

全身性エリテマトーデスにおける抗二本鎖DNA抗体の 免疫グロブリンクラス別測定の意味に関する研究

星 佳織¹⁾・中野 正明¹⁾²⁾・成田 一衛²⁾

Key words : SLE, 抗dsDNA抗体, ループス腎炎

要旨 【目的】全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus:SLE) における免疫グロブリンクラス別抗dsDNA抗体の測定意義を明らかにすることを目的に検討した。

【方法】新潟大学第二内科に入院したSLE143例を用いた。組織検索例でⅢ, Ⅳ, Ⅴ型を, 組織検索がない場合は尿蛋白0.5g/日以上を腎症ありとした。1.0μg/mlのdsDNAを96穴プレートに一晩固相化し, 翌日, 100倍希釈血清, 10000倍希釈二次抗体 (IgGとIgMクラス), TMB基質をそれぞれ60分, 30分, 20分反応させる。硫酸で反応を停止し, 450nmで比色して免疫グロブリンクラス別抗dsDNA抗体を測定した。

【結果】腎症あり群 (65例) となし群 (78例) で抗体価を比較したところ, IgMクラスは腎症なし群で有意に高値であったが, RIA法, IgGクラスは両群で差はなかった。IgMクラスとIgGクラスの比 (IgM/IgG比) は, 腎症なし群で有意に高値であった。

【結語】IgMクラス抗dsDNA抗体により, 腎症が抑制される可能性が示唆された。

緒言

RIA法による抗二本鎖 (ds) DNA抗体の測定は以前より行われており, すべての免疫グロブリンクラスの抗体を包括する検出法である。ELISA法は免疫グロブリンクラス別の測定が可能であるが, 一般臨床ではIgGクラスのみが検査されている現状がある。IgGクラス抗dsDNA抗体は全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus:SLE) の臓器障害, とくに腎症と関連するという報告がある一方で, 近年, IgMクラス抗dsDNA抗体とループス腎炎の負の相関が報告されている。

本研究はSLEにおける免疫グロブリンクラス別抗dsDNA抗体の測定意義を明らかにする目的で, ELISA法で特にIgGクラスとIgMクラスに分けて検討した。

方法

新潟大学第二内科に入院したSLE143例 (男性14例,

女性129例, 年齢:13歳~88歳 (平均:34.4歳), 罹病期間:0.1~30年) を対象とした。研究全般において, 厚生労働省および文部科学省より出された「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」並びにヘルシンキ宣言を遵守して遂行した。血清検体供与や検体を利用した臨床研究については十分説明し, 血清供与や研究への参加に納得・同意が得られた症例を対象とし, これらについては倫理委員会での承認が得られたものである。個人情報については, 症例をコード化してプライバシーの保護に十分配慮した。

ループス腎炎はWHO分類ないしISN/RPS分類により, 6つの組織型に分類される。このうち, 組織検索例でⅢ型 (2例), Ⅳ型 (3例), Ⅴ型 (5例) を, 組織検索がない場合は尿蛋白0.5g/日以上を腎症ありとし, Ⅰ型とⅡ型で尿蛋白0.5g/日未満は腎症なしと規定した。腎症ありは65例 (45%), 腎症なしは78例 (55%) であった。

ELISA法については, 1.0μg/mlのdsDNA (Sigma社) を96穴プレート (Nunc社, Polysorp) に4℃で一晩固

1) 新潟大学大学院 保健学研究科

2) 新潟大学医歯学総合病院 腎・膠原病内科

平成29年1月3日受理

相化し、翌日、100倍希釈血清、10000倍希釈peroxidase標識二次抗体（IgGクラスとIgMクラス）、TMB基質をそれぞれ60分、30分、20分反応させる。0.5mol/l硫酸で反応を停止し、450nmで比色測定した。希釈した血清、試薬はそれぞれ50μl分注した。

