

シェーグレン症候群における抗 SS-A/B 抗体の二重免疫拡散法、
ウェスタンブロット法の比較検討

許 志泉

竹内 健・松平 蘭・金井美紀

戸叶嘉明・高崎芳成・橋本博史

【Summary】

Objective: To investigate the autoimmune responses against SS-A/B antigens by double immunodiffusion (DID) and Western Blotting (WB) in primary and secondary Sjögren's syndrome (SS).

Patients: Forty-nine patients with primary SS (pSS), 28 patients with secondary SS (sSS) and control group that couldn't be diagnosed as SS were included in this study.

Results: In DID analysis, Anti-SS-A antibody was detected in 69% of pSS and 86% of sSS, and anti-SS-B antibody was found in 22% of pSS and 39% of sSS. No significant difference could be demonstrated between pSS and sSS concerning anti-SS-A/B antibodies. Conversely, WB studies disclosed evidences that 18% of pSS and no sSS reacted only with the 52kD protein, and there was significantly increased in pSS. Sera reacting with the 60kD antigen were found in 37% of pSS, 71% of sSS, and 75% of sSS with SLE, 63% of sSS with RA. The ratio of sSS, and sSS with SLE were particularly significantly higher than pSS.

Conclusion: Our results revealed data that there are the difference of reactivity against SS-A/B antigens in WB between pSS and sSS.

Key words: Sjögren' syndrome,
anti-SS-A antibody,
anti-SS-B antibody,
double immunodiffusion,
western blotting

【概要】

目的と方法：原発性シェーグレン症候群(primary Sjögren's syndrome: pSS) 49例、二次性SS(secondary SS: sSS)28例で、二重免疫拡散法(double immunodiffusion: DID)とウェスタンブロット法(Western Blotting: WB)を用いて抗SS-A/B抗体の反応性を検討した。

結果:DID法では、抗SS-A抗体の陽性率はpSS69%、sSS86%で、抗SS-B抗体の陽性率はpSS22%、sSS39%であり、pSSとsSSの間でいずれも有意差はなかった。WB法では、抗52kD-SS-A抗体単独陽性の比率はpSS18%で、sSSには1例もなく、pSSで有意に高率であった。抗60kD-SS-A抗体の陽性率はpSS37%、sSS71%で、sSSの中ではSLEに伴うsSSが75%、RAに伴うsSSが63%で、pSSに比し、sSS特に、SLEに伴うsSSで有意に高率であった。

結論:pSSとsSSにおいて、DID法におけるSS-A/B抗原に対する反応性は差はなかったが、WB法における各分子に対する反応性は異なることが証明された。

I. 緒言

シェーグレン症候群(Sjögren's Syndrome: SS)は慢性唾液腺炎と乾燥性角結膜炎を主徴とし、全身の外分泌腺および多臓器における機能障害を呈する慢性自己免疫疾患である。本症は原因不明であるが、涙腺、唾液腺などの外分泌腺の巣状リンパ球浸潤が重要な特徴としてあげられる。抗SS-A抗体および抗SS-B抗体はSSで高率に検出され、SSの診断や出現する病態の推定に有用な自己抗体と考えられている¹⁾。抗SS-A抗体の対応抗原は細胞質に認められるuridine-rich RNA hY(hY1, hY3, hY5)と52kDおよび60kD蛋白との複合体である。一方、SS-B抗原は48kDの核蛋白で、RNAポリメラーゼIIIの初期転写産物と複合体を形成することが知られている。

両抗体の出現は特定の病態と関連していることが知られている。例えば、抗SS-A抗体陽性例では、乾燥症状、高γ-グロブリン血症、リウマトイド因子(rheumatoid factor: RF)陽性、新生児ループスなどが、また、抗SS-B抗体陽性例では、乾燥症状、再発性環状紅斑が高率に出現する^{2,3)}。抗SS-A抗体を有するSLEでは、光線過敏、RF陽性、SSを伴うことが報告されている^{3,4)}。さらに最近我々は、SSの各種診断基準の検討において、抗SS-A/B抗体の検索がSSの診断の感度と特異度の向上に関連することも示している⁵⁾。

