

SS-B 抗原の解析と ELISA による臨床応用

細川 寿和

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Analysis of SS-B Antigen and the Clinical Application using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Toshikazu HOSOKAWA

*Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. A. YACHI)*

ABSTRACT SS-B antigen was purified from a saline extract of acetone powder of rabbit thymus (RTE) by a salting out method using ammonium sulfate, which was followed by affinity chromatography using Glycosyl-hardgel tagged with anti-SS-B antibody, and then the antigen fractions corresponding to anti-SS-B antibodies in patient sera were analyzed by Western blotting. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed using purified 40 kDa SS-B antigen and the titers of anti-SS-B antibodies in sera were determined and compared with laboratory findings in patients with collagen diseases.

The results obtained were as follows.

- 1) Affinity-purified SS-B antigen showed three bands, 50 kDa, 40 kDa and 28 kDa, reactive with anti-SS-B antibody positive sera in Western blotting. The 40 kDa fraction reacted only with anti-SS-B antibody, whereas the 50 kDa fraction reacted with both the anti-SS-B antibody and anti-human IgG (Fc) antibody.
- 2) It is suggested that the 50 kDa fraction has at least two antigenic epitopes: one is common to that of the 40 kDa fraction reacting with anti-SS-B antibody and the other is similar to the Fc portion of human IgG.
- 3) The 40 kDa SS-B fraction was obtained from gel slices by electrophoretical elution after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Enzyme-linked immunosorbent assay using this fraction enabled us to detect IgG-, IgA-, and IgM-type anti-40 kDa SS-B antibodies in sera of patients with collagen diseases. Although antibodies of all Ig classes were detected, the highest value was obtained for IgG-type. IgG-type anti-40 kDa SS-B antibodies were found in 24(70.5%) of 34 patients with Sjs, 13(44.8%) of 29 patients with SLE and 2(20%) of 10 patients with PSS-PM. The incidence and titer of the antibody were higher in patients of Sjs than in patients other collagen diseases.

In Sjs and SLE, IgG-type anti-SS-B positive patients were associated with the appearance of leukopenia, lymphopenia, and hyper γ -globulinemia ($p < 0.05$).

(Received February 20, 1990 and accepted March 9, 1990)

Abbreviations:

ENA : extractable nuclear antigen
PM : polymyositis
PSS : progressive systemic sclerosis
RNP : ribonucleoprotein
Sjs : Sjögren's syndrome

SLE : systemic lupus erythematosus
Sm : Smith
SS-A : Sjögren's syndrome-A
SS-B : Sjögren's syndrome-B

Key words: SS-B antigen, Rabbit thymus extract (RTE). Sjögren's syndrome (SjS). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting

1 緒 言

抗SS-B抗体は生理食塩水に可溶性の核抗原(extractable nuclear antigen: ENA)に対する抗体(抗ENA抗体)の一つであり, シェーグレン症候群(Sjögren's syndrome: SjS)や全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)など, 膠原病患者の血中に認められ¹⁾, 臨床診断の指標として用いられている. しかし抗SS-B抗体の対応抗原の分子量については40-48 kDa(kilodalton)²⁻⁸⁾, 50 kDa⁹⁻¹¹⁾, 52 kDa¹²⁾, 68 kDa¹³⁾などと核材および抗原の精製方法の違いによって多様に報告されており, その抗原分子の性状については不明の点が多い. さらに抗SS-B抗体の検出法は, 臨床的には現在でも Ouchterlony 法によっているのが実情である. しかし Ouchterlony 法は感度が低く, 沈降反応を呈する抗体のみを検出し, 半定量的な評価に止っている. また抗体の免疫グロブリン(Ig)クラスの決定も困難であるなどの欠点を有する^{14,15)}.

本研究では核材として家兎胸腺アセトン粉末を用い, アフィニティークロマトグラフィーによりSS-B抗原の精製を試みた. そしてアフィニティー精製SS-B抗原は抗SS-B抗体陽性血清と50 kDaおよび40 kDaで反応し, また50 kDa SS-B分画にはヒトIgGのFc部分と類似性を示すepitopeがあるという新しい知見を得た. さらに抗SS-B抗体の測定には40 kDa SS-B分画が最適と考え, これを用いてEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)系を設定し, 各種膠原病患者について血中抗体価を測定し臨床的検討を加えた.

2 研究方法

2.1 血清自己抗体の測定対象

自己抗体測定用の血清は次の対象から採取した. 当科で加療中の, アメリカリウマチ協会(ARA)の診断基準¹⁶⁾を満たすSLE 29例(男11例, 女18例, 年齢24~56歳), 厚生省研究班の診断基準¹⁷⁾を満たすSjS 34例(男4例, 女30例, 年齢21~66歳), 進行性全身性硬化症(progressive systemic sclerosis: PSS) 6例および多発性筋炎(polymyositis: PM) 4例計10例(男2例, 女8例, 年齢23~45歳), また正常対照として18例(男8例, 女10例, 年齢23~45歳)である.

2.2 抗原蛋白の分離と検出法

2.2.1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Bio-Rad PROTEAN™ II Slab Cell装置(20 cm cell, spacer 1 mm)を使用し, Laemmli and Favre¹⁸⁾に準じて行った. ゲルはstacking gelを4%, 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, そしてseparating gelを12%, 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDSに調整し, 0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDSの緩衝液中で, 16 mAの定電流で約3.5時間電気泳動を行った.

2.2.2 Western blot 法

既報¹⁹⁾に従って, 0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 20% methanolを含む緩衝液で, 18時間, 1 V/cmの条件で電気泳動を行った. 一次抗体としては患者血清あるいは分離した抗SS-B抗体分画を反応させ, 二次抗体としてはペルオキシダーゼ(Po)標識家兎抗ヒトIgG(γ 鎖)抗体(DAKO社)を使用し, 塩酸3, 3'-ジアミノベンジジン(片山化学工業株式会社)で発色させた.

2.3 SS-B抗原の精製

2.3.1 粗抗原試料

家兎胸腺アセトン粉末(RTE, Pel-Freez Biologicals, USA) 5gを20 mM NaHSO₃を含む0.15 M 燐酸緩衝食塩水(PBS, pH 7.2) 83 mlで溶解し(60 mg/ml), 4°C, 一晚攪拌した. これを12,000×g, 1時間遠心し, 得られた上清を粗RTEとした.

2.3.2 硫酸塩析分画

粗RTEに飽和硫酸溶液を加え60%飽和とし, 4°C, 1時間攪拌した. 15,000×g, 30分間遠心して, その上清をとり, さらに飽和硫酸溶液を加え80%飽和とした. 4°C, 1時間攪拌し, 再び15,000×g, 30分間遠心後, 沈殿物を集め少量の蒸留水に溶解し, PBSに対して透析した. 以下この試料をAS₈₀RTEと仮称する.