SLE患者で安定して高値の検体を陽性コントロール(PC)、健常者で低値の検体を陰性コントロール(NC)とし、PCの抗体価を100単位と内部設定し、次の計算式よりクラス別抗dsDNA抗体の抗体価を定量化した。 $\{(\text{検体の吸光度} - \text{NC}) / (\text{PC} - \text{NC})\} \times 100$

健常者30例の単位の平均値+2SD以上を陽性とし、IgGクラスは21単位以上、IgMクラスは30単位以上を陽性とし、それぞれ21単位未満、30単位未満は陰性とした。

RIA法による抗dsDNA抗体の値は新潟大学医歯学総合病院での検査結果を利用した。

次に、抗dsDNA抗体が強陽性である2例を用いて吸収試験を行い、dsDNAと血清中抗dsDNA抗体を事前に反応させることで、加えたdsDNAの濃度依存的に吸光度の低下が見られるかを検討した。すなわち、100倍希釈血清2mlに各濃度DNA（1μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.125μg/ml、0.0625μg/ml）を0.4mlずつ加え、一晚抗原抗体反応をさせる。翌日、ELISA法にてIgGクラス抗dsDNA抗体を測定した。

また、約5年の経過で何度か再燃して腎症なし（Ⅱ型）からあり（Ⅲ型）に推移した症例について経時的検討を行った。

統計解析

統計解析は対応のないt検定、カイ2乗検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

SLEにおけるIgGクラス抗dsDNA抗体の陽性率は93.7%、IgMクラスの陽性率は72.7%、RIA法による抗dsDNA抗体の陽性率は74.1%であった。

腎症あり群と腎症なし群で臨床所見を比較したところ、腎症あり群では腎症なし群と比較してGFR、補体価（CH50、C3）は有意に低値、血清Crは有意に高値であったが、RIA法は両群で差はみられなかった（表1）。また、t検定によって腎症あり群となし群で免疫グロブリンクラス別抗体価を比較したところ、IgGクラスは両群で差は認められなかったが、IgMクラスは腎症なし群で有意に高値であった（図1）。

次に、IgMクラス抗体価を30単位未満、30から100単位、100単位以上の3つのグループに分けて、カイ2乗検定によって腎症の有無とIgMクラス抗体価について比較検討したところ、腎症なし群でIgMクラス抗体価高値例が有意に高率であった（図2）。

さらに、IgMクラスとIgGクラスの抗体価の比（IgM/IgG比）の値により0.5未満、0.5から1.5、1.5以上の3つのグループに分け、カイ2乗検定によって腎症の有無とIgM/IgG比について比較検討したところ、腎症なし群でIgM/IgG比高値例の割合が高率であった（図3）。

IgMクラス抗体陽性群と陰性群での比較では、RIA法やIgGクラス、補体価は両群間で有意差はなく、IgMクラスが陰性（30単位未満）であることが腎症の重症度と強く関連する結果であった（表2）。

吸収試験を行った2例（A、B）について、加えたdsDNAの濃度依存的に吸光度の低下がみられた（図4）。

約5年の経過で何度か再燃して腎症なし（Ⅱ型）からあり（Ⅲ型）に推移した症例について、尿蛋白が0.2g/日から1.2g/日に増加し、尿円柱が出現した。また、

表1：腎症の有無での臨床所見の比較

	腎症あり (n=65)	腎症なし (n=78)	p
男女比	5:60	9:69	n.s.
年齢	33.6±13.3	35.1±16.1	n.s.
罹病期間(年)	6.5±7.0	4.3±5.6	<0.05
血清 Cr (mg/dl)	0.91±0.63	0.56±0.17	<0.001
GFR (ml/min)	81.5±31.9	107.9±28.4	<0.001
抗 DNA(RIA) (IU/ml)	136.3±248.1	100±259.1	n.s.
CH50 (U/ml)	19.8±11.8	27.4±12.3	<0.001
C3 (mg/dl)	40.9±20.6	54.3±22.0	<0.001
C4 (mg/dl)	13.6±9.2	15±10.9	n.s.

