

アイソトープ標識 DNA を用いた 抗変性 DNA 抗体の測定

第 1 編

検出法の基礎的検討

岡山大学第三内科（主任：大藤 真教授）

更 井 哲 夫

（昭和56年2月12日受稿）

結 言

全身性エリテマトーデス（SLE）患者の血清中には多彩な自己抗体がみられるが、最も特徴的なものとして、核成分の一つである DNA に対する抗体がある。DNA と反応する抗体は、DNA 抗原の2次構造である2本鎖（native）DNA と1本鎖（denatured）DNA の構造の差異により異なった反応性を示し、i）native(n-)DNA と反応する抗体、ii）n-DNA, denatured (d-) DNA の双方と反応する抗体、iii) d-DNA と反応する抗体の3種に大別される¹⁾。

n-DNA と反応する抗体は SLE に疾患特異性が高く、とくにループス腎炎の重症度と良い相関を示すため、その抗体価は日常的に測定され、関連文献も数多い^{2)-4), 10)-14), 18)}。

一方 d-DNA と反応する抗体については、従来ゲル内沈降反応⁴⁾、補体結合反応⁵⁾、受身的血球凝集反応⁶⁾等により測定されていたが、d-DNA にみられる抗補体作用、強いイオン結合等の非特異的反応により、感度、特異性、再現性、定量性等について、満足できる方法はなかった。

近年 Radioimmunoassay (RIA) を応用し、アイソトープ標識 n-DNA を抗原として、血清γ-グロブリンとの直接結合により抗 n-DNA 抗体価を求めることができるようになったが、d-DNA に対する抗体価測定の場合には抗原 d-DNA と血清との間の非特異的な結合が強く、実用の段階に至っていなかった。

今回、特異性、感度共に優れた抗 d-DNA 抗体の測定を目標として、¹⁴C-d-DNA, ¹²⁵I-d-DNA を抗原とした硫酸法ならびにフィルター法による抗 d-DNA 抗体価の測定法に種々の改良を加えて再検討を試みた。加えて、当科において日常抗 n-DNA 抗体価測定時に用いている ³H-Actinomycin D-n-DNA を作製する方法を応用し、d-DNA に ³H-Actinomycin D を標識したのも抗原とし、硫酸法、Polyethylene Glycol (PEG) 法にて抗 d-DNA 抗体価を測定し、各種標識抗原、各種測定法の特徴を検討したので報告する。

対 象

アメリカリウマチ協会の SLE 診断予備基準⁷⁾を満たす SLE 患者の急性期（active）群血清9例、寛解期（inactive）群血清28例、当科医師を中心とする正常人血清（NHS）15例、骨髓腫患者血清6例、Plescia らの方法⁸⁾に準じて作製した抗 d-DNA 抗体家兔血清(anti d-DNA RS)3例、正常家兔血清(NRS)3例、以上の血清について種々の方法論にて抗 d-DNA 抗体価を比較検討した。

方 法

1) ゲル内2重沈降反応

リン酸緩衝液(0.01M, pH7.2, 0.15M NaCl)に0.6% Agarose (Sigma 社製)を煮沸溶解し、厚さ約2mmのプレートを作成した。沈降反応は孔径6mm、間隔2mmの配列を用いておこ

なった。d-DNA 抗原は Worthington 社製 Calf-Thymus DNA を SSC (0.15M NaCl, 0.015M Sodium Citrate) にて 500 μ g/ml に調製, 10 分間沸騰水浴中で加熱後, 氷水中にて急冷したものをを用いた。血清は 56 $^{\circ}$ C, 30 分間非働化して使用した。

2) アイソトープ標識 d-DNA の調製法

i) $^3\text{H}\cdot\text{Actinomycin D}\cdot\text{d-DNA}$: SSC を用いて 500 μ g/ml に調製した熱変性 Calf-Thymus DNA 溶液 50ml に $^3\text{H}\cdot\text{Actinomycin D}$ (Amersham 社製) 250 μ Ci を加え, 30 分間攪拌する。37 $^{\circ}$ C, 16 時間さらに反応の後, Visking tube に移し, 1 週間 SSC にて透析, この間頻回に SSC を交換した。透析液に漏出する遊離 $^3\text{H}\cdot\text{Actinomycin D}$ の放射能活性が消失したことを確認ののち, 標識抗原液を回収した。作成した $^3\text{H}\cdot\text{Actinomycin D}\cdot\text{d-DNA}$ 液は 0.1ml 中に d-DNA 50 μ g を含み, Specific Activity は d-DNA 1 μ g あたり 6,000~8,000cpm であった。

ii) $^{14}\text{C}\cdot\text{d-DNA}$: Thymine-2- ^{14}C を培養液に加えて培養した E. Coli より抽出精製した $^{14}\text{C}\cdot\text{DNA}$ を Amersham 社より求め, 必要に応じて KUBOTA Insonator Model 200M を用いて 2.5A, 15 秒間超音波処理をおこない, その後 100 $^{\circ}$ C 10 分間加熱の後急冷して $^{14}\text{C}\cdot\text{d-DNA}$ を得た。Specific Activity は 37~42 μ Ci/mg であった。

iii) $^{125}\text{I}\cdot\text{d-DNA}$: Commerford⁹⁾ の方法に準じておこなった。Worthington 社製 Calf Thymus DNA を 0.15M NaCl に溶解し, 2,000 μ g/ml に調製, 必要に応じて KUBOTA Insonator Model 200M を用いて 2.5A, 20 秒間超音波処理をおこない, 10 分間沸騰水中にて加熱の後急冷の熱変性を加えて Calf-Thymus d-DNA とした。この d-DNA 抗原液 300 μ l, 0.5M Sodium Acetate Buffer (pH5.0) 300 μ l, New England Nuclear 社製標識用 $^{125}\text{I}\cdot 100\mu\text{Ci}$ を混和し, 56 $^{\circ}$ C 60 分間反応, 直ちに 0.05 M Borate Buffer (pH8.3, 0.15M NaCl) を用いて Sephadex G50 カラムを通過させ, 遊離の ^{125}I を除去した後, 4 $^{\circ}$ C にて保存した。Specific Activity は $8 \times 10^4 \sim 9 \times 10^4$ cpm/ μ g であった。