2.3.3 抗SS-B抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィー

アフィニティークロマトグラフィーのための抗体としては, Ouchterlony法により抗SS-Aおよび抗SS-B抗体強陽性(256×, 32×)で, 抗RNPおよび抗Sm抗体陰性の典型的SjS患者(34歳, 女性)の血清(Ni血清)を使用した, Ouchterlony法による抗SS-A/SS-B抗体の測定はSRL社のkitによった.

まず, Ni血清より33%飽和硫酸塩析, DEAE-セル

ロースクロマトグラフィーにより IgG を分離した。これを Glycosyl-hardgel (生化学工業株式会社) と結合させた後、水素化シアノホウ素ナトリウム (NaCNBH₃) 加 1M Tris-HCl (pH 7.2) 溶液中で、4°C、一晚攪拌し、残存活性基をブロックした。次にこれをカラム (1.0×20 cm) に充填し、緩衝液 (0.1M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.2) で洗浄後、AS₈₀RTE (蛋白濃度 11 mg/ml) を 1 ml 添加した。上記緩衝液で十分に洗浄した後、3M 塩酸グアニジン溶液で抗原を溶出した。溶出液は PBS に対して透析した後、濃縮装置 (Concentrator, Amicon Corporation, USA) を用いて濃縮し、精製 SS-B 抗原試料 (蛋白濃度 0.9~1.2 mg/ml) とした。

2・3・4 40 kDa SS-B 分画の電気泳動的溶出法による単離

SDS-PAGE 終了後、分子量マーカーのレーンのゲルのみ nitrocellulose 膜 (NC 膜, TOYO ROSHI 社) に転写し、SS-B 抗原のレーンのゲルはガラス板に付けたままサララップ (旭化成工業株式会社) で包装し、4°C、一晚保存した。その後、Coomassie brilliant blue で染色した分子量マーカーを基準に SS-B 抗原ゲルの 40 kDa に相当する部位を 2 mm 幅に切断し、中野²⁰⁾の方法に準じて、以下のようにして電気泳動的に抗原蛋白の抽出を行った。

切断したゲル片をさらに細断し、透析膜 (Seamless Cellulose Tubing, 8/32, VISKASE SALES CORP) をつけたガラス管につめ、disc gel 電気泳動装置にセットした。泳動緩衝液 (0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS) および濃縮緩衝液 (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS) を用い、上槽を陰極、下槽を陽極にし、1 管当たり 5 mA の定電流で約 2 時間電気泳動した。その後、透析膜の最下層を注意深く集め、蒸留水および PBS に十分透析して SDS を出来るだけ除去し、精製 40 kDa SS-B 分画とした。これらの試料は再度 SDS-PAGE および Western blot 法を行って、その純度を検定した。

2・4 SS-B 抗原分画結合抗体の溶出

Ben-Chetrit *et al.*²¹⁾ の方法に準じて NC 膜上の SS-B 抗原バンドに結合した抗体を溶出した。まず 2・3・3 で得た精製 SS-B 抗原を SDS-PAGE および Western blot 法により NC 膜に固相化した後、50 kDa および 40 kDa に相当する NC 膜の部位を 2 mm 幅に切断した。それぞれを別の反応容器に入れ抗 SS-B 抗体の標準血清である Ni 血清を反応させた。PBS および 0.05% Tween 20 加 PBS (PBS-T) で十分に洗浄後、0.2 M glycine-HCl (pH 2.7) 溶液中で、室温、2 分間攪拌し

ながら反応させ、50 kDa および 40 kDa 分画に結合した抗体を遊離させた。その溶液は 1 M Tris-HCl (pH 8.7) 溶液で素早く中和した。

2・5 ELISA による抗 40 kDa SS-B 抗体検出法

2・3・4 で得た 40 kDa SS-B 分画を 0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で 5 μg/ml とし、PINS plate (Nunc Immunoplate, Roskilde, Denmark) に 200 μl/well 入れ、4°C、一晚放置し、ピンに吸着させた。ついで PBS で洗浄後、1% 牛血清アルブミン (BSA) 加 PBS を 200 μl/well 添加し、37°C、1 時間反応させ残余結合部位をブロックした。次に PBS-T で十分に洗浄し、一次抗体として PBS-T で希釈した患者血清 (IgG 型抗体の測定には 1000 倍希釈、IgA 型および IgM 型の場合にはそれぞれ 100 倍希釈血清) を 200 μl/well 入れ、37°C、2 時間反応させた。PBS-T および PBS で洗浄後、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG, IgA および IgM 抗体 (Sigma 社) をそれぞれ PBS-T で 500 倍に希釈して、37°C、2 時間反応させ、p-nitrophenyl phosphate (Substrate 104; Sigma 社) で発色し、405 nm において吸光度 (O. D.₄₀₅) を測定して、これを抗体価とした。

その正常域は、正常対照血清の示した吸光度の平均値 + 2 SD 未満とした。

2・6 推計学的解析

Student t 検定および χ^2 検定を用いた。

3 研究成績

3・1 Western blot 法による抗 SS-B 抗体の対応抗原の解析

3・1・1 粗 RTE と AS₈₀RTE での検討

まず抗 SS-B 抗体の対応抗原について検索すべく粗 RTE と、AS₈₀RTE で Ni 血清との反応パターンを比較検討した。その結果、Fig. 1 に示すように、粗 RTE では 40 および 43 kDa に強いバンドがみられ、その他に 50 kDa および 41 kDa にもバンドが検出された (lane 4)。一方、AS₈₀RTE では 40 kDa に強いバンドが認められ、他に 42, 43 kDa と 28 kDa に弱いバンドが認められた (lane 5)。

次に、症例数を増し、Ni 血清以外の SjS 患者 17 例について同様の検索を行った。Fig. 2 に示すように、抗 SS-B 抗体陽性血清 (lane 1~9) では粗 RTE および AS₈₀RTE とも Ni 血清と同様に 40~43 kDa に数本のバンドが認められたが、粗 RTE ではそれらのバンド以外に抗 ENA 抗体と反応する他のバンドも認められた (lane 4, RNP 抗原の 68 kDa, その他の 52 kDa)。また、lane 10 は正常ヒト血清であるが非特異的バンドが

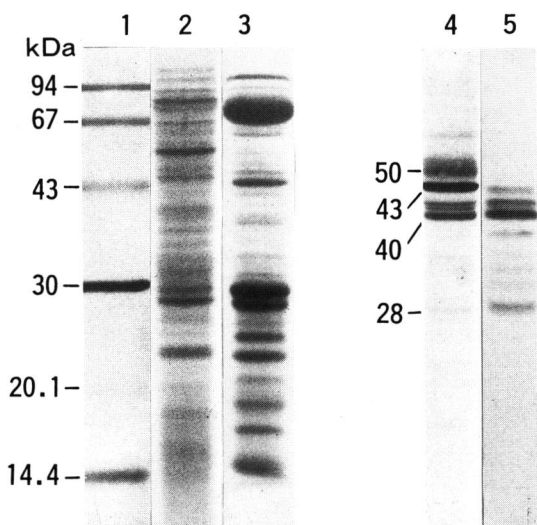


Fig. 1 Western blot analysis of crude RTE (lanes 2 and 4) and AS₈₀RTE (lanes 3 and 5). lanes 1~3: Coomassie blue stain (lane 1: Marker proteins) lanes 4 and 5: Ni serum AS₈₀RTE: Precipitate fraction obtained by 80% saturation of ammonium sulfate from the fraction of RTE soluble in 60% saturated ammonium sulfate.