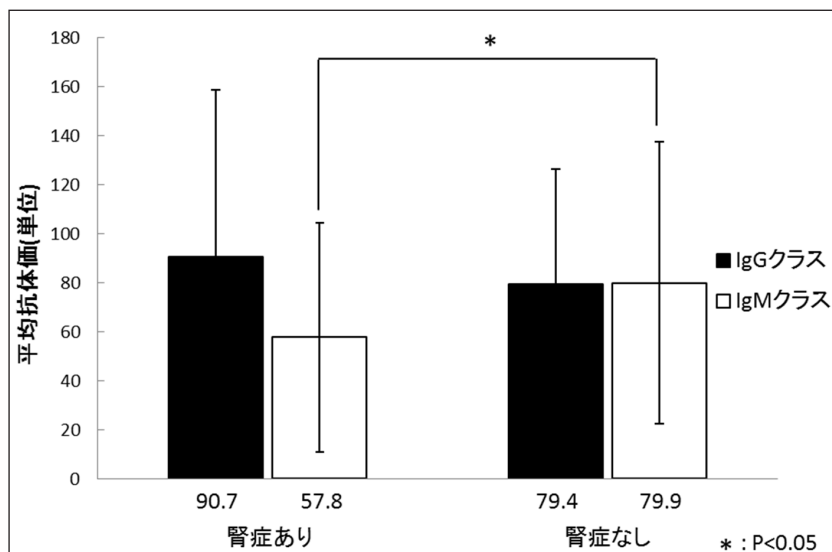


図 1 : 腎症有無別IgGクラス, IgMクラス抗体価の比較

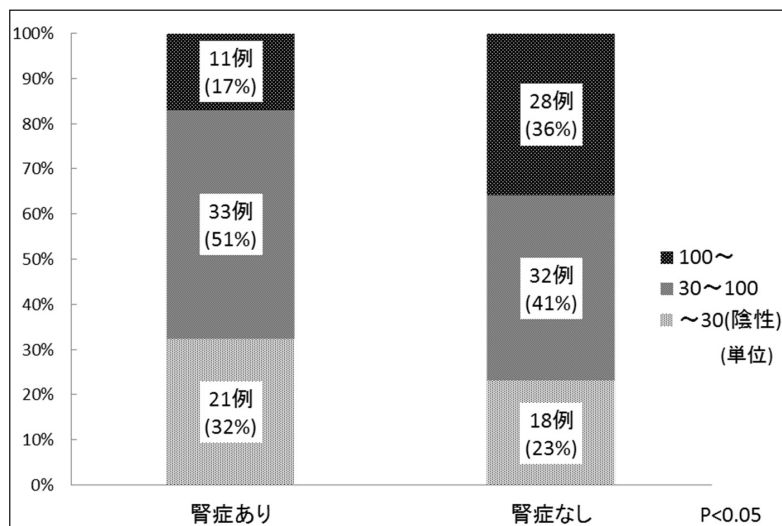


図 2 : 腎症の有無でのIgMクラス抗体価の比較

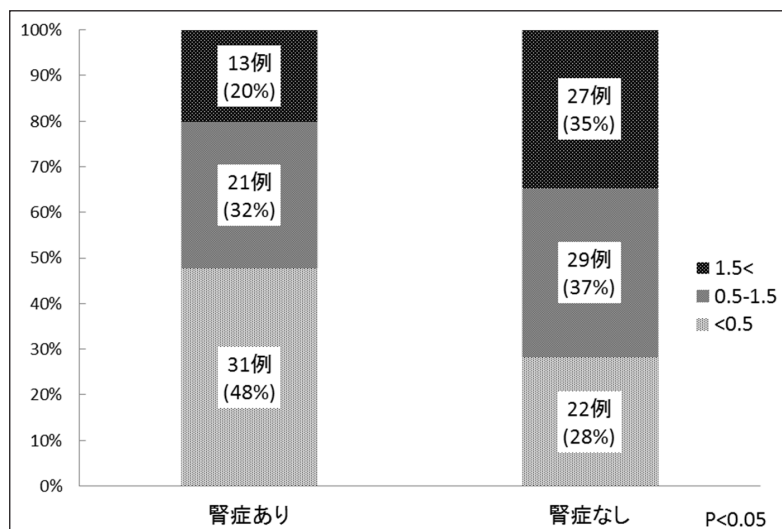


図 3 : 腎症の有無でのIgM/IgG比の比較

表 2 : IgMクラスの陽性陰性での検査データの比較

	IgM クラス陽性 (n=104)	IgM クラス陰性 (n=39)	p
罹病期間(年)	4.7±6.1	6.9±6.6	n.s.
血清 Cr (mg/dl)	0.67±0.32	0.89±0.74	n.s.
GFR (ml/min)	100.1±30.5	83.1±35.7	<0.01
抗 DNA(RIA) (IU/ml)	131.3±279.7	77.0±163.0	n.s.
IgG クラス(単位)	81.8±51.5	91.9±71.6	n.s.