抗SS-A/B抗体の測定は二重免疫拡散法(double immunodiffusion: DID)がスクリーニングで使用されるが、その他に酵素免疫抗体法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)やウェスタンブロット法(Western Blotting: WB)が挙げられる。これらの測定法には一長一短がある。WB法あるいはELISA法では抗SS-A抗体が52kD、60kD分子との反応性からいくつかのサブタイプに分類されることが判明している。前述の抗SS-A/B抗体と病像との関連はDID法を用いた結果であるが、近年、WB法あるいはELISA法で測定されるサブユニットと病像との関連も報告されてきている。例えば、抗52kD-SS-A抗体陽性例、あるいは抗52kD-SS-A抗体と抗SS-B抗体共存例から生まれた児に先天性完全房室ブロックがより高率に発症^{6,7)}、我々もこれらの抗体の検査が治療上重要であると報告してきた⁸⁾。しかしながら、これまでの報告は特定の一つの測定法と病像を比較したものが多く、各測定法の疾患による差異、特に原発性SS(primary SS: pSS)と二次性SS(secondary SS: sSS)での有用性を比較した報告は少ない。そこで、今回我々は、pSSとsSSにおいて抗SS-A/B抗体をDID法とWB法で測定し、比較検討してみた。

II. 症例および方法

1. 検討症例と背景因子

1981年12月より2001年8月までの間に、順天堂大学膠原病内科を受診し、Daniels-Talal基準(1987)⁹⁾、ヨーロッパ基準(1993)¹⁰⁾、中国基準(1996)¹¹⁾と日本厚生省改訂基準(1999)¹²⁾の4基準のうち2基準以上を満たす77例をSS症例とした。77例のSS症例には、pSS49例とsSS28例が含まれた。sSSの基礎疾患の内訳は、全身性エリテマトーデス(SLE)12例、関節リウマチ(RA)8例、強皮症3例、SLE+RA1例、リウマチ性多発筋痛症2例、混合性結合組織病1例、多発性筋炎/皮膚筋炎1例であった。一方、1991年3月より2001年8月までの間に当院膠原病内科を受診しSSが疑われて、上記4基準をすべて満たさない16例をコントロール症例とした⁵⁾。

2. 自己抗体の測定方法

1)抗核抗体(antinuclear antibodies : ANA)

ANAの測定はフルオロヘパナ(fluoro HEPANA test)スライド(MBL社,名古屋)を用いて行った。20倍希釈した血清を用いて、核内に蛍光が認められた場合、陽性と判定した。

2) RF

ラテックス凝集法(latex fixation test : LFT)で、ヒトIgG被覆ラテックスの凝集を比濁法で定量測定し、20IU/ml以上を陽性とした。

3)抗SS-A抗体および抗SS-B抗体

DID法:ウサギ胸腺アセトン抽出物をリン酸緩衝液で可溶化したものを抗原とし、寒天内での患者血清との沈降線を判定した¹³⁾。

WB法:MOLT-4細胞から可溶性抗原を抽出し、Laemmliらの方法に準じてSDS-PAGE(sodium dodecyl sulfatepoly-acrylamide gel electrophoresis)およびニトロセルロース膜への転写を行った^{14,15)}。ニトロセルロース膜と患者血清を反応させた後、アルカリフォスファターゼによる発色で反応性を確認した。

3. 検討方法

DID法とWB法における抗SS-A抗体および抗SS-B抗体の陽性率と抗体価を比較し、pSSとsSSにおける抗体の反応性および病態との関連を検討した。統計解析は χ^2 検定、マン-ホイットニー検定を使用した。

III. 結果

1. DID法とWB法における抗SS-A/B抗体の陽性率

まず、DID法を用いて測定した抗SS-A抗体および抗SS-B抗体の陽性率を表1に示す。抗SS-A抗体の陽性率はSS全体75%で、うちpSS69%、sSS86%であった。sSSのうち、SLEに伴うsSSでは100%、RAに伴うsSSでは63%が陽性であった。一方、抗SS-B抗体の陽性率はSS全体29%で、うちpSS22%、sSS39%であった。sSSのうち、SLEに伴うsSSでは42%、RAに伴うsSSでは25%が陽性であった。抗SS-B抗体陽性例はpSSとsSSとも全例抗SS-A抗体を有していた。このように、pSSとsSSの間でDID法による抗SS-A/B抗体では、陽性率の差はみられなかった。また、pSSとsSSでDID法による両抗体の抗体価も検討したが、それぞれ差は認められなかった。