50 kDa と 90 kDa に認められた。

一方、抗 SS-B 抗体陰性血清 (lane 11~18) でも粗 RTE で 50 kDa の非特異的バンドが抗体陽性群と同様に認められたが、抗体陽性群とは反応パターンが異なり、粗 RTE と AS₈₀RTE で 40 および 43 kDa のバンドが認められなかった。また、この群にはバンドの出現パターンがかなり異なる症例もあった。さらに lane 16 に示すように Ouchterlony 法では抗 SS-B 抗体陰性の血清でも Western blot 法では明らかに 40 および 43 kDa 抗原と反応している症例もあった。

以上のことから AS₈₀RTE は SS-B 抗原に富む分画で、SS-B 抗原の主体をなすのは 40 kDa 分画であり、それに 43 kDa 分画が付随していると判断された。そこでこれをアフィニティークロマトグラフィーの抗原として使用した。

3.1.2 アフィニティークロマトグラフィー精製 SS-B 抗原

2.3.3 の方法によりアフィニティークロマトグラフィーで精製した抗原は、Fig. 3 に示すように抗 SS-B 抗体陽性血清に対する反応で主として 50 kDa および 40 kDa のバンドを示した (lane 1~3)。また正常対照血清を用

いた場合も 50 kDa に反応が認められた (lane 4)。

3.2 50 kDa 分画および 40 kDa 分画結合抗体の反応性

2.4 で示した方法に従い、NC 膜から 50 kDa 分画および 40 kDa 分画にそれぞれ結合した抗体を溶出させ、相互の反応性を検討した。その結果、溶出した両分画結合抗体は、それぞれ 50 kDa および 40 kDa 分画と反応した (Fig. 4: lane 1 および 2)。すなわち 50 kDa 分画結合抗体も 40 kDa 分画と反応することが明らかとなった。

3.3 50 kDa 分画の解析

Western blot 法において、50 kDa 分画は正常ヒト血清を用いた際にも認められたため、まずこの分画上に正常ヒト IgG と反応する epitope があるか否かを検討した。Fig. 5 に示すように、まず、Po 標識ヒト IgG (Cappel 社) を反応させたが、バンドはみられなかった (lane 1)。次に二次抗体とのみの反応を検討した。二次抗体は、Po 標識家兔抗ヒト IgG (γ 鎖) 抗体 (DAKO 社) (lane 2)、Po 標識家兔抗ヒト IgG (Fab')₂ 抗体 (lane 3) および抗ヒト IgG (Fc) 抗体 (lane 4) (Cappel 社) を用いたが、50 kDa 分画は抗ヒト IgG (Fab')₂ 抗体とは反応せず、抗ヒト IgG (γ 鎖) 抗体および抗ヒト IgG (Fc) 抗体のみと反応した。また 40 kDa 分画は上のいかなる抗体とも反応しなかった。以上のことから 50 kDa 分画にはヒト IgG の Fc 部分に類似する epitope がであると推測された。

なお、別の実験で Po 標識家兔抗ヒト IgG (Fab')₂ 抗体および抗ヒト IgG (Fc) 抗体は共に、ヒト IgG と反応することを確認している。また、50 kDa 分画との反応は二次抗体が抗ヒト IgA および IgM 抗体では見られなかった (lane 5 および 6)。

3.4 40 kDa 分画の抗原活性

2.3.4 で得た 40 kDa 分画が SS-B 抗原の主体をなすと考えられるので、これを再度 SDS-PAGE および Western blot 法を行い、その純度を検定した。Fig. 6, lane 2 および 4 に示すように、精製 40 kDa 分画は抗 SS-B 抗体陽性血清のみと反応し、微弱ではあるが 43 kDa のバンドの反応もみられた。以下これを 40 kDa SS-B 分画と呼ぶことにする。

3.5 抗 40 kDa SS-B 抗体の臨床的意義

3.5.1 患者血清における Ig クラス別抗 40 kDa SS-B 抗体の測定

40 kDa SS-B 分画に対する抗体を Ig クラス別に各種膠原病患者血清について測定した。IgG 型抗体は Fig. 7 に示すように、SjS 34 例中 24 例 (24/34 : 70.5%)、SLE 13/29 (44.8%)、PSS/PM 2/10 (20%) に陽性で