CH50 (U/ml)	23.7±13.2	24.6±11.1	n.s.
C3 (mg/dl)	48.8±22.2	46.5±22.9	n.s.
C4 (mg/dl)	14.1±9.9	15.0±10.9	n.s.

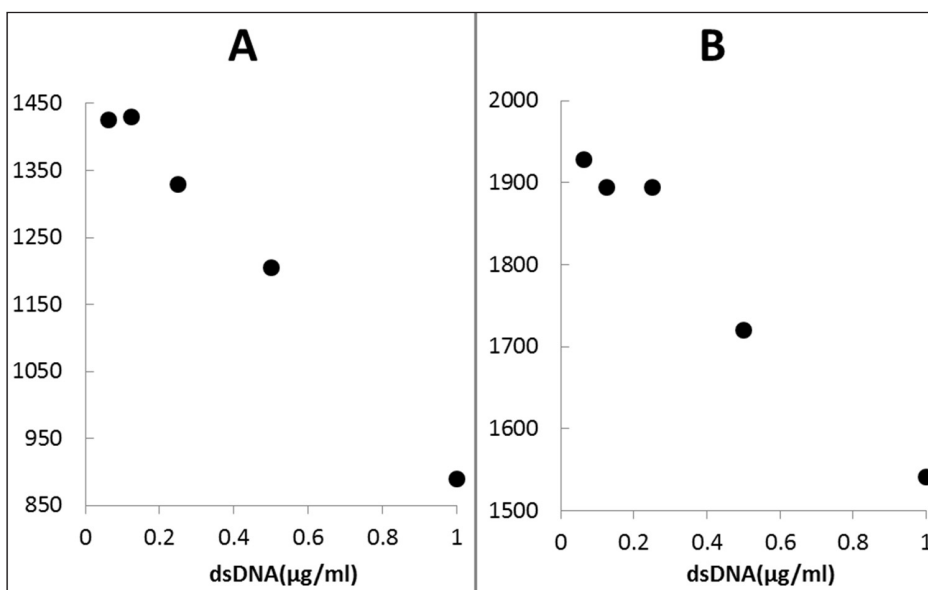


図 4 : 吸収試験

RIA法による抗dsDNA抗体価は8IU/mlから208IU/mlに、IgGクラス抗dsDNA抗体は32.0単位から86.6単位に上昇し、IgMクラス抗dsDNA抗体は130.7単位から55.1単位に低下していた。IgM/IgG比は4.08から0.64に低下する変動を示した（表 3）。

免疫グロブリンクラス別抗体の有無と腎症の有無について、多数例を占めるIgGクラス陽性群についてカイ2乗検定によって検討したところ、IgGクラス単独陽性群（39例）と比較して、IgG、IgMクラス両者陽性群（95例）において腎症ありの割合が有意に低い結果であった（図 5）。