次に、WB法で両抗体の検討を行った(表1)。52kD、60kDのSS-A抗原のうち少なくとも一方と反応する血清はSS全体の64%で、うちpSS59%、sSS71%であった。sSSのうち、SLEに伴うsSSでは75%、RAに伴うsSSでは63%が陽性であった。一方、抗SS-B抗体の陽性率はSS全体23%で、うちpSS20%、sSS29%であった。sSSのうち、SLEに伴うsSSでは42%、RAに伴うsSSでは13%が陽性であった。DID法でみられた結果と同様、WB法においても、抗SS-B抗体陽性例は全例抗SS-A抗体陽性であった。このように、WB法においても、両抗体の陽性率はpSSとsSSの間で差が認められなかった。

許・SS での DID、WB 法を用いた SS-A/B 抗体

表 1 DID 法と WB 法における抗 SS-A/B 抗体の陽性症例数及び陽性率

	SS (n=77)	pSS (n=49)	sSS (n=28)	SLE+sS S (n=12)	RA+sSS (n=8)	control (n=16)
抗 SS-A 抗体/DID 法	58 (75%)	34 (69%)	24 (86%)	12 (100%)	5 (63%)	0
抗 SS-A 抗体/WB 法	49 (64)	29 (59)	20 (71)	9 (75)	5 (63)	0
抗 SS-B 抗体/DID 法	22 (29)	11 (22)	11 (39)	5 (42)	2 (25)	0
抗 SS-B 抗体/WB 法	18 (23)	10 (20)	8 (29)	5 (42)	1 (13)	0

表 2 WB 法で SS-A/B 抗原のサブユニットに反応する症例数と陽性率

	SS (n=77)	pSS (n=49)	sSS (n=28)	SLE+S S (n=12)	RA+SS (n=8)
抗 52kD-SS-A 抗体	44 (57%)	27 (55%)	17 (60%)	8 (67%)	4 (50%)
抗 60kD-SS-A 抗体	38 (49)	18 (37)	20 (71)★	9 (75)▲	5 (63)
抗 52kD-SS-A 抗体単独	9 (12)	9 (18)	0▲	0	0
抗 60kD-SS-A 抗体単独	5 (6)	2 (4)	3 (11)	1 (8)	1 (13)
抗 52kD, 60kD-SS-A 抗体	17 (22)	8 (16)	9 (31)	3 (25)	3 (38)
抗 52kD-SS-A, SS-B 抗体	2 (3)	2 (4)	0	0 (0)	0
抗 52kD, 60kD-SS-A, SS-B 抗体	16 (21)	8 (16)	8 (29)	5 (42)▲	1 (13)

pSS vs sSS, ▲ : $p < 0.05$ ★ : $p < 0.005$

表 3 DID 法における抗体価と WB 法における陽性率との比較

	DID 法	WB 法陽性	p
pSS (n=49)	抗 SS-A 抗体 8 倍以上 (n=25)	25 (100%)	$p < 0.005$
	4 倍以下 (n=9)	4 (44)	
	抗 SS-B 抗体 4 倍以上 (n=6)	6 (100)	NS
	2 倍以下 (n=5)	2 (40)	
sSS (n=28)	抗 SS-A 抗体 8 倍以上 (n=19)	18 (95)	$p < 0.01$
	4 倍以下 (n=5)	2 (40)	
	抗 SS-B 抗体 4 倍以上 (n=6)	4 (67)	NS
	2 倍以下 (n=5)	0 (0)	

NS— not significant

2. WB 法における SS-A/B 抗原の個々のサブユニットに対する反応性(表 2)

まず、抗 52kD-SS-A 抗体の陽性率は、SS 全体では 57%で、うち pSS55%、sSS60%であった。sSS のうち、SLE に伴う sSS では 67%、RA では 50%が陽性で、これらの各群間で差はなかった。この抗 52kD-SS-A 抗体陽性の症例群には、60kD-SS-A あるいは SS-B 抗原に対する抗体も陽性の症例が含まれていたが、この群を除いた抗 52kD-SS-A 抗体単独陽性の症例は SS12%で、pSS では 18%で、sSS では 0%と、

pSS で sSS に比し有意に高率であった。

次に、抗 60kD-SS-A 抗体の陽性率は SS 全体 49%、うち pSS37%、sSS71%で、sSS で pSS に比し有意に高率であった。sSS における同抗体の陽性率を基礎疾患別に比較すると、SLE に伴う sSS では 75%、RA では 63%が陽性で、SLE に伴う sSS での陽性率が pSS に比し有意に高かった。抗 60kD-SS-A 抗体単独陽性率は SS 全体 6%で、うち pSS4%、sSS11%で、各群間で有意差はなかった。