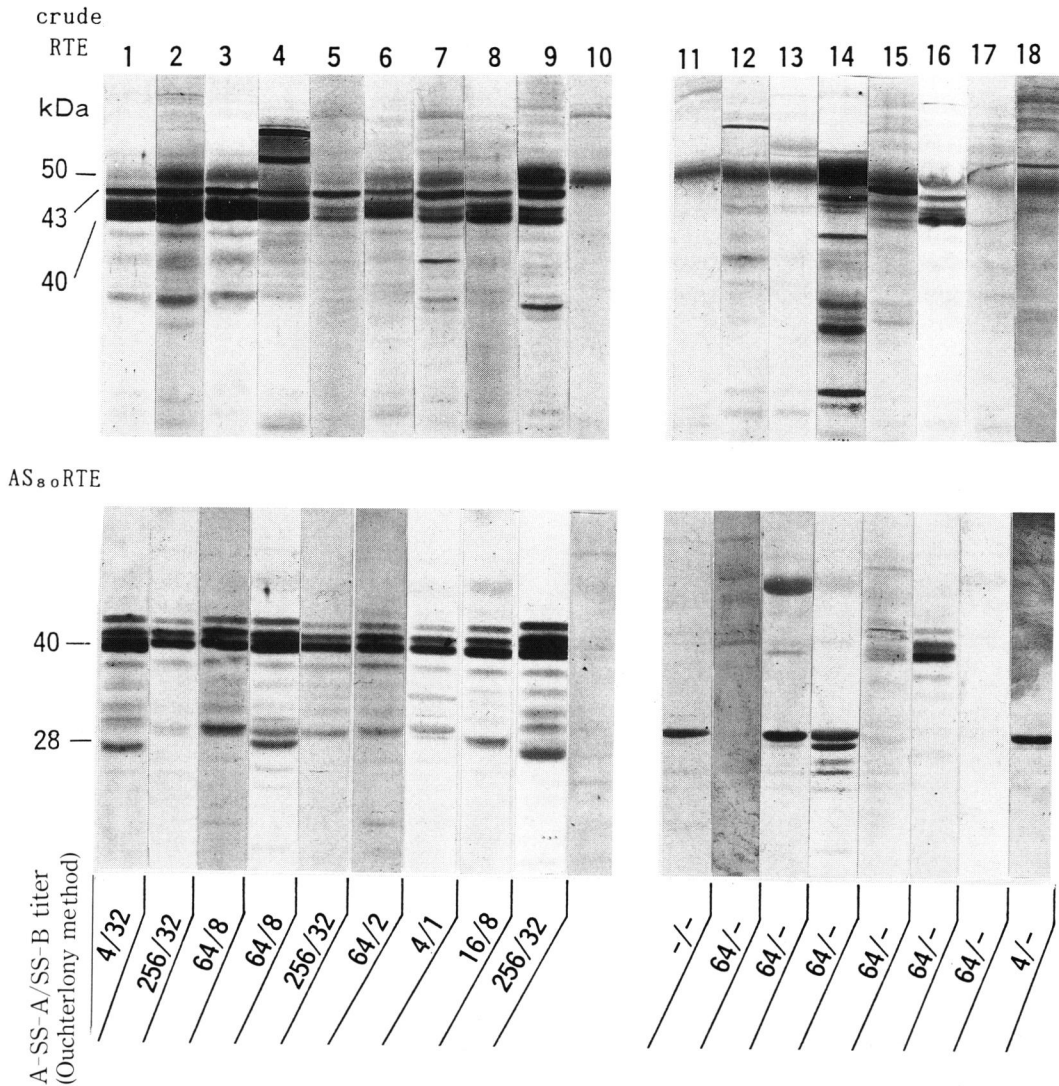


Fig. 2 Western blot patterns of sera from SjS patients.
 lanes 1~9: anti-SS-B positive sera tested by Ouchterlony method.
 lanes 11~18: anti-SS-B negative sera tested by Ouchterlony method.
 lane 10: normal control serum
 upper panel: crude RTE used as antigen
 lower panel: AS₈₀RTE used as antigen

あり、SjS では他の疾患と比較して陽性率、抗体価ともに高い傾向がみられた。また SjS での 1 例 (Y.O. 例) を除き、各疾患とも Ouchterlony 法により抗 SS-B 抗体陽性例では IgG 型抗体が高い傾向が示された。

そこで SjS 34 例と SLE 12 例において IgG 型抗体価と Ouchterlony 法での抗 SS-B 抗体価を比較検討した (Fig. 8)。その結果、両測定法による値の間には粗の相

関 ($r=0.62$, $p<0.05$) が認められた。しかし Ouchterlony 法で抗 SS-B 抗体陽性の 18 例のうち、IgG 型抗体陰性例は前述の Y.O. 例 1 例のみであったが、Ouchterlony 法で陰性の 28 例中 13 例において ELISA による IgG 型抗体が陽性であった。

次に IgA 型抗体および IgM 型抗体について同様に検索した。IgA 型抗体は SjS 6/34 (17.6%)、SLE 6/

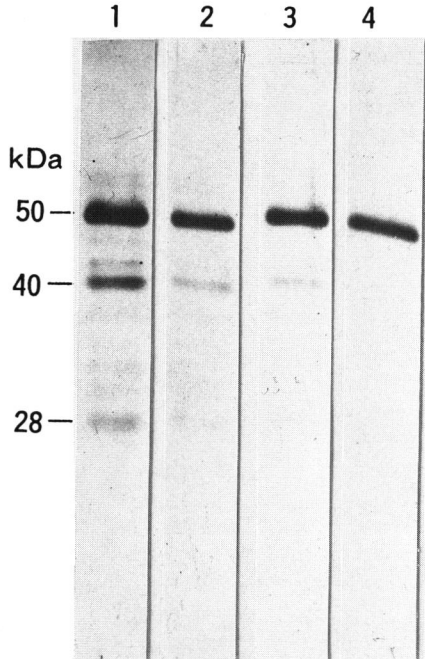


Fig. 3 Western blot analysis of three anti-SS-B positive sera (lanes 1~3) and normal control serum (lane 4) reacted with antigen eluted from anti-SS-B affinity column.

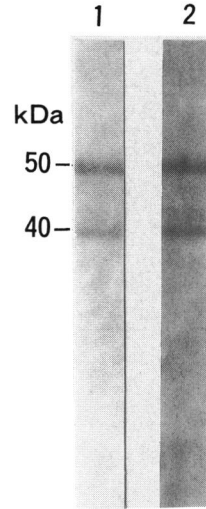


Fig. 4 Western blot analysis of the reactivities of 50 kDa binding antibody (lane 1) and 40 kDa binding antibody (lane 2) to affinity-purified SS-B antigen.

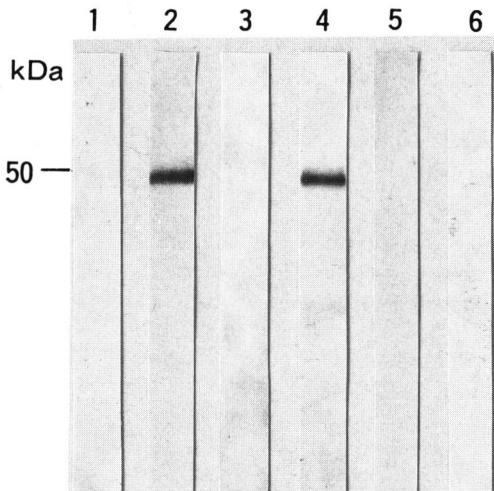


Fig. 5 Western blot analysis of affinity-purified SS-B antigen with several antibodies; Po-conj. human IgG (lane 1), Po-conj. anti-human IgG (γ -chain) (lane 2), Po-conj. anti-human IgG (F(ab')₂ fragment specific) (lane 3), Po-conj. anti-human IgG (Fc fragment specific) (lane 4), Po-conj. anti-human IgA (lane 5), and Po-conj. anti-human IgM (lane 6).