考察

抗dsDNA抗体（RIA法:74.1%）の陽性率は既報（85%¹⁾、63%²⁾）とほぼ一致していた。一方、IgGク

ラス（93.7%）、IgMクラス（72.7%）の陽性率はともに既報（IgG:51%¹⁾、63%²⁾、55%³⁾、IgM: 44%¹⁾、57%²⁾、30%³⁾、52%⁴⁾）と比較して高率であった。

IgGクラスはSLEに特異性が高い⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾が、IgMクラスはSLE以外にも関節リウマチ、混合性結合組織病、シェーグレン症候群、自己免疫性肝疾患、全身性強皮症などで検出されるとの報告がある¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁹⁾。

IgG、IgMクラス両者陽性の患者はIgGクラス単独陽性患者（34.9%）に比べて、沈渣変化と蛋白尿がみられる活動性腎症が有意に低頻度（6.7%）であったが、SLEDAI scoreには有意差がないとの報告がある¹⁰⁾。本研究でも、IgGクラス単独陽性例と比較して、IgG、IgMクラス両者陽性例において腎症なしの患者が高率であった。

既報で、活動性腎症を伴った再燃例において抗体価が上昇した患者の割合はRIA法 85%、IgGクラス70%、

表 3：腎症なし（Ⅱ型）からあり（Ⅲ型）に推移した症例の臨床所見の比較

	X-5 年 (腎症なし)	X 年 (腎症あり)
抗 DNA(RIA) (IU/ml)	8	208
CH50 (U/ml)	27	29
C3 (mg/dl)	46.6	50.1
C4 (mg/dl)	10.1	22
GFR (ml/min)	136.9	112.8
Cr (mg/dl)	0.6	0.7
U-P (g/day)	0.2	1.2
尿潜血	—	—
尿白血球	—	多数
円柱	—	+
組織型	Ⅱ型	Ⅲ型
IgG クラス(単位)	32.0	86.6
IgM クラス(単位)	130.7	55.1
IgM/IgG 比	4.08	0.64

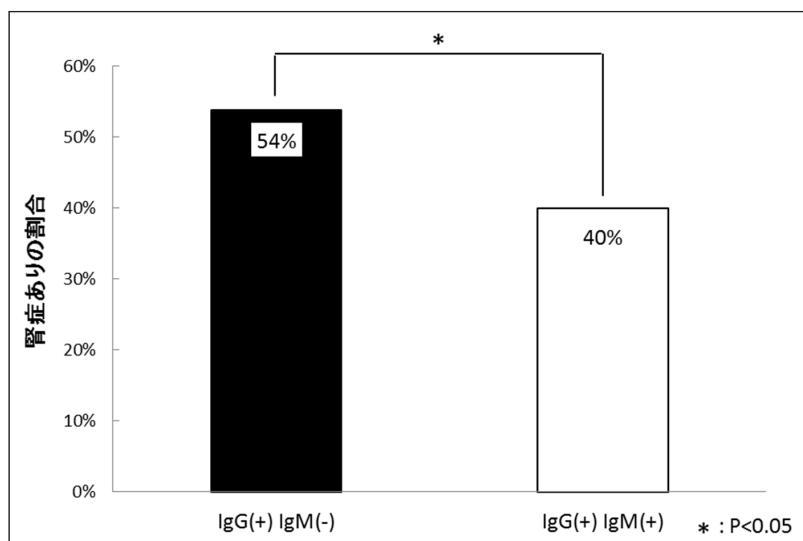


図 5：IgG単独陽性群とIgG、IgM両者陽性群での腎症ありの割合の比較

IgMクラス53%であった¹⁾。すなわち、IgGクラスに比べ、IgMクラス上昇の割合が少ないことから、IgMクラス抗体価が上昇しないことが腎症悪化につながった可能性が考えられる。他の既報でもIgGクラス抗体価の上昇は糸球体腎炎の再燃を予測する¹¹⁾¹²⁾¹³⁾のに対し、IgMクラス抗体価の上昇は再燃の予測感度が良くない¹⁾との報告がある。これは、IgMクラスが腎症防御的であると考えれば、納得できる結果である。

