

Experimental Studies on Anti-Type II Collagen Antibodies in Sera of Patients with Rheumatoid Arthritis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8066

慢性関節リウマチ患者血清中の抗II型 コラーゲン抗体についての研究

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任: 野村 進教授)

相 良 光 貞

(昭和63年9月30日受付)

非特異的反應を最小限に抑制した enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて、慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) 患者血清中の抗II型コラーゲン抗体を検出し、さらに関節軟骨表面の抗II型コラーゲン抗体を抽出測定して、この抗体の病因的意義について検討を加えた。ELISA 法については、ヒト血清中の IgG のプラスチック表面への非特異的吸着を阻止するために、100%濃度の正常家兎血清をブロッキング剤として使用すること、ヒト血清を50倍以上に希釈すること、および Costar plate を用いることなどの改良を加えて、特異性の高い ELISA 法を確立した。その方法を用い96例の RA 患者血清中の抗II型コラーゲン抗体価を測定したところ、15.6%が陽性であった。一方、従来より言われている抗I型コラーゲン抗体はこれら患者血清中に見出されなかった。また、ヒト抗II型コラーゲン抗体陽性血清は、ニワトリ、ウシII型コラーゲンとも交叉反応性を示した。従って本抗体はII型コラーゲン分子上の共通エピトープを認識しているものと推察された。一方、RA 患者軟骨には57.1%と高率に抗II型コラーゲン抗体が認められたが、osteoarthritis (OA) 患者や正常人では見られなかった。抗II型コラーゲン抗体と RA の stage, class との因果関係は認められなかったが、血沈値と抗体価との間には相関が認められ、本抗体が RA の活動性に関与している可能性が注目された。また、double filtration plasmapheresis による抗体除去は一時的に有効であるが、長期にわたっては効果の少ないことが判明した。

Key words enzyme-linked immunosorbent assay, rheumatoid arthritis, anti-type II collagen antibody, normal rabbit serum, double filtration plasmapheresis.

ヒトの慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) が自己免疫疾患と考えられるようになって久しいが、その自己抗原に関しては未だ明らかでない。しかし、近年、軟骨の主成分であるII型コラーゲン¹⁾をラット²⁾、マウス³⁾、さらにはサル⁴⁾に免疫することにより RA によく似た多発性の関節炎、すなわちコラーゲン関節炎⁵⁾が惹起されることから、にわかにII型コラーゲンの自己抗原としての可能性が注目されるようになった。さらに Teratoら⁶⁾は、コラーゲン関節炎発症マウスを用い、II型コラーゲンの cyanogen

bromide (CB) -peptide 11 上に関節炎惹起抗原 (arthritogenic epitopes) が存在し、その抗原は、ニワトリ、マウス、ラット、ウシさらにはヒトに共通の抗原である可能性を示唆した。このように、動物モデルの研究からヒト RA においても、自己抗原としてのII型コラーゲンに対する関心が高まったが、ヒト血清中の抗コラーゲン抗体を正確に測定する方法が技術的に確立されず、未だに一致した見解はえられていない。すなわち、受身赤血球凝集反応¹⁰⁾¹¹⁾、ラジオイムノアッセイ^{12)~14)}、蛍光免疫法¹⁵⁾¹⁶⁾、さらには酵素免疫法

Abbreviations: B I, bovine type I collagen; BII, bovine type II collagen; CII, chick type II collagen; CB, cyanogen bromide; CRP, c-reactive protein; DFP, double filtration plasmapheresis; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ESR, erythrocyte

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)^{17,18)}など多くの異なった方法により、ヒト血清中の抗体の検出が試みられて来た。しかし、いずれの方法においても血清中の抗体価が低いことと、それ以上に非特異的反応が強いことなどから、抗体陽性率や抗体の特異性に関して、研究者により不一致な点が多く認められる。一方、Teratoら¹⁹⁾は正常家兎血清をELISA法における非特異的反応のプロッキング剤として用いることにより、ヒト血清中の抗コラーゲン抗体を特異的に測定可能であると報告した。

そこで、著者は正常家兎血清をプロッキング剤として用いたELISA法についての基礎的検討を行い、さらに改良を加えた方法でRA患者血清中の抗コラーゲン抗体価を測定し、RAにおける抗II型コラーゲン抗体の病因的意義について考察した。

材料および方法

I. RA患者血清

金沢大整形外科及び関連病院の外来及び入院患者のうち、RA 96症例 (early 10例, probable 4例, definite 39例, classical 43例) より血清を分離し、使用まで -20°C で保存した。また、血漿交換療法を施行したRA患者10例につき、その血漿交換療法前後の血清と排液を同様に保存し用いた。