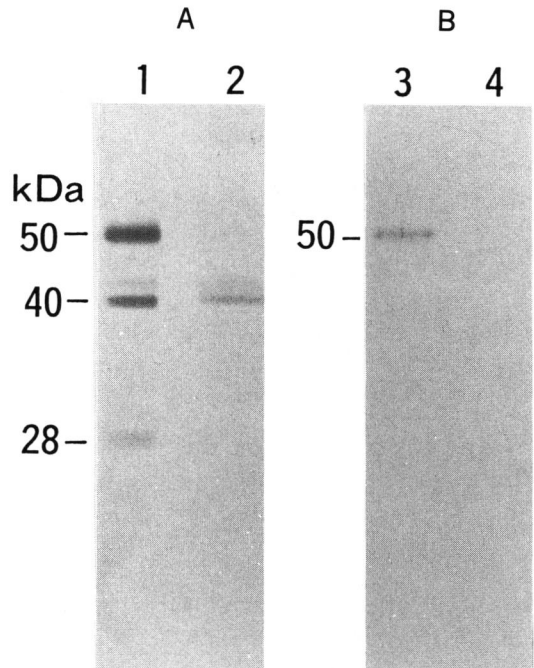


Fig. 6 Western blot analysis of purified 40 kDa fraction with anti-SS-B serum (panel A) and normal control serum (panel B) used as the first antibody. lanes 1 and 3: affinity-purified SS-B antigen lanes 2 and 4: purified 40 kDa fraction

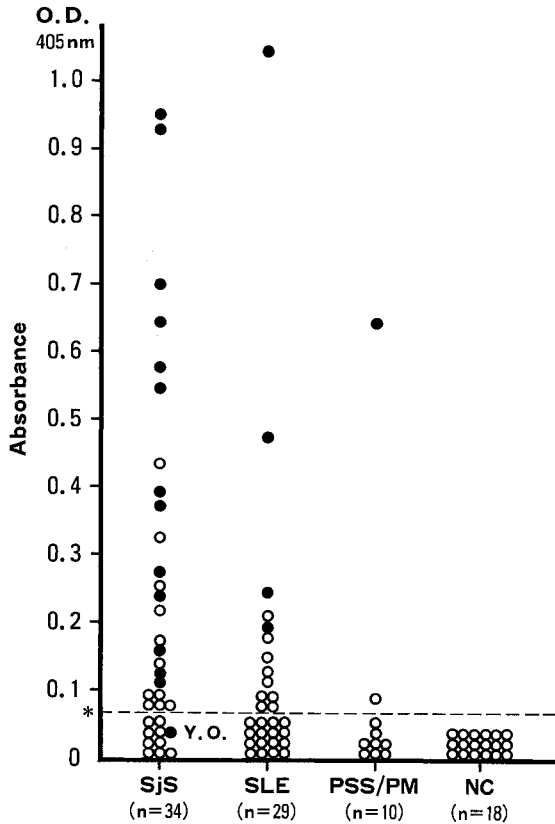


Fig. 7 Detection of IgG type antibody to 40 kDa SS-B fraction in sera from patients with collagen diseases and normal control. Anti-SS-B positive sera (●), and negative sera (○) in Ouchterlony method.
* 0.06: upper limit of normal value (mean+2SD)

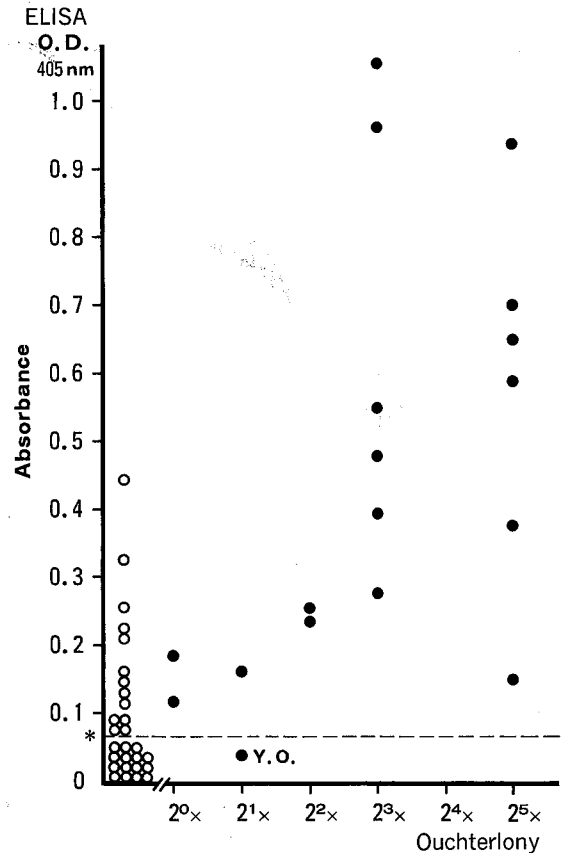


Fig. 8 Correlation between anti-SS-B titers in 46 sera (SjS and SLE) determined by Ouchterlony method (anti-SS-B positive sera (●), and negative sera (○)) and by ELISA ($r=0.62$; $p<0.05$).
* 0.06: upper limit of normal value (mean+2SD)

29 (20.6%), PSS/PM 3/10 (30%)に検出された。さらにIgM型抗体についてみるとSjSとSLEでそれぞれ2/34 (5.8%) および4/29 (13.7%)に陽性を示すにすぎず、これらの抗体価は非常に低かった。

このようにSjSではIgAおよびIgM型抗40kDa SS-B抗体は必ずしも高値を示さず、IgG型が主体を占めていることが明らかにされた。また各症例ごとにIgG型、IgA型およびIgM型抗体の出現様式を検索したが、SjSもSLEも共にIgG型単独陽性が多く、次いでIgG型にIgA型が付随する場合であるが、三型とも陽性の場合には両疾患ともわずか1例ずつであった。さらにIgAあるいはIgM型それぞれ単独陽性を呈する場合は、それぞれ3例みられた (Table 1)。

3.5.2 臨床検査所見との関係

IgG型抗体陽性例 (O.D.₄₀₅ ≥ 0.06) において臨床検

査値との関係を、検索し得たSjSおよびSLEの36例について検討した (Table 2)。その結果、陽性例では

Table 1 Patterns of anti-40 kDa SS-B antibody expression in individual patients

Ig class			SjS (n=34)	SLE (n=29)	total (n=63)
IgG	IgA	IgM			
+	+	+	1	1	2
+	+	-	4	3	7
+	-	+	1	0	1
+	-	-	18	9	27
-	+	+	0	0	0
-	+	-	1	2	3
-	-	+	0	3	3
-	-	-	9	11	20

Table 2 Relationship between laboratory data and titers of ELISA (IgG-type anti-40 kDa SS-B) in SjS and SLE

		ELISA positive (O. D. ₄₀₅ ≥ 0.06)				ELISA negative (O. D. ₄₀₅ < 0.06)			
		n	mean ± SD	r	p < 0.05	n	mean ± SD	r	p < 0.05
WBC (/mm ³)	SjS	23	5093 ± 1579*	-0.47	+	12	7041 ± 2891	0.04	-
	SLE	13	5346 ± 1481	-0.25	-	14	6328 ± 2580	-0.59	+
	total	36	5184 ± 1528*	-0.40	+	26	6657 ± 2696	-0.24	-
lym. (/mm ³)	SjS	23	1430 ± 503*	-0.48	+	12	2168 ± 772	0.06	-
	SLE	13	1213 ± 424	-0.33	-	14	1308 ± 354	0.01	-
	total	36	1352 ± 482*	-0.37	+	26	1705 ± 720	0.05	-
γ-glob. (g/dl)	SjS	23	1.95 ± 0.66*	0.44	+	12	1.46 ± 0.44	0.18	-
	SLE	13	1.61 ± 0.55	0.78	+	14	1.29 ± 0.53	0.63	+
	total	36	1.83 ± 0.63*	0.57	+	26	1.37 ± 0.49	0.41	+
IgG (mg/dl)	SjS	22	2502 ± 740*	0.51	+	12	1920 ± 511	0.02	-
	SLE	13	2156 ± 811	0.72	+	12	1797 ± 607	0.49	-
	total	35	2374 ± 774*	0.61	+	24	1859 ± 552	0.24	-
IgA (mg/dl)	SjS	22	403 ± 189	-0.16	-	12	342 ± 115	0.08	-
	SLE	13	305 ± 97	0.18	-	12	331 ± 94	0.20	-
	total	35	367 ± 166	-0.01	-	24	337 ± 102	0.13	-
IgM (mg/dl)	SjS	22	211 ± 136	0.31	-	12	239 ± 113	-0.13	-
	SLE	13	174 ± 148	0.09	-	12	160 ± 90	0.32	-
	total	35	197 ± 140	0.25	-	24	199 ± 108	0.02	-