免疫グロブリンクラス別抗体と腎症の関連については、IgGクラス陽性は腎障害と関連がある²⁾¹⁴⁾、発症に

関わる⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾との報告があるのに対して、IgMクラスとループス腎炎に負の相関がある¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾、ループス腎炎に対して保護的である³⁾⁹⁾との報告がある。しかし、腎症の有無でIgG、IgMクラスともに抗体価に有意差がみられない報告もある³⁾。本研究では、腎症の有無でのIgMクラス抗体価の比較（図 2）の結果から、腎症とIgMクラスの負の相関がみられた。また、腎症あり群となし群で比較したところ、RIA法とIgGクラスは両群に差は認められなかったが、IgMクラス抗体価は腎症なし群で有意に高値であった。

IgGクラスとIgMクラスの相対的な比と腎症の関連について、IgG/IgM比と糸球体腎炎に相関がみられる³⁾、IgG/IgM比が低い患者ではループス腎炎が進行しない²⁾⁹⁾との報告があり、その中でIgGクラス優位からIgMクラス優位になり、IgG/IgM比が低下した症例が3例みられ、2例は腎症なし、1例は観察開始時ループス腎炎であったがIgG/IgM比の低下と同時に腎症が完全寛解したとの報告がある²⁾。本研究では、約5年の経過で腎症なしから腎症ありに推移した症例について、IgM/IgG比は4.08から0.64に低下する変動を示した。IgG/IgM比を計算すると0.24から1.57に上昇していた。

免疫グロブリンクラス別抗dsDNA抗体と腎症発現の機序について、IgGクラスとIgMクラス抗dsDNA抗体の糸球体基底膜への免疫複合体沈着の違いがその理由として挙げられている。IgGクラスは可溶性で貪食されにくいのに対し、IgMクラスは多くのdsDNAと結合することで拮抗阻害によりIgGクラス免疫複合体形成を減少させる²⁾。うえに、効率よく貪食されるため、糸球体基底膜への沈着が最小限となり、腎症の発現が抑制されるとの報告である⁹⁾。また、IgMクラス抗dsDNA抗体が自己反応性B細胞を下方制御し、病原性のIgGクラス抗dsDNA抗体の産生が減少する可能性も考えられている⁹⁾。

結論

IgMクラス抗dsDNA抗体により、腎症が抑制される可能性が示唆され、ループス腎炎の評価にELISA法によるIgMクラス抗dsDNA抗体の測定が重要と考えられた。