対照として、健康診断受診者のうち、明らかに関節炎症状のない健康人100例につき血清を保存し用いた。

II. コラーゲン

ニワトリおよびヒトII型コラーゲン (chick type II collagen, CII および human type II collagen, HII) はエーザイ筑波研究所、寺戸博士より供与された標品を用いた。また、ヒトI型コラーゲン (human type I collagen, HI) は、コラーゲン技術研修会 (コスモバイオ、東京) より購入した。

コラーゲンは4 mg/ml となるように、0.05M 酢酸に 4°C で、三昼夜攪拌溶解後、 -20°C に凍結し保存した。

III. ELISA 用プレート

材質及びメーカーの異なる以下の三種類のプレートを用い、非特異的反応の強弱及び感度等につき検討を加えた。

1. NuncU11 (Polystyrene 製) (Nunc, Roskilde, Denmark)

2. Falcon 3910 (Polystyrene 製) (Becton Dickinson, Oxnard, USA)

3. Costar 2797 (Polyvinyl chloride 製) (Costar, Cambridge, USA)

IV. 正常家兎血清

62°C 、20分非動化処理をほどこした normal rabbit serum (NRS) (per-Freeze^(R)) は、Biologicals 社 (Rogers, Ark., USA) より購入し、粉末の Tris 及び NaCl を最終濃度が各々 0.1M、0.15M となるように加え、6 NHCl で pH 8.0 にあわせて用いた (緩衝化 NRS)。

V. 抗ヒト IgG 抗体

ペロキシダーゼ標識ウサギ及びヤギの抗ヒト IgG (Fc 特異的) 抗体は Cappel Lab. (Olganon Teknika, Willson, USA) の 3201-0122 及び 3201-0121 を用いた。

VI. 基質溶液

o-phenylenediamine (OPD) は Sigma 社製 (St Louis, USA) を用いた。0.1M クエン酸と 0.2M Na_2HPO_4 さらに H_2O を使用直前に 1 : 1 : 2 となるように混合し、この緩衝液に OPD が 0.05%、 H_2O_2 が 0.018% となるよう溶解し、ELISA 用基質溶液とした。

VII. 血清抗体価の測定

ELISA で Terato ら¹⁹⁾の方法に従って測定した。

各コラーゲン溶液は 5 $\mu\text{g/ml}$ となるようイオン強度 0.4 のリン酸緩衝液、pH 7.5、で希釈し、その 100 μl を ELISA プレートの各ウエルに加え、 4°C で一昼夜放置しプレートをコートした。プレートは使用直前に 0.05% Tween 20 を含む生理食塩液 (saline-Tween) で洗浄し、100 μl の緩衝化 NRS を加え、室温にて 30分放置した (プレートの前処理)。次いで saline-Tween で再度洗浄し ELISA に用いた。

ヒト血清は緩衝化 NRS で通常 50 倍に希釈し、その 100 μl を前処理した ELISA プレートに加え、室温にて 2 時間反応させた。次いで、saline-Tween で洗浄後、0.1M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0、(25% NRS および 0.15M NaCl を含む) で 2000 倍希釈したペロキシダーゼ標識ウサギ抗ヒト IgG を加えた。室温にて 2 時間反応後、再度 saline-Tween でプレートを十分洗浄後、OPD 溶液 100 μl を加え、室温にて 1 時間反応させ、発色後更に 50 μl の 2.5 N H_2SO_4 を加え、反応

sedimentation rate; HI, human type I collagen; HII, human type II collagen; KSCN, potassium thiocyanate; NRS, normal rabbit serum; OA, osteoarthritis; OD, optical density; OPD, o-phenylenediamine; RA, rheumatoid arthritis.

を停止した。発色の強さはオートマチックマイクロフォトメーター Type MTP 22 (コナ社, 茨城) を用いて, 492nm における optical density (OD) を測定した。

VIII. インヒビション試験

抗体の特異性を確認するため, 各々のコラーゲンによるインヒビション試験を行った。患者血清はインヒビション用コラーゲン 50 μ g/ml を含む緩衝化 NRS に50倍に希釈し, 室温にて30分放置し, 以下, 上述した ELISA 法にて同様に測定した。

50%以上インヒビションを受けた時を抗体陽性と判定し, それ以下の時を陰性と判定した。

IX. 軟骨表面の抗II型コラーゲン抗体の抽出

人工膝関節置換術を施行した7例の RA 患者と7例の OA 患者, 更に2例の関節症のない大腿骨頸部骨折患者の関節軟骨をカミソリで薄切りし, 0.1M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5, で3回洗浄した。次いで, その約 500mg を採取し, 2倍量 (W/V) の 3 M

potassium thiocyanate (KSCN) を含む上記緩衝液を加え, 室温で1時間攪拌して軟骨表面に結合した抗体を抽出した。抽出液は 0.22 μ m のフィルターで濾過し, コラーゲン等の細かい組織くずを除去した後, 直ちに 0.1M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5 (0.15M NaCl, 0.05% azide を含む) に透析して, KSCN を除去し, 使用時まで 4°