3) 抗 d-DNA 抗体価測定法

i) 半飽和硫酸法

① $^3\text{H}\cdot\text{Actinomycin D}\cdot\text{d-DNA}$ を抗原とした場合

$^3\text{H}\cdot\text{Actinomycin D}\cdot\text{d-DNA}$ 50 μ g (100 μ l), 56 $^{\circ}$ C 30 分間非働化処理した血清 100 μ l, 0.05 M Borate Buffer (pH8.3, NaCl 0.15M) 1 ml を混和し, 37 $^{\circ}$ C 60 分間, 4 $^{\circ}$ C 18 時間反応させた。ついで等量 (1.2ml) の 4 $^{\circ}$ C 飽和硫酸液を加え, よく振盪混和後, 2,000G, 20 分間遠心分離, 沈澱物を半飽和硫酸液に再浮遊し, 2,000G 20 分間遠心分離, 沈澱物を得て, NCS solubilizer (Amersham 社) 1 ml に溶解, トルエンシンチレーター (PPO 7 gr, POPOP 0.36 gr. in / l toluene) 9 ml を加えシンチレーションバイアルに移し, 液体シンチレーションカウンターにて, 検体の放射能活性を測定した。抗 d-DNA 抗体価は $^3\text{H}\cdot\text{Actinomycin D}\cdot\text{d-DNA}$ Binding として次式より算定した。

$^3\text{H}\cdot\text{Actinomycin D}\cdot\text{d-DNA}$ Binding =

$$\frac{\text{沈澱物の dpm}}{\text{加えた標識抗原 } 50\mu\text{g の dpm}} \times 100$$

② $^{14}\text{C}\cdot\text{d-DNA}$ を抗原とした場合

超音波処理を加えない $^{14}\text{C}\cdot\text{d-DNA}$ 0.2 μ g を含む前述ホウ酸緩衝液 90 μ l, 56 $^{\circ}$ C 30 分間非働化した血清 10 μ l を 37 $^{\circ}$ C 60 分, 4 $^{\circ}$ C 18 時間反応させた後, 4 $^{\circ}$ C にて飽和させた硫酸溶液 100 μ l を加え混和し, 2,000G 20 分間遠沈した。上清を吸引除去し沈渣に半飽和硫酸液 2 ml を加え混和の後再度 2,000G 20 分間遠沈して沈渣を得た。沈渣に NCS ならびにトルエンシンチレーターの添加をおこない, 放射能活性を測定した。抗 d-DNA 抗体価は $^{14}\text{C}\cdot\text{d-DNA}$ Binding として次式より算定した。

$^{14}\text{C}\cdot\text{d-DNA}$ Binding =

$$\frac{\text{沈澱物の dpm}}{\text{加えた } ^{14}\text{C}\cdot\text{d-DNA } 0.2\mu\text{g の dpm}} \times 100$$

③ $^{125}\text{I}\cdot\text{d-DNA}$ を抗原とした場合

超音波処理を加えない $^{125}\text{I}\cdot\text{d-DNA}$ 1 μ g を含むホウ酸緩衝液 450 μ l, 非働化血清 50 μ l を混和し, 37 $^{\circ}$ C 60 分 4 $^{\circ}$ C 18 時間反応させた後, 前述の

反応系と同様な遠心処理を加え、沈渣を半飽和硫酸液 1 ml に再浮遊し遠沈処理を加えた後の沈澱に含まれる放射能活性を γ -シンチレーションカウンターにて測定した。抗 d-DNA 抗体価は ^{125}I -d-DNA Binding として次式より算定した。

$$^{125}\text{I}\cdot\text{d-DNA Binding} = \frac{\text{沈澱物の cpm}}{\text{加えた } ^{125}\text{I}\cdot\text{d-DNA } 1 \mu\text{g の cpm}} \times 100$$

ii) フィルター法

① ^{14}C -d-DNA を抗原とした場合

10 μl の非働化血清に 90 μl のホウ酸緩衝液を加え、15 秒間超音波処理を加えた 0.2 μg の ^{14}C -d-DNA を含むホウ酸緩衝液 100 μl と 37°C 30 分間反応の後、2 ml の冷 SSC を加えて反応を止めた。以上の反応系を -10 mmHg の陰性で、あらかじめ湿らせた HAWPO2,500 ミリポアフィルターに通過させ、次いで 5 ml の純水を通してフィルターを洗浄した。フィルターをシンチレーションバイアルに移し、熱風を用いて乾燥の後、10 ml のトルエンシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターにて、フィルターに捕捉された放射能活性を測定した。抗 d-DNA 抗体価は、加えた抗原の dpm でサンプルの dpm を除し、百分率で表現した。

② ^{125}I -d-DNA を抗原とした場合

10 μl の非働化血清に 90 μl のホウ酸緩衝液を加え、0.5 μg の 20 秒間超音波処理を加えた ^{125}I -d-DNA を含むホウ酸緩衝液 100 μl と 37°C 30 分間反応させた。フィルター通過は ^{14}C -d-DNA の場合と同様におこない、洗浄後のフィルターはポリスチレンチューブに移し、 γ -カウンターを用いて放射能活性を測定した。抗 d-DNA 抗体価は、加えた抗原の cpm でサンプルの cpm を除し、百分率で表現した。

iii) 硫酸法、ならびにフィルター法における緩衝液の pH、イオン強度についての検討

pH の検討には 0.15M NaCl を加えた 0.02M Tris-HCl 緩衝液の pH 6.7, 7.3, 8.3, 9.0 について SLE 血清と正常人血清の抗 d-DNA 抗体価を測定し、イオン強度の検討には pH 8.3 の 0.05 M ホウ酸緩衝液に 0.05M, 0.1M, 0.15M, 0.2

M, 0.4M の NaCl を加えたものを用いて同様に抗体価を測定することによりおこなった。

iv) Polyethylene Glycol 法

^3H -Actinomycin D-d-DNA 50 μg を含む抗原液 100 μl 、非働化血清 100 μl 、ホウ酸緩衝液 (0.05M, pH 8.3, 0.15M NaCl) 1 ml を反応系とし、37°C 60 分間、4°C 18 時間反応の後、種々の濃度の Polyethylene Glycol (PEG) 液を等容加え充分混和、2,000G 20 分間 4°C で遠沈した。得られた沈澱を最終濃度の PEG に再浮遊させ同じ条件で遠沈。上清を除去し、沈渣に 1 ml の NCS を加え溶解させた後、トルエンシンチレーター 10 ml を加え、シンチレーションバイアルに移したのち、液体シンチレーションカウンターにて沈渣の放射能活性を測定した。抗体価は沈渣の放射能活性を、加えた抗原の全放射能活性で除し、百分率で表現した。

結 果

1) ^{14}C -d-DNA ならびに ^{125}I -d-DNA を抗原とした抗 d-DNA 抗体価の測定

① 硫酸法の基礎的検討

i) 抗原に加える超音波処理の程度と血清の結合能の比較

^{14}C -d-DNA, ^{125}I -d-DNA の各々を抗原とし、

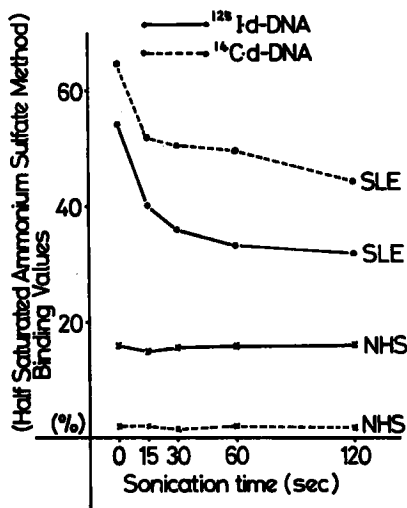


Fig.1 ^{14}C -d-DNA and ^{125}I -d-DNA bindings of SLE and normal human sera in relation to time of sonication to antigens, assayed by half saturated ammonium sulfate method.