引用文献

- 1) Bootsma H, Spronk PE, Ter Borq EJ, et al. The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation. *Ann Rheum Dis*. 1997;56(11):661-6.
- 2) Förger F, Matthias T, Oppermann M, et al. Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. *Lupus*. 2004;13(1):36-44.
- 3) Villalta D, Bizzaro N, Bassi N, et al. Anti-dsDNA antibody isotypes in systemic lupus erythematosus: IgA in addition to IgG anti-dsDNA help to identify glomerulonephritis and active disease. *PLoS One*. 2013;8(8):e71458.
- 4) Witte T. IgM antibodies against dsDNA in SLE. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008;34(3):345-7.
- 5) Hylkema MN, Huygen H, Kramers C, et al. Clinical evaluation of a modified ELISA, using photobiotinylated DNA, for the detection of anti-DNA antibodies. *J Immunol Methods*. 1994;170(1):93-102.
- 6) Rothfield NF, Stollar BD. The relation of Ig class, pattern of ANA and complement-fixing antibodies to DNA in sera from patients with SLE. *J Clin Invest*. 1967;46:1785-94.
- 7) Hylkema MN, van Bruggen MC, ten Hove T, et al. Histone-containing immune complexes are to a large extent responsible for anti-dsDNA reactivity in the Farr assay of active SLE patients. *J Autoimmun*. 2000;14(2):159-68.
- 8) Galeazzi M, Morozzi G, Piccini M, et al. Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmun Rev*. 2003;2(1):50-5.
- 9) Shoenfeld Y, Toubi E. Protective autoantibodies: role in homeostasis, clinical importance, and therapeutic potential. *Arthritis Rheum*. 2005;52(9):2599-606.
- 10) Keiserman B, Ronchetti MR, Monticelo OA, et al. Concomitance of IgM and IgG anti-dsDNA antibodies does not appear to associate to active lupus nephritis. *Open Rheumatol J*. 2013;7:101-4. doi: 10.2174/1874312901307010101.
- 11) Okamura M, Kanayama Y, Amatsu K, et al. Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology. *Ann Rheum Dis*. 1993;52(1):14-20.
- 12) Nossent JC, Huysen V, Smeenk RJ, et al. Low avidity antibodies to double stranded DNA in systemic lupus erythematosus: a longitudinal study of their clinical significance. *Ann Rheum Dis*. 1989;48(8):677-82.
- 13) Ghirardello A, Doria A, Zampieri S, et al. Antinucleosome antibodies in SLE: a two-year follow-up study of 101 patients. *J Autoimmun*. 2004;22(3):235-40.
- 14) Crispin JC, Liossis SN, Kis-Toth K, et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med*. 2010;16(2):47-57.
- 15) Pankewycz OG, Migliorini P, Madaio MP. Polyreactive autoantibodies are nephritogenic in murine lupus nephritis. *J Immunol*. 1987;139(10):3287-94.
- 16) Ohnishi K, Ebling FM, Mitchell B, et al. Comparison of pathogenic and non-pathogenic murine antibodies to DNA: antigen binding and structural characteristics. *Int Immunol*. 1994;6(6): 817-30.
- 17) Ehrenstein MR, Katz DR, Griffiths MH, et al. Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. *Kidney Int*. 1995;48(3):705-11.
- 18) Witte T, Hartung K, Sachse C, et al. IgM anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: negative association with nephritis. *SLE Study Group. Rheumatol Int*. 1998;18(3):85-91.
- 19) Förger F, Matthias T, Oppermann M, et al. Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. *Lupus*. 2004;13(1):36-44.
- 20) Bootsma H, Spronk PE, Hummel EJ, et al. Anti-double stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: detection and clinical relevance of IgM-class antibodies. *Scand J Rheumatol*. 1996;25(6):352-9.

Clinical significance of anti-dsDNA antibodies in patients with SLE

Kaori HOSHI¹⁾, Masaaki NAKANO¹⁾²⁾, Ichiei NARITA²⁾

1) Graduate School of Health Sciences, Niigata University

2) The Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Niigata University Medical and Dental Hospital

Key words : SLE, anti-dsDNA Abs, lupus nephritis

Abstract The aim of this study is to investigate the relationship between patterns of anti-dsDNA antibodies (Abs) and renal involvement in patients with SLE. The study involved 143 patients with SLE. Patients are divided into a group with renal involvement and without nephritis according to biopsy (class III, IV, V) or proteinuria ≥ 0.5 g/day. Anti-dsDNA Abs are investigated using the enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). SLE patients without lupus nephritis had a statistically significant higher titer of IgM anti-dsDNA antibodies compared with patients with lupus nephritis. Farr assay and IgG anti-dsDNA antibodies were not different with both groups. The IgM/IgG ratio of anti-dsDNA Abs was significantly higher in patients without renal involvement than those with renal involvement. To conclude, the results of our study show that the measurement of anti-dsDNA isotypes may be a helpful tool in the assessment of patients with SLE.

Accepted : 2017. 1. 3