* p < 0.05 (t-independent) between ELISA positive and negative groups statistically significant correlation +; present, -; absent

末梢血白血球数およびリンパ球数は陰性例より低値を示し、逆にγグロブリン値およびIgG値は有意に高値を示した(p < 0.05)。さらに陽性例において抗体価と、末梢血白血球数およびリンパ球数との間には有意の負の相関を、また抗体価とγグロブリン値およびIgG値との間には有意の正の相関が認められた(p < 0.05)。

IgA型およびIgM型抗体陽性例について同様に検討したが、特徴的な検査所見は得られなかった。

4 考 察

本研究ではRTEを核材として使用した。抗SS-B抗体陽性血清はほとんど抗SS-A抗体も陽性であり²²⁾、またSS-B抗原分子にはSS-B抗原単一のものと、SS-A抗原と分子複合体を形成しているものがある⁴⁾と報告されている。しかし、RTEにはSS-A抗原はほとんど含まれておらず、SS-B抗原が多く含まれるとされる報告が多い¹⁻³⁾ので、SS-B抗原の精製に用いることにした。

本研究では、まず粗RTEおよびAS₈₀RTEと抗SS-B抗体陽性血清との反応をWestern blot法で検索し

た。その結果、粗RTEおよびAS₈₀RTEとも40および43 kDa分画が抗SS-B抗体陽性血清と反応し、これらがSS-B抗原の主要対応抗原と考えられた。このAS₈₀RTEの蛋白染色像と抗SS-B抗体陽性血清を反応させたWestern blot像は、Venable *et al.*³⁾の報告と極めて類似していた。40および43 kDaのバンドの濃淡とOuchterlony法での抗SS-B抗体価の間には相関はなく、またOuchterlony法において抗SS-B抗体陰性の血清でも検出されることがあり、de Rooij *et al.*²³⁾の報告同様にWestern blot法の感度がすぐれていると考えられた。抗SS-B抗体の有無を検索するには粗RTEやAS₈₀RTEでよいと考えられるが、他の抗ENA抗体との反応も見られ、判定が困難の場合がある。そこでSS-B抗原を精製しELISAを確立して、患者血清中の抗SS-B抗体を定量的に測定しようとした。

SS-B抗原の精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行ったが、精製SS-B抗原は抗SS-B抗体陽性血清との反応で50 kDa、40 kDaおよび28 kDaの分画が検出された。一般に、SS-B抗原は不安定で精製過程

で分解されやすいとの報告が多く^{7,24,25)}, 28 kDa は分解産物であると考えられる。また正常ヒト血清を用いた際にも 50 kDa との反応がみられた。そこでこの 50 kDa および 40 kDa 分画について追究した。以下この点を中心に考察を加える。

まず、NC 膜から溶出した 50 kDa および 40 kDa 分画結合抗体は、いずれも 50 kDa および 40 kDa の両分画と反応することが確かめられた (Fig. 4)。少なくとも 40 kDa 分画には抗 50 kDa および抗 40 kDa 分画結合抗体それぞれと反応する epitope があると考えられた。しかし両抗体の認識する epitope の異同については明らかでなかった。次に 50 kDa 分画については、一見、正常ヒト血清とも反応するように思われたが (Fig. 3)、実は Fig. 5 にみられるように正常ヒト IgG とは反応しないことが明らかとなった。さらにこの 50 kDa のバンドは、二次抗体として使用した抗ヒト IgG (γ 鎖) 抗体および抗ヒト IgG (Fc) 抗体のみによる反応でも検出され、抗ヒト IgG (Fab')₂ では検出されないことが判明した。つまり、50 kDa 分画には、抗 50 kDa 分画結合抗体が反応する 40 kDa 分画上の epitope と共通の epitope 以外に、ヒト IgG の γ 鎖あるいは Fc 部分に類似する epitope があると推測された。

成績には示していないが 50 kDa 分画を単離して、抗 IgG (Fc) 抗体と preincubate した上で抗 50 kDa あるいは抗 40 kDa 分画結合抗体と反応させ、ELISA により inhibition assay を試みたが、阻止されなかった。

RTE から SS-B 抗原を精製した従来の報告では、このような分子性状についての記載はみあたらないが、最近、高崎ら²⁶⁾ は RTE よりアフィニティー精製した 53 kDa SS-B 抗原分画にヒト IgG と交差反応を示す epitope が存在するらしいと述べており、あるいは同様の事象をみているのかもしれない。

また、粗 RTE について教室の阿部・赤保内²⁷⁾ が報告したように、本研究でも 50 kDa 付近のバンドが正常ヒト血清との反応で認められた (Fig. 2)。しかし、このバンドは二次抗体のみとは反応が認められず、ヒト血清との非特異的な反応であると推測され、精製 RTE 中の 50 kDa 分画とは異なるものであると考えられた。

本研究ではアフィニティー精製 SS-B 抗原にはヒト IgG の Fc 部分に類似する epitope があることを示す成績を得たが、その詳細は不明で今後の検討課題である。精製 SS-B 抗原に IgG の contamination あるいは IgG との複合体が混じていないかとの疑問は、抗ヒト IgG (Fab')₂ 抗体との反応がみられない点から、その可能性は否定的と思われた。またアフィニティークロマトグラフィーにより、Fc 部分が付加されたとも考え難い。

Mamula *et al.*^{28,29)} は SS-A 抗原に対して作製した家兎抗体がヒトおよびウシ IgG と交差反応を示すことを報告し抗 SS-A 抗体とリウマチ因子 (RF) との関係を考察している。本研究で使用した Ni 血清は RF 陰性であったが、SS-A 沈降抗体陽性患者血清の 70% に RF が認められる³⁰⁾ ことから、抗 SS-B 抗体にも RF 様の抗体活性が存在したり、あるいは患者血清中に抗 SS-B 抗体とは別に存在する RF が反応に関与する可能性も推測される。