表4 WB法における反応性と
DID法における陽性率との比較

	WB法	DID法 陽性
pSS (n=49)	抗 52kD-SS-A 抗体 (n=27)	27 (100%)
	抗 60kD-SS-A 抗体 (n=18)	18 (100)
	抗 SS-B 抗体 (n=10)	8 (80)
sSS (n=28)	抗 52kD-SS-A 抗体 (n=17)	17 (100)
	抗 60kD-SS-A 抗体 (n=20)	20 (100)
	抗 SS-B 抗体 (n=8)	4 (50)

一方、抗 52kD および 60kD-SS-A 抗体両方を認める陽性率は SS では 22%で、うち pSS16%、sSS31%であったが、有意差はみられなかった。sSSのうち、SLEに伴う sSS では 25%、RAに伴う sSS では 38%であった。52kD および SS-B 抗原に対する抗体をいずれも陽性の比率は SS では 3%で、うち pSS4%で、sSS0%で、pSS と sSS いずれも頻度が低かった。52kD、60kD-SS-A および SS-B 抗原に対する抗体の3者を認める陽性率は SS では 21%で、うち pSS16%で、sSS29%で、pSS と sSS の間では有意差が認められなかった。しかし、基礎疾患について比較すると、SLEに伴う sSS での陽性率は 42%、RAに伴う sSS での陽性率は 13%で、SLEに伴う sSS で pSS に比し有意に高率であった。

なお、コントロール症例では DID 法と WB 法とともにすべて陰性であった。

3. DID 法と WB 法における反応性の相違

さらに、DID 法での抗体価と WB 法における反応性との関連を比較した(表 3)。DID 法で、8 倍以上の抗 SS-A 抗体の力価を認める群は 4 倍以下の群に比し、pSS と sSS とともに、WB 法における陽性例が有意に多く認められた。一方、抗 SS-B 抗体に関しては DID 法の抗体価で WB 法の陽性率の差は認められなかった。

次に、WB 法での抗 SS-A/B 抗体が陽性の症例で DID 法における陽性率を検討した結果を表 4 に示す。WB 法における抗 SS-A 抗体陽性例は pSS と sSS とともに DID 法ではすべて陽性であった。一方、抗 SS-B 抗体陽性の pSS 10 例中 2 例および sSS8 例中 4 例が DID 法で陰性

であった。

IV. 考 察

Ben-Chetrit ら¹⁶⁾は pSS60 例と SLE90 例の血清を用いて WB 法による SS-A 抗原に対する反応性を検討し、抗 52kD-SS-A 抗体単独陽性と抗 60kD-SS-A 抗体単独陽性はそれぞれ pSS と SLE に特異的であったと報告している。このように、WB 法における SS-A 抗原のサブタイプに対する反応性は疾患による差がある可能性が指摘されてきたが、本研究では SS を pSS および sSS という観点から抗 SS-A/B 抗体の反応様式の相違を DID 法・WB 法両者を用いて比較検討した。その結果、DID 法を用いた場合には、抗 SS-A 抗体および抗 SS-B 抗体の陽性率と抗体価は pSS・sSS 間で差が認められなかったが、WB 法では、pSS での抗 52kD-SS-A 抗体単独陽性例および sSS での抗 60kD-SS-A 抗体陽性例が有意に多くみられ、同じ抗 SS-A 抗体でも、52kD と 60kD の反応性が pSS・sSS で異なることが明らかになった。これまで pSS・sSS で比較した報告がないだけにこの結果は興味深い。臨床の現場では、sSS を合併した SLE と pSS との鑑別に苦慮する場合によく遭遇するが、今日の結果は WB 法による抗 SS-A 抗体の反応性の検討が両者の鑑別に有用可能性を示唆していると思われた。