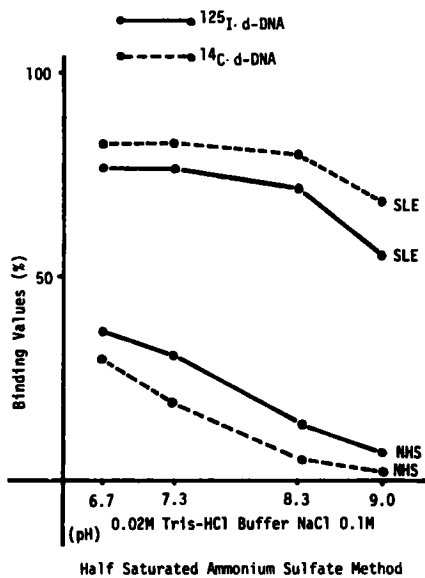


Fig. 2a

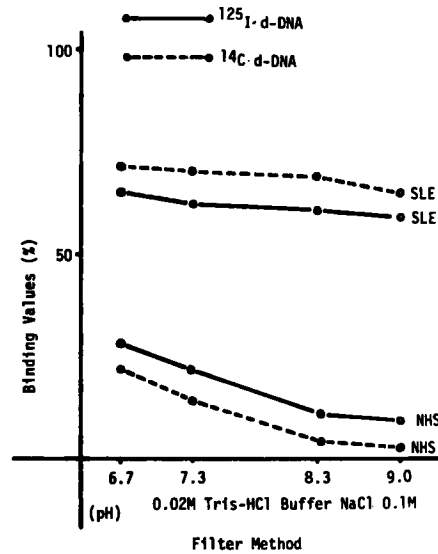


Fig. 2b

Fig.2 ^{14}C -d-DNA and ^{125}I -d-DNA bindings of SLE and normal human sera in 0.02M Tris-HCl 0.1M NaCl buffers of various pH assayed by (a) half saturated ammonium sulfate method and (b) filter method.

0.05 M ホウ酸緩衝液 pH8.3, 0.15M NaCl を用いた場合に、抗原に対する超音波処理の程度に応じて、SLE 血清の d-DNA 結合能は著明に低下した (Fig. 1)。一方正常人血清の d-DNA 結合能は常に低値を示した。

ii) 反応系緩衝液の結合能に対する影響

Fig. 2a に示すように様々な pH に調製した 0.02M Tris-HCl, 0.15M NaCl 緩衝液を用い、正常人と SLE 血清の結合能を検討した。pH8.3 の緩衝液を用いた時に、正常人血清の結合能は低値である一方、SLE 血清の結合能を高値に保つことができた。また緩衝液のイオン強度については、pH8.3, 0.15M NaCl の 0.05M ホウ酸緩衝液を用いた場合に、SLE 患者血清の結合能は高値を保ち、正常人血清の結合能は低値であった (Fig. 3a)。

iii) アイソトープ標識 d-DNA と血清との反応時間

Fig. 4a に示すように、混和後 37℃ で各時間における結合能を検討した結果、37℃ 60 分間 4℃ 18 時間の反応で満足する結果を得た。

iv) 硫酸法の再現性

SLE 血清 23 検体について同一検体を再検することにより検討したが、 ^{14}C -d-DNA を抗原とした時には $\gamma=0.98$ ($P<0.05$)、 ^{125}I -d-DNA を抗原とした時には $\gamma=0.92$ ($P<0.005$) の相関関係を示した。

② フィルター法の基礎的検討

i) 抗原に加える超音波処理の程度と血清結合能の比較

d-DNA に対し強い反応性を有することを沈降反応で確認した SLE 患者血清について、正常人血清を対照とし、様々な程度の超音波処理をした d-DNA と血清との反応性を検討した (Fig. 5)。用いた緩衝液は pH8.3, イオン強度 0.15 のホウ酸緩衝液であった。未処理抗原では、 ^{14}C -d-DNA を抗原とした場合には、正常人血清は 44% の非特異的結合を示し、 ^{125}I -d-DNA を抗原とした場合には、正常人血清は 72% の非特異的結合を示していた。15 秒ないし 20 秒の超音波処理を加えると、 ^{14}C -d-DNA の場合 SLE 血清では 50% 以上の高い結合能を保ち得る一方で、正常人血清では 10% 以下の低い結合能を示していた。また ^{125}I -d-DNA の場合にも、SLE 血清ではや

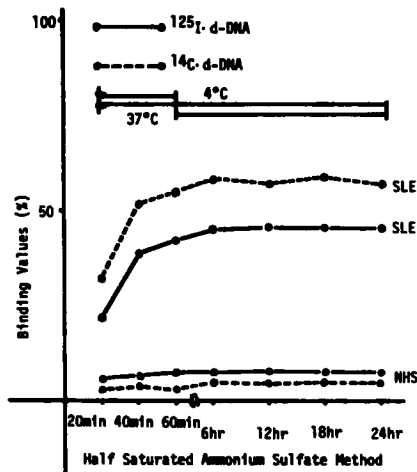


Fig. 3 Fig. 3a

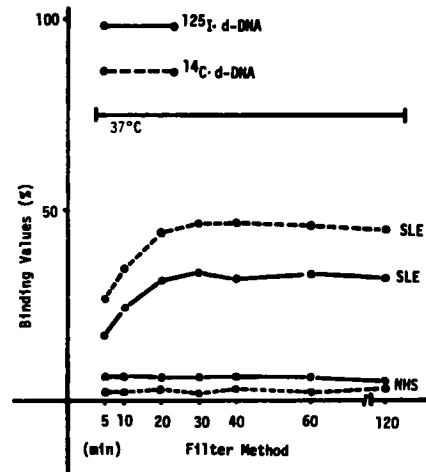


Fig. 3b

Fig. 3 ^{14}C -d-DNA and ^{125}I -d-DNA bindings of SLE and normal human sera in 0.05M borate buffers pH8.3 of increasing molarity, assayed by (a) half saturated ammonium sulfate method and (b) filter method.