いずれにせよ今後追及すべき課題と考えられる。

以上、RTE 中の SS-B 抗原の分子性状について新たな知見を得た。そこで抗 SS-B 抗体を検出するには、二次抗体と非特異的な反応を示さない 40 kDa SS-B 分画が適していると考え、これを単離した。

本研究において第二に指摘したい点は、40 kDa SS-B 分画を SDS-PAGE 後のゲルから電気泳動的溶出により単離したことである。この方法の重要な条件は SDS-PAGE での蛋白の均一な泳動、分離である。次に、目的とする蛋白のゲルの正確な位置の決定と、その切断の問題であった。本研究では SDS-PAGE 後のゲルを分子量マーカーのレーンと SS-B 抗原のレーンに分断し、前者のみ NC 膜に転写し後者はサララップで覆い 4°C 内に一晚保存した。一般にゲル内の蛋白分子は時間とともにゲル内を拡散していくといわれている。この点本研究では基礎実験を行い、一晚保存したゲル中の蛋白を NC 膜に転写しても、そのバンドのパターンが全く保持されていることを確認した。その上で 2・3・4 で記したように、分子量マーカーを基準に 40 kDa 位のゲルを 2 mm 幅に、市販の硬質の薄いステンレス板を使用して切断した。電気泳動的溶出法は高価な器具や装置を必要とせず、比較的短時間で抗原蛋白の抽出ができるが、抽出試料からの SDS の除去は蒸留水と PBS に十分透析して行った。鈴木³¹⁾ は磷酸カリウム緩衝液により除去している。いずれにしても、このような SDS-PAGE 後の電気泳動的溶出法は自己抗原等の特定の分画の単離に有用であると考えられる。

さて本研究ではこの精製 40 kDa SS-B 分画を用い、ELISA で各種膠原病患者血中の同抗体価を測定し、いくつかの知見を得た。

この ELISA により、Ouchterlony 法よりも高感度に、しかも定量的に抗 SS-B 抗体を検出できた。まず、抗 40 kDa SS-B 抗体を Ig クラス別にみると、IgG 型が主体であり、さらに IgG 型単独陽性がほとんどであった。IgG 型抗体の陽性率は SjS で 70.5% と特に高値を示した。本研究のような SS-B 抗原の特定の分画についての Ig クラスの報告はないが、Manthorpe *et al.*³²⁾ は

primary SjS と SLE を合併した secondary SjS で IgG 型および IgM 型が優位であり、HLA-Dw 2, Dw 3 との関連を指摘している。また IgG サブクラスでは IgG 1 が主体との報告が多い^{33,34)}。

次に、臨床検査所見との関係を見ると、IgG 型抗体陽性例は陰性例より末梢血白血球数およびリンパ球数の減少を、逆に高 γ -グロブリン血症が著明である傾向を示し、特に SjS で顕著であった。

これらの成績は最近の諸家の報告^{15,24,35)} と類似しており、単離した 40 kDa SS-B 分画による ELISA の有用性を示すものといえよう。しかし、本研究では抗 40 kDa SS-B 抗体と SjS や SLE の個々の臨床症状との間には、特記すべき関連性を検出するには至らなかった。文献的には抗 SS-B 抗体と purpura¹⁵⁾, spleen enlargement³⁵⁾ 等、extraglandural な症状との関係を指摘した報告があるが、一定した見解はない。本研究では 40 kDa 分画抗体価の測定時における観察にすぎないので、今後さらに症例を増して、個々の例で抗体価の変動と臨床症状の推移を、経過を追って調査し結論を得たいと考えている。また、SS-B 抗原の機能については不明な点が多く、それと自己免疫病態の形成との関連性を明らかにする必要がある。

5 要 約

家兎胸腺アセトン粉末 (RTE) から、硫酸塩析およびアフィニティークロマトグラフィーにより SS-B 抗原を精製し、Western blot 法により抗 SS-B 抗体の対応抗原について解析した。また精製 40 kDa SS-B 分画を用いて ELISA を確立し、患者血清中の抗 SS-B 抗体を測定し、臨床検査所見を対比して、次の成績を得た。

1) アフィニティークロマトグラフィー精製 SS-B 抗原は抗 SS-B 抗体陽性血清との反応で 50 kDa, 40 kDa および 28 kDa 分画を示した。このうち 40 kDa 分画は抗 SS-B 抗体とのみ反応したが、50 kDa 分画は抗ヒト IgG (Fc) 抗体とも反応した。

2) この 50 kDa 分画上には、抗 SS-B 抗体に反応する 40 kDa 分画と共通の epitope 以外に、ヒト IgG の Fc 部分に類似した epitope が存在すると考えられた。

3) ゲル片からの電気泳動的溶出により 40 kDa SS-B 分画を単離し、ELISA で各種膠原病患者血中の抗 40 kDa SS-B 抗体を Ig クラス別に定量的に測定することを可能にした。

4) 血中抗 40 kDa SS-B 抗体は IgG 型が主体であり、ELISA の cut off 値を 0.06 (O. D.₄₀₅) とすると、各疾患別陽性率は SjS 34 例中 24 例 (70.5%)、SLE 29 例中 13 例 (44.8%)、PSS/PM 10 例中 2 例 (20%) で

あり、SjS で陽性率、抗体価とも高値を示した。また ELISA による IgG 型抗体価と Ouchterlony 法による抗体価は全体として、相関 ($r=0.62$, $p<0.05$) を示した。なお、IgA 型および IgM 型は一般に低値を示した。

5) SLE と SjS において、IgG 型抗 40 kDa SS-B 抗体陽性および陰性の 2 群を比較すると、抗体陽性群において末梢血白血球数およびリンパ球数の減少、 γ -グロブリン値および IgG 値の増加を示す傾向がみられ、特に SjS で顕著であった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御査閲いただいた内科学第 1 講座谷内 昭教授、御指導いただいた手稲ルカ病院院長赤保内良和先生に深謝いたします。本研究の一部は厚生省特定疾患調査研究費、混合性結合組織病・粕川班 (谷内) および北海道特定疾患研究費の補助による。

文 献

1. Alspaugh, M. A., Talal, N. and Tan, E. M.: Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **19**, 216-222 (1976).
2. Venables, P. J. W., Charles, P. J., Buchanan, R. R. C., Yi, T., Mumford, P. A., Schrieber, L., Room, G. R. W. and Maini, R. N.: Quantitation and detection of isotypes of anti-SS-B antibodies by ELISA and Farr assays using affinity purified antigens. *Arthritis Rheum.* **26**, 146-155 (1983).
3. Venables, P. J. W., Smith, P. R. and Maini, R. N.: Purification and characterization of the Sjögren's syndrome A and B antigens. *Clin. Exp. Immunol.* **54**, 731-738 (1983).
4. Deng, J.-S., Sontheimer, R. D. and Gilliam, J. N.: Molecular characteristics of SS-B/La and SS-A/Ro cellular antigens. *J. Invest. Dermatol.* **84**, 86-90 (1985).
5. Herrera-Esparza, R., Halim, H. Y., Provost, T. T. and Diaz, L. A.: A sensitive and specific assay to detect Ro (SS-A) and La (SS-B) antibodies. *J. Invest. Dermatol.* **86**, 217-221 (1986).
6. Elkon, K. B. and Culhane, L.: Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. *J. Immunol.* **132**, 2350-2356 (1984).
7. Smith, G., Morrison, C. A. and Maddison, P. J.: The effect of La(SSB) on PWM-induced immunoglobulin synthesis by anti-La(SSB) positive