なお、DID 法における抗体価と WB 法での反応性を比較検討すると、抗 SS-A 抗体に関しては DID 法にて低力価で陽性とされても、WB 法で陰性と判定される可能性があることが示唆された。WB 法が DID 法に比し低感度であることに加え、WB 法では抗原調整の過程でいくつかのエピトープが変性することも原因として考えられた¹⁷⁾。一方、抗 SS-B 抗体に関しては、WB 法で陽性のいくつかの血清が DID 法で陰性と判定され、抗 SS-A 抗体と逆の傾向を示した。このように、検査法により、SS-A/B 抗原に対する反応様式の相違も明らかになり、抗 SS-A/B 抗体の結果の解釈の上で注意が必要と思われた。

抗SS-A/B抗体の測定はDID法がルチーンに行われてきたが、本研究の結果でもスクリーニングはこの方法で十分と思われた。ただし、抗SS-A抗体のWB法がpSS・sSSの鑑別に有用である点および抗SS-B抗体が陰性でもWB法で検出可能である症例が存在する点は、SSの診療をする上で、このWB法を必要に応じて利用することが重要であることを示していると思われた。

V. 結 語

pSSとsSSの血清を用いてDID法とWB法でのSS-A/B抗原に対する反応性を比較した。DID法ではpSSとsSSの間に差はなかったが、WB法での検討では、pSSにおける抗52kD-SS-A抗体単独陽性例(18%)とsSSにおける抗60kD-SS-A抗体陽性例(71%)が有意に多く認められ、これらの反応性を検討することは、明確な目的意識をもって、SSを診断する上で有用と思われた。

文 献

- 1) 三森経世：抗SS-A抗体と抗SS-B抗体の臨床的意義。リウマチ科 12: 96-100, 1994
- 2) 竹内 健：抗SS-A抗体、抗SS-B抗体。竹原和彦編集, KYE WORD 膠原病 2000~2001, 第1版, 先端医学社, 東京, pp76, 1999.
- 3) Hoshino, K. T., et al.: Recurrent annular erythema associated with anti-SS-B/La antibodies: Analysis of the disease specific epitope. Br. J. Dermatol. 127: 608~613, 1992.
- 4) Maddison PJ., et al.: The clinical significance of autoantibodies to a soluble cytoplasmic antigen in systemic lupus erythematosus and other connective tissue disease. J Rheumatol. 6:189-195, 1979
- 5) 許 志泉, ほか：シェーグレン症候群における中国の診断基準の検討——感度と特異度について他の診断基準との比較。順天堂医学, 48:印刷中, 2003
- 6) Buyon JP, Winchester RJ, Slade SG et al: Identification of mothers at risk for congenital heart block and other neonatal lupus syndromes in their children. Arthritis Rheum, 36:1263-1273, 1993
- 7) Buyon JP, Winchester R: Congenital complete heart block, a human model of passively acquired autoimmune injury. Arthritis Rheum, 33:609-614, 1990
- 8) 宮方 了 他：抗SS-A/Ro抗体・抗SS-B/La抗体陽性患者に対する妊娠経過中の血漿交換療法。日本リウマチ学会誌, 4: 726~735, 2001
- 9) Daniels TE, Talal N: 1.Diagnosis and differential diagnosis of Sjögren's syndrome. In Sjögren's syndrome, clinical and immunological aspects. Springer-Verlag, New York, 1987; 193~199
- 10) Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European community. Arthritis Rheum, 1993; 36:340~347
- 11) Dong Yi, Zhao Yan, Guo Xiaoping et al: Preliminary diagnostic criteria for primary Sjögren's syndrome in China. Chin J Intern Med, 1996; 35:114~116
- 12) 藤林孝司, 菅井 進, 宮坂信之：シェーグレン症候群改訂診断基準。厚生省特定疾患免疫疾患調査研究班平成 10 年度研究報告書, 1999;135~138
- 13) Tan EM, et al.: Characteristics of a

- soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 96 : 464-471,1966.
- 14) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature.* 227 : 680-685, 1970.
- 15) Towbin H, et al. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76 : 4350-4354, 1979.
- 16) Eldad Ben-chetrit, et al.: dissociation of immune responses to the SS-A (Ro) 52-kD and 60-kD polypeptides in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Arthritis and Rheumatism.* 33: 349-355, 1990.
- 17) Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol.* 44:93-151, 1989.