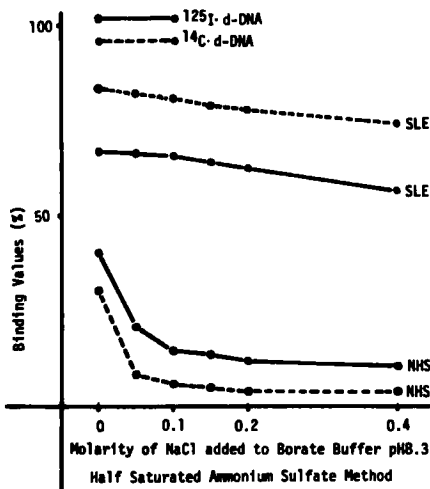


Fig. 4a

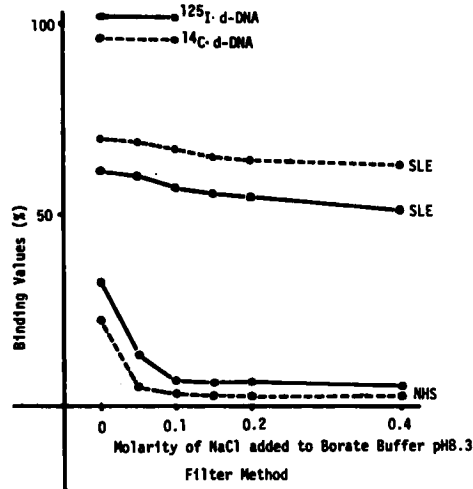


Fig. 4b

Fig. 4 Kinetics of DNA-anti DNA interactions assayed by (a) half saturated ammonium sulfate method and (b) filter method.

はり50%以上の高い結合能を保ち得る一方で、正常人血清では15%以下の低い結合能を示していた。しかし更に長時間超音波処理を加えた時には、 ^{14}C -d-DNA、 ^{125}I -d-DNA いずれの抗原の場合にも SLE 血清の結合能は著明に低下した。

ii) 反応系緩衝液の結合能に対する影響

Fig. 2b に示すように種々の pH に調製した 0.02M Tris-HCl, 0.15M NaCl 緩衝液で検討した結果、pH8.3 の緩衝液を用いた時に、正常人血清の結合能は低値である一方、SLE 血清の結

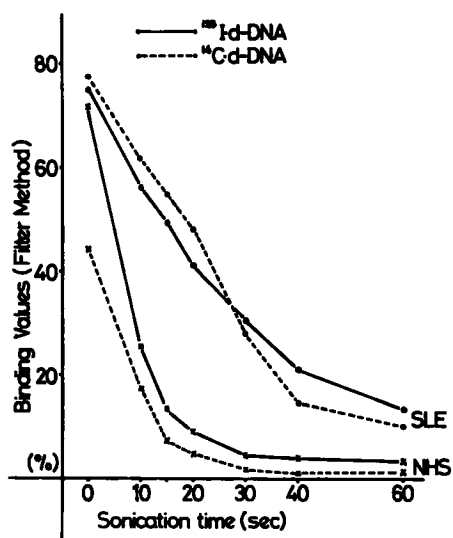


Fig. 5 ^{14}C -d-DNA and ^{125}I -d-DNA bindings of SLE and normal human sera in relation to time of sonication to antigens, assayed by filter method.

合能は高値に保つことができた。また緩衝液のイオン強度については、pH8.3, 0.05Mのホウ酸緩衝液に0.15MのNaClを加えたものが、SLE患者血清の結合能を高値に保ち、かつ正常人血清の結合能を低値に抑えることができた (Fig. 3b)。

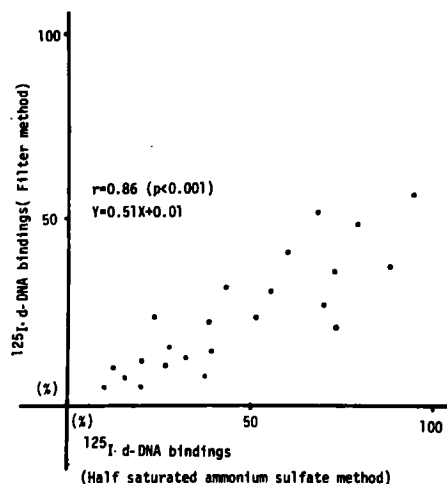


Fig. 6a

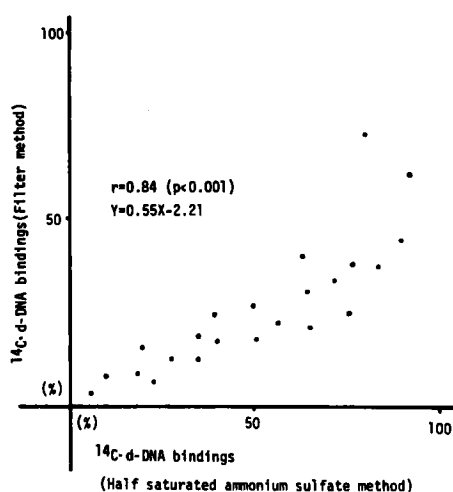


Fig. 6b

Fig. 6 Correlation between filter method and half saturated ammonium sulfate method in d-DNA bindings of SLE sera using (a) ^{125}I -d-DNA and (b) ^{14}C -d-DNA as antigens.

iii) アイソトープ標識 d-DNA と血清との反応時間

Fig. 4b に示すように、混和後37℃で各時間における結合能を検討した結果、37℃30分間の反応で満足すべき結果を得た。

iv) フィルター法の再現性

同一条件で超音波処理をおこなった抗原を用い、SLE 血清23検体について同一検体を再検することにより検討したが、 ^{14}C -d-DNA を抗原とした場合には $\gamma=0.94$ ($P<0.005$) の極めて良い相関関係を示した。

③ 測定法間の相関について

SLE23検体について、抗原2種、測定法2種による抗体価の測定をおこない、測定法間の相関を求めた。

i) 同一抗原を用いた、硫酸法による測定結果と、フィルター法による測定結果の比較

^{125}I -d-DNA を抗原とした時、硫酸法による測定結果とフィルター法による測定結果の相関は $\gamma=0.86$, $P<0.001$ であり、 ^{14}C -d-DNA を抗原とした硫酸法による測定結果と、フィルター法による測定結果の相関は $\gamma=0.84$, $P<0.001$ であった (Fig. 6)。

ii) 硫酸法における ^{14}C -d-DNA 結合能と ^{125}I -d-DNA 結合能の相関、フィルター法における ^{14}C -d-DNA 結合能と ^{125}I -d-DNA 結合能の相関。