- SLE patients and healthy controls. *Clin. Exp. Immunol.* **68**, 552-561 (1987).
8. Chan, E. K. L., Francoeur, A. M. and Tan, E. M.: Epitopes, structural domains, and asymmetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein. *J. Immunol.* **136**, 3744-3749 (1986).
 9. Elkon, K. B. and Jankowski, P. W.: Fine specificities of autoantibodies directed against the Ro, La, Sm, RNP, and Jo-1 proteins defined by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *J. Immunol.* **134**, 3819-3824 (1985).
 10. Hoch, S. O. and Billings, P. B.: Characterization of the La(SS-B) antigen from several mammalian sources. *J. Immunol.* **133**, 1397-1403 (1984).
 11. McNeilage, L. J., Whittingham, S., Jack, I. and MacKay, I. R.: Molecular analysis of the RNA and protein components recognized by anti-La (SS-B) autoantibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **62**, 685-695 (1985).
 12. Bach, M. and Palau, J.: SS-B(La) nuclear antigen: fast and non-degradative procedure to prepare SS-B extracts free from other nuclear antigens. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **370**, 81-85 (1989).
 13. Teppo, A.-M., Gripenberg, M., Kurki, P., Baklien, K., Helve, T. and Wegelius, O.: Purification and characterization of a nuclear SS-B antigen. *Scand. J. Immunol.* **15**, 1-7 (1982).
 14. Teppo, A.-M.: Enzyme immunoassay of antibodies to Sjögren's syndrome B antigen. *Clin. Chem.* **27**, 1341-1345 (1981).
 15. Harley, J. B., Alexander, E. L., Bias, W. B., Fox, O. F., Provost, T. T., Reichlin, M., Yamagata, H. and Arnett, F. C.: Anti-Ro(SS-A) and anti-La (SS-B) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **29**, 196-206 (1986).
 16. Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N. and Winchester, R. J.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **25**, 1271-1277 (1982).
 17. 大藤 眞: 昭和52年度研究報告総括, 厚生省特定疾患シェーグレン病調査研究班 昭和52年度研究業績, 3-6 (1978).
 18. Laemmli, U. K. and Favre, M.: Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **80**, 575-599 (1973).
 19. 赤保内良和, 細川寿和, 野村孝幸, 森 正光, 阿部 敬, 谷内 昭: MCTD患者における抗ENA抗体. 厚生省特定疾患混合性結合組織病調査研究班. 治療・病型・肺高血圧症に関するシンポジウム記録, 92-104 (1987).
 20. 中野明彦: バスツールカラムを用いたタンパク質の電気溶出法—抗原の精製法として— *生化学* **59**, 1161-1163 (1987).
 21. Ben-Chetrit, E., Chan, E. K. L., Sullivan, K. F. and Tan, E. M.: A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J. Exp. Med.* **167**, 1560-1571 (1988).
 22. Lieu, T.-S., Jiang, M., Steigerwald, J. C. and Tan, E. M.: Identification of the SS-A/Ro intracellular antigen with autoimmune sera. *J. Immunol. Methods* **71**, 217-228 (1984).
 23. de Rooij, D. J., van de Putte, L. B., Habets, W. J., Verbeek, A. L. and van Venrooij, W. J.: The use of immunoblotting to detect antibodies to nuclear and cytoplasmic antigens. *Scand. J. Rheumatol.* **17**, 353-364 (1988).
 24. Hansen, B., Larsen, P. and Manthorpe, R.: SS-B/La antigen purification, and ELISA detection of anti-SS-B/La antibodies in sera from patients with inflammatory connective tissue diseases. *Allergy* **43**, 577-585 (1988).
 25. Habets, W. J., den Brok, J. H., Boerbooms, A. M. Th., van de Putte, L. B. A. and van Venrooij, W. J.: Characterization of the SS-B(La) antigen in adenovirus-infected and uninfected HeLa cells. *EMBO Journal* **2**, 1625-1631 (1983).
 26. 高崎芳成, 田村裕昭, 児玉智絵, 児玉 章, 北村和之, 渡辺 博, 橋本博史, 廣瀬俊一: モノクローナル抗体を用いたヒト IgG 交差反応性 53 Kd および 50 Kd SS-B ポリペプチドの関連性の検討. 第17回日本臨床免疫学会総会抄録集 284 (1989).
 27. 阿部 敬, 赤保内良和: 混合性結合組織病における血中免疫複合体と抗ENA抗体に関する研究. *札幌医誌* **56**, 275-289 (1987).
 28. Mamula, M. J., Fox, O. F. and Harley, J. B.: Cross-reactivity of Ro/SSA and immunoglobulin G (abstract). *Arthritis Rheum.* **28(Suppl.)**, 37 (1985).
 29. Mamula, M. J., Fox, O. F., Yamagata, H. and Harley, J. B.: The Ro/SSA autoantigen as an immunogen.—some anti-Ro/SSA antibody binds IgG—. *J. Exp. Med.* **86**, 1889-1901 (1986).
 30. Maddison, P., Mogavero, H., Provost, T. T. and Reichlin, M.: The clinical significance of autoantibodies to a soluble cytoplasmic antigen in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J. Rheumatol.* **6**, 189-195

- (1979).
31. 鈴木春男：タンパク質溶液中のドデシル硫酸の簡単な除去法. *生化学* **61**, 109-111 (1989).
 32. Manthorpe, R., Teppo, A.-M., Bendixen, G. and Wegelius, O.: Antibodies to SS-B in chronic inflammatory connective tissue diseases. *Arthritis Rheum.* **25**, 662-667 (1982).
 33. Pearce, D. C., Yount, W. J. and Eisenberg, R. A.: Subclass restriction of anti-SS-B(La) autoantibodies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **38**, 111-119 (1986).
 34. Bonfa, E., Llovet, R. and Elkön, K.: Immunoblot analysis of IgG subclasses of multiple lupus autoantibodies. *J. Immunol.* **140**, 2231-2236 (1988).
 35. Montecucco, C., Bestagno, M., Cerino, A., Caporali, R., Carnevale, R., Longhi, M., Pedrini, M. A. and Astaldi-Ricotti, G. C. B.: Anti-SSB/La antibodies in Sjögren's syndrome and related autoimmune diseases. Results of a quantitative immunoassay using a highly purified antigen. *Clin. Exp. Rheumatol.* **7**, 5-11 (1989).

別刷請求先：

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 細川寿和