与している可能性があり、この抗体価を測定することはSLEの病態把握にも有用であること

が推測できる。

以上の臨床的意義に加えて、この方法の特長として、①操作法が簡便であること、②ヒツジ赤血球を使用するため安価であることがあげられる。また、ELISA法も同様に簡便であり、3時間以内で測定可能な特徴を有し、自己免疫疾患、特にSLEのスクリーニング検査として十分対応可能であることが示唆された。

## V. 結語

本法は、手技が簡単で試薬も比較的安価であり、自己免疫疾患、特にSLEのスクリーニング検査として利用可能であることが示唆された。

## 文献

- 1) 金井正光編; 斉藤由美子: EBウイルス. 臨床検査法提要 改訂 第32版, 1145, 金原出版株式会社, 東京, (2005)
- 2) 熊谷直秀: Paul-Bunnell反応. 日本臨床, 38: 1487-1500, 1980
- 3) 金井正光編; 三森経世: 自己免疫疾患に関する検査. 臨床検査法提要 改訂 第32版, 867, 金原出版株式会社, 東京, (2005)
- 4) 竹内 健, 松平 蘭, 松下雅和: 全身性エリテマトーデス. 医学検査, 51: 1256-1264, 2002
- 5) Price, LA and Davis, OG: Lymphosarcoma with a positive Paul-bunnell test. Brit. med. J., 2: 31, 1969
- 6) Carter, RL and Panman, HG: Infections Mononucleosis, P67, P179, P180, Blackwell Scientific Pub. Oxford and Edinburgh, (1969)
- 7) 三森経世編; 石原 康, 山下里美, 前川幸恵: クロマチン関連抗原を認識する自己抗体. 間接蛍光抗体法による抗核抗体写真集第2版, 16-17, 株式会社医学生物研究所, 名古屋, (1998)
- 8) Carter, RL: Infectious Mononucleosis: Model of self-limiting lymphoproliferation. Lancet, 1: 846, 1975
- 9) 中尾 享, 日沼頼夫編; 狩野恭一: 伝染性単核症の血清学. 伝染性単核症, 37, 近代出版, 東京, (1975)
- 10) 三森経世編; 石原 康, 山下里美, 前川幸恵: 核小体関連蛋白質を認識する自己抗体. 間接蛍光抗体法による抗核抗体写真集第2版, 28-29, 株式会社医学生物研究所, 名古屋, (1998)
- 11) 内海利夫: リボゾーム自己抗原部位の構造と機能. 自己抗体と自己免疫'97 (第4回自己抗体と自己免疫シンポジウム講演録集), 13-19, MBL, 名古屋, (1997)