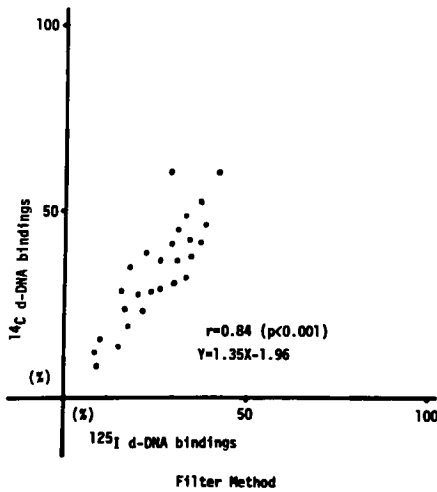


Fig. 7a

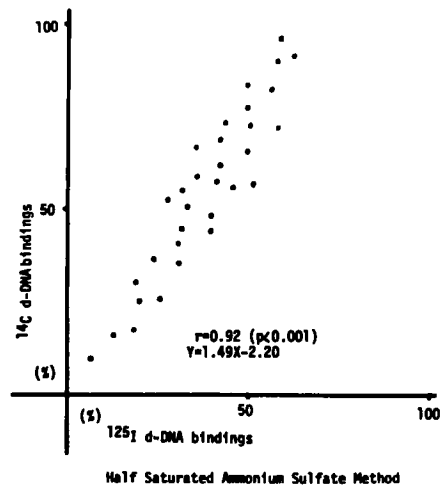


Fig. 7b

Fig. 7 Correlation between ^{125}I -d-DNA and ^{14}C -d-DNA bindings of SLE sera assayed by (a) filter method and (b) half saturated ammonium sulfate method.

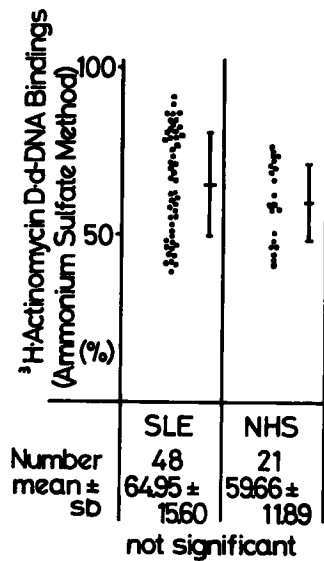


Fig. 8 ^3H -Actinomycin D d-DNA bindings of SLE and normal human sera assayed by half saturated ammonium sulfate method.

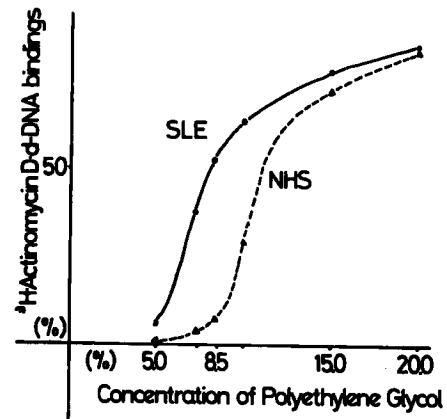


Fig. 9 ^3H -Actinomycin D-d-DNA bindings of SLE and normal human serum in relation to concentration of polyethylene glycol assayed by polyethylene glycol method.

異なった2種の抗原を用いた硫酸法における相関は $\gamma=0.92$, $P<0.001$, フィルター法における相関は $\gamma=0.84$, $P<0.001$ であった(Fig.7).

2) ^3H -Actinomycin D-d-DNA を抗原とした抗 d-DNA 抗体価の測定

① 硫酸法を用いた測定結果

正常人血清の結合能が高値となり, SLE血清群との間に有意差を認めなかった (Fig. 8).

② PEG 法を用いた測定結果

種々の濃度の PEG を反応系に加え、抗体に結合した標識抗原と、遊離の標識抗原との分離を試みた結果、最終濃度8.5%のPEGを用いる時良好な分離を得た (Fig. 9). しかし ^3H -Actinomycin D-d-DNA を抗原とした PEG 法と ^{14}C -d-DNA を抗原としたフィルター法との関連をみたところ、 $r=0.64$, $P<0.01$ であった (Fig. 10).

この測定系における γ -グロブリン量の多寡による影響をみるため、正常人血清を用いた反応系に Cohn fraction II (Fr II) の各種濃度のものを加えたところ、加えた Fr II の量に比例して、結合能の上昇をみた (Fig. 11).

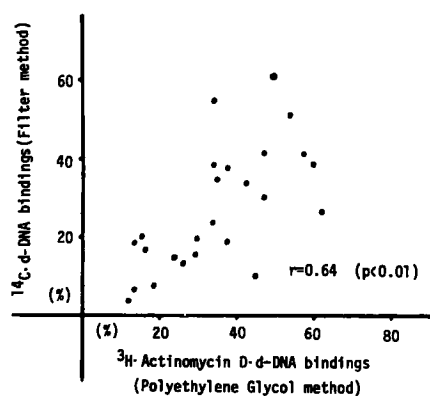


Fig. 10 Correlation between ^{14}C -d-DNA bindings assayed by filter method and ^3H -Actinomycin D-d-DNA bindings assayed by polyethylene glycol method.

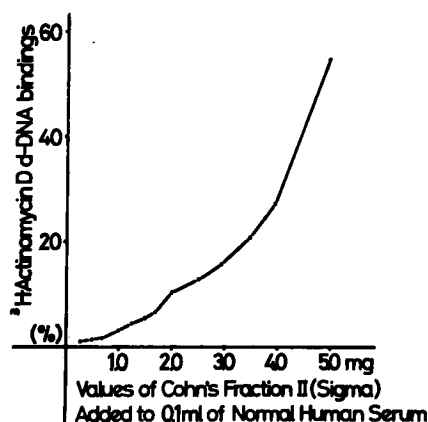


Fig. 11 ^3H -Actinomycin D-d-DNA bindings of normal human serum in relation to addition of Cohn fraction II.

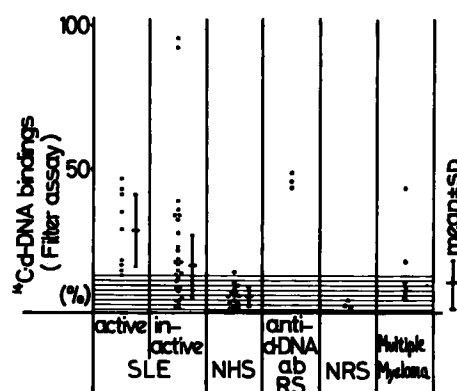


Fig. 12 ^{14}C -d-DNA bindings of several sera assayed by filter method.

3) 超音波処理 ^{14}C -d-DNA を抗原としたフィルター法で測定した各種疾患の抗d-DNA抗体価

SLE active, SLE inactive, NHS, 多発性骨髄腫患者血清 (M. Myeloma), Anti d-DNA RS, NRS における抗 d-DNA抗体価を測定した (Fig. 12). まず本法は d-DNA とのみ反応する抗 d-DNA 家兎血清の抗体価を良く把え、正常家兎血清の結合能は極めて低値であった。正常人血清における結合能の95%迄を含みうる範囲 (2 SD に相当) は8%の結合能迄であり、以下これを正常域とし、これ以上の結合能を示すものを抗 d-DNA 抗体陽性と決定した。SLE active は全例陽性、SLE inactive は64%陽性であったがそのうち2例に高い結合能を有するものがみられた。骨髄腫患者6例中2例に高値が認められたが、この血清は沈降反応では陰性、加えて ^{14}C -d-DNA を抗原とする硫酸法でも陰性であった。

考 按

1957年, Robbins¹⁰⁾, Holman¹¹⁾, Ceppellini¹²⁾ らが補体結合反応, Seligman¹³⁾ がゲル内沈降反応, Miescher ら¹⁴⁾ が受身赤血球凝集反応を用いて、DNA と反応する抗体が存在することを報告した。以上の報告者が使用した DNA は比較的純度の高いものであり、一部1本鎖部分の混入は考えられるものの、大部分は2本鎖構造を有

するものと考えられる。変性処理を加えた 1 本鎖 DNA と SLE 血清との反応は、1960 年 Barbu ら¹⁵⁾によりゲル内沈降反応を用いて最初に報告され、Levine ら⁵⁾も同年 phage T₄ DNA を熱変性させ、SLE 血清との反応性を補体結合反応を用いて報告している。以来 d-DNA と反応する抗体は様々な方法を用いて検出されているが、測定方法には以下の様な種々の問題点がある。まずゲル内沈降反応は最も簡便な方法であるが、感度が低く、補体結合反応は鋭敏な方法であるが、SLE 血清にみられる抗補体作用や、DNA 特に変性 DNA 自体の補体結合性により測定不能の場合があって適当ではない。受身赤血球凝集反応では d-DNA の血球に対する付着が不良であるとの報告⁶⁾があり、またベントナイトを応用した方法¹⁶⁾は凝集反応としては高い感度を有するものの、再現性に問題があるため、広く用いられていない。

こうして従来の抗 d-DNA 抗体検出法が全てを満足するものではないため、アイソトープ標識抗原と血清の直接結合能を用いて抗体価を表現することが試みられるようになった。しかし、RIA による抗 n-DNA 抗体価の測定については、n-DNA がイオン結合等の非特異的結合を示すことが少ないため感度、特異性について満足する結果が得られ、一般臨床検査に应用されている一方、抗 d-DNA 抗体価測定における RIA には多くの問題点があった。

1969 年 Carr ら¹⁷⁾は ³H-Actinomycin D により *in vitro* で標識した DNA を抗原とし、硫酸法を用いて抗 n-DNA 抗体価を測定しているが、熱変性した DNA に ³H-Actinomycin D で標識した抗原を用いた抗 d-DNA 抗体価の測定は、正常人血清での非特異的反応性がみられ、不適当であるとしている。我々が今回示した成績も、この結果を支持するものであった。また 1971 年 Cohen ら¹⁸⁾も硫酸法を用いた RIA で d-DNA に対する抗体価を測定しているが、やはり同様な測定法上の問題を記載している。1973 年 Tan ら¹⁹⁾は d-DNA に対する抗体をも測定する方法として、新たに Solidphase RIA を応用したが、この方法も再現性と定量性に難点を有している。

しかし 1974 年 Winfield ら²⁰⁾は、¹⁴C-d-DNA

を抗原とし、pH7.8 の Borate Saline Buffer の反応系を用いた反応系で、また 1975 年 Picazo ら²¹⁾は超音波処理を加えた ¹²⁵I-d-DNA を抗原とし、pH7.5 の Tris-HCl, 0.15M NaCl Buffer の反応系を用いたフィルター法により、d-DNA と反応する抗体を特異的かつ高感度に検出し、RIA を応用しての抗 d-DNA 抗体価測定が可能になったことを示した。

変性処理を加えた DNA は、本来の 2 本鎖構造が破壊されているため、水素結合等のイオン結合によって他の物質と結合しやすい。沈降反応を用いての検討は 1959 年 Deicher ら⁴⁾が pH5.1 の条件下で DNA と正常人血清との間に沈降反応がみられることを認め、この非特異的な反応も pH7.45, pH8.6 では消失することを報告している。今回 RIA 応用の場合にこうした条件を検討すべく、異なった pH, イオン強度の条件下で ¹⁴C-d-DNA, ¹²⁵I-d-DNA を抗原とした硫酸法での結合率を求めたが、緩衝液の pH は 8.3, イオン強度は 0.15 で特異的な血清との反応を得ることができた。またフィルター法の場合にも同様な pH, イオン強度の条件で d-DNA との結合能の測定が可能であった。

次に RIA を用いた抗 d-DNA 抗体価測定に際して、抗原 DNA の大きさと血清結合能の関連について検討を加えた。硫酸法において、標識 DNA に超音波処理を加えると、正常人血清の結合能は変らぬまま SLE 血清での結合能低下がみられるため、超音波処理を加えた抗原は不適当と考えられた。一方フィルター法において、従来 d-DNA はそれ自体フィルターに結合する為、抗 d-DNA 抗体の測定には適さぬと考えられ、むしろ n-DNA をフィルターに通すことにより n-DNA 抗原中に含まれていた d-DNA 部分を除去する目的にさえ用いられていた。今回フィルター法における d-DNA 抗原の非特異的付着を最小限に抑え、抗体価測定の特異性を高めるため、¹²⁵I-d-DNA, ¹⁴C-d-DNA とともに超音波処理を加え分子鎖を短かくした。すなわち 15 秒ないし 20 秒の超音波処理を加えた抗原と正常人血清との結合能は低値であり、同抗原と SLE 血清との結合能はなお高値を保つことが可能であった。しかし過度の超音波処理抗原を用いた場合

には、SLE 血清との結合能も著明に低下し、感度の低下を示した。こうしたことより、フィルター法では非特異的な付着を除くことのできる短時間の超音波処理が必要であり、硫酸法については超音波処理を加えぬ抗原が適当であることが判明した。

^3H -Actinomycin D を用いて DNA を標識する事は極めて容易であることから、我々は従来 ^3H -Actinomycin D-n-DNA を抗原とした硫酸法により、抗 n-DNA 抗体価を測定してきた。 ^3H -Actinomycin D は n-DNA のグアニンとシトシンの間に水素結合によって特異的に結合するものであるが、d-DNA に対しても強い結合性を示し、安定した標識抗原として用いることができる²²⁾。しかし、 ^3H -Actinomycin D-d-DNA を抗原とした硫酸法では、SLE 血清と正常人との間に結合能の差が認められず、測定不能であった。そこで抗体結合抗原と遊離抗原とを明確に分離することが可能な PEG 法を試みた。しかし PEG 法では血清蛋白量、特に γ -グロブリン量の影響を受けることが判明し、抗 d-DNA 抗体価の測定には不適当であると考えられた。なお Actinomycin D はそれ自体フィルターに結合する為²³⁾、Actinomycin D を用いて標識した抗原はフィルター法にも不適当である。

^{14}C -d-DNA は、 ^{14}C -Thymidine を *E. coli* にとりこませた後に抽出精製した ^{14}C -n-DNA を必要に応じて超音波処理し、熱変性を加えて得たものである。この抗原は、反応系の pH、イオン強度を適当なものとする限り、フィルター法に適した抗原であり、超音波処理を加えなければ硫酸法にも適した抗原である。特に抗 d-DNA 抗体と抗 n-DNA 抗体の 2 者を同時に測定し、両者の関係を検討する目的には ^{14}C -DNA は最も適したものと考えられる。

また今回用いた ^{125}I -d-DNA は 1971 年 Commerford⁹⁾、1972 年 Rosenberg²⁴⁾ が報告した方法に準じて作製した。本法は精製した Calf-Thymus DNA に熱変性を加え、d-DNA の Cytosine を酸化剤とともにヨード化し ^{125}I で標識したものである。1973 年 Keiser²⁵⁾ は本法を用いて n-DNA にも ^{125}I 標識が可能と報告しているが、ヨード化による変性部分の混在はさけられず、不適当

との見解がある。また ^{14}C -d-DNA を単に KI のみでヨード化すると処理前に比べ血清との結合能が低下するとの報告²⁶⁾があり、ヨード化標識の ^{125}I -d-DNA にも反応性の低下があらうと考えられる。しかし何よりの利点として、本法による d-DNA への標識は in-vitro で容易にしかも安価に可能であり、放射能活性の測定には一般に普及している γ -シンチレーションカウンターを使用することから、多数検体について抗 d-DNA 抗体価をスクリーニング的に求める際には適したものと考えられる。

抗体に結合した標識抗原と遊離標識抗原を分離する方法として、硫酸法、Solid-Phase 法、フィルター法等がある。今回用いた硫酸法は Farr の原理により Wold らによって紹介され、アイソトープ標識 DNA と抗体との反応を結合率で表現するものであり、半飽和硫酸の条件下で遠沈すると、遊離抗原は上清に、グロブリン分画の抗体に結合した抗原は沈渣に移行することを利用したものである。この硫酸法は抗 d-DNA 抗体価測定の場合、反応系の pH、イオン強度を選ぶことにより高い感度、特異性、再現性を有する。しかし 4℃ での遠沈操作を繰返す煩瑣な手技が必要であり、さらに分画した血清の抗体価を測定する際には、一定のグロブリン分画の沈渣を必要とするため、反応系に正常人血清を加える必要がある点で不利である。

フィルター法は、遊離標識抗原はフィルターを通過するものの、抗体に結合した標識抗原はフィルターに捕捉されることを応用し、フィルターの放射能活性を測定することにより抗体価を表現するものである。従来本法は抗 n-DNA 抗体価の測定に用いられ、抗 d-DNA 抗体価の測定には d-DNA 自体フィルターに付着する為非特異的結合が多く、不適当であるとされていた²³⁾。しかし、1975 年 Picazo ら²¹⁾ は標識 d-DNA に超音波処理を加え、抗原のフィルターへの非特異的付着を解決し、本法を用いての抗 d-DNA 抗体価測定を可能としている。フィルター法は用いる血清の増量や骨髓腫タンパクによっては非特異的結合を示すことがあるが、同一条件で作製した抗原を用い、フィルターの通過速度を一定とするならば、高い感度、特異性、

再現性を示し、短時間の測定で多数検体を処理し、各種血清分画、細胞培養上清、組織溶出物における抗体価の決定にも有力な手段といえよう。

結 論

抗 d-DNA 抗体価をアイソトープ標識 d-DNA と血清との結合率を用いて表現する際、 ^{14}C -d-DNA、 ^{125}I -d-DNA、 ^3H -Actinomycin D-d-DNA の 3 種の抗原を用い、抗体と結合した標識抗原を遊離抗原より分離する方法として硫酸法、フィルター法を応用し、以下の結果を得た。

1) ^{14}C -d-DNA、 ^{125}I -d-DNA の各々を抗原とした硫酸法、フィルター法において、用いる緩衝液の pH は 8.3、イオン強度は 0.15 が適当であった。

2) フィルター法においては標識 d-DNA に 15~20 秒の超音波処理を加えることが必要であった。しかし硫酸法では標識 d-DNA を超音波処理すると SLE 血清の結合能が低下することから、同処理は不必要と考えられた。

3) 硫酸法ならびにフィルター法で抗 d-DNA、抗 n-DNA の両抗体価を測定し比較する際には ^{14}C -DNA が最も適した抗原と考えられる。

4) ^{125}I -d-DNA は in-vitro で標識可能であり、容易に大量の作製が可能なることから、多数検体について抗 d-DNA 抗体を測定する際の抗原に適している。

5) ^{14}C -d-DNA、 ^{125}I -d-DNA それぞれを抗原とした硫酸法、フィルター法の結果は互いに良い相関関係を示し、抗 d-DNA 抗体を検出する上で特異性、感度、再現性に優れた方法であると考えられる。

6) ^3H -Actinomycin D-d-DNA を抗原とした硫酸法、8.5% Polyethylene Glycol 法はともに特異性の点で不適当と考えられた。

本稿の要旨は昭和 53 年 5 月第 22 回日本リウマチ学会総会、昭和 54 年 10 月第 29 回日本アレルギー学会総会において発表した。

稿を終るに当たり、終始御指導ならびに御高聞を頂いた恩師大藤真教授に深謝致します。

文 献

1. Arana, R. and Seligman, M.: Antibodies to native and denatured deoxyribonucleic acid in SLE. *J. Clin. Invest.* **46**, 1867—1882, 1967.
2. Tan, E.M., Schur, P.H., Carr, R.I. and Kunkel, H.G.: Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **45**, 1732—1740, 1966.
3. Koffler, D., Carr, R.I., Agnello, V., Thoburn, R. and Kunkel, H.G.: Antibodies to polynucleotides in human sera, antigenic specificity and relation to disease. *J. Exp. Med.* **134**, 294—312, 1971.
4. Deicher, H.R., Holman, H.R. and Kunkel, H.G.: The precipitin reaction between DNA and a serum factor in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **109**, 97—114, 1959.
5. Levine, L., Murakami, W.T., Van Vunakis, H. and Grossman, L.: Specific antibodies to thermally denatured deoxyribonucleic acid of phage T₄. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **46**, 1038—1043, 1960.
6. Levi, M.I. and Poverenny, A.M.: Use of the passive hemagglutination reaction for determining antibodies against deoxyribonucleic acid (DNA). *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **9**, 465—477, 1965.
7. Cohen, A.S., Reynolds, W.E., Franklin, E.C., Kulka, J.P., Ropes, M.W., Shulman, L.E. and Wallace, W.E.: Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull. Rheum. Dis.* **21**, 643—648, 1971.
8. Plescia, O.J., Braun, W., and Palczuk, N.C.: Production of antibodies to denatured deoxyribonucleic acid (DNA). *Biochem.* **52**, 279—285, 1964.
9. Commerford, S.L.: Iodination of nucleic acids in vitro. *Biochemistry* **10**, 1993—1999, 1971.
10. Robbins, W.C., Holman, H.R., Deicher, H. and Kunkel, H.G.: Complement fixation with cell nuclei and

- DNA in lupus erythematosus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **96**, 575—579, 1959.
11. Holman, H.R., and Kunkel, H.G.: Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. *Science* **126**, 162—163, 1957.
 12. Ceppellini, R., Polli, E., and Celad, F.: DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus difusus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **96**, 572—574, 1957.
 13. Seligman, M.: Evidence in the serum of patients with systemic lupus erythematosus of a substance producing a precipitation reaction with DNA. *C. R. Soc. Biol.* **245**, 243—245, 1957.
 14. Miescher, H.R. and Straessle, R.: New serological methods for detection of L.E. factor. *Vox Sang* **2**, 283—287, 1957.
 15. Barbu, E., Seligman, M., and Joly, M.: Reactions among variously denatured or degraded desoxyribonucleic acids and the anti-desoxyribonucleic antibodies in the blood of patients with DLE. *Ann. Inst. Pasteur* **99**, 695—707, 1960.
 16. Sturgill, B.C., Carpenter, R.R., Strauss, A.J.L., and Goodman, H.C.: Antibodies in systemic lupus erythematosus and myasthenia gravis which react with thermally denatured DNA coated bentonite. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **115**, 246—249, 1964.
 17. Carr, R.I., Koffler, D., Agnello, V., and Kunkel, H.G.: Studies on DNA antibodies using DNA labelled with actinomycin-D (^3H) or dimethyl (^3H) sulfate. *Clin. Exp. Immunol.* **4**, 527—536, 1969.
 18. Cohen, S.A., Hughes, G.R.V., Noel, G.L., and Christian, C.L.: Character of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* **8**, 551—561, 1971.
 19. Tan, M., and Epstein, W.V.: A solid-phase immunoassay for antibody to DNA and RNA. *J. Lab. Clin. Med.* **81**, 122—132, 1973.
 20. Winfield, J.B., and Davis, J.S.: Anti-DNA antibody in procainamide induced lupus erythematosus; detection using DNA fractionated by methylated albumin kieselguhr chromatography. *Arthritis Rheum.* **17**, 97—110, 1974.
 21. Picazo, J.J., and Tan, E.M.: Specificities of antibodies to native DNA. *Scand. J. Rheumatology Suppl.* **11**, 35—41, 1975.
 22. Gellert, M., Smith, C.E., Naville, D., and Felsenfeld, G.: Actinomycin binding to DNA; mechanism and specificity. *J. Mol. Biol.* **11**, 445—457, 1965.
 23. Ginsberg, B., and Keiser, H.: A millipore filter assay for antibodies to native DNA in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **16**, 199—207, 1973.
 24. Rosenberg, B.J., Erlanger, B.F., and Beiser, S.M.: Radioimmunochemical studies on nucleoside-specific antibodies using iodinated DNA. *J. Immunol.* **108**, 271—274, 1972.
 25. Keiser, H.: Preparation of ^{125}I labelled native DNA for use in radioimmunoassays anti-native-DNA antibodies. *Arthritis Rheum.* **16**, 468—470, 1973.
 26. Leon, S.A., Shapiro, B., Kollman, G., and Green, A.: A comparison of methods for labelling DNA for use in the radioimmunoassay of DNA-antibodies. *J. Immunol. Methods* **5**, 1—8, 1974.

Detection of antibodies to denatured DNA by radioimmunoassay

Part I: Comparison of methods

Tetsuo SARAI

The Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

^{14}C -denatured(d-) DNA, ^{125}I -d-DNA and ^3H -Actinomycin D-d-DNA were used as radio-labelled DNA antigens for radioimmunoassay of antibody to d-DNA. The ^{14}C -DNA derived from *E. Coli* was the most suitable antigen for simultaneous detection of antibodies to native n-) DNA and d-DNA. ^{125}I -d-DNA was easily prepared by iodination of heat denatured calf thymus DNA *in vitro*. ^3H -Actinomycin D-d-DNA was also easily prepared by mixing l-DNA with ^3H -Actinomycin D *in vitro*. Using normal human sera and systemic lupus erythematosus (SLE) sera that had contained antibody to d-DNA, half saturated ammonium sulfate method and filter method were employed to separate immunoglobulin-bound antigen from free antigen. To avoid nonimmunological bindings to d-DNA, pH and ionic strength of assay system were determined as 8.3 and 0.15 respectively. In the filter method, application of sonication to radiolabelled d-DNA prevented nonspecific binding of the antigen to the filter membrane. However, in the half saturated ammonium sulfate method, d-DNA binding between SLE sera and sonicated radiolabelled d-DNA decreased markedly.

When ^3H -Actinomycin D-d-DNA was the antigen, neither the half saturated ammonium sulfate method nor the filter method was suitable for evaluation of antibody to d-DNA.

There was fairly good correlation between the half saturated ammonium sulfate method and the filter method, using either ^{14}C -d-DNA or ^{125}I -d-DNA as the antigen. The half saturated ammonium sulfate method and the filter method were reproducible, quantitative, sensitive and specific enough to detect antibody to d-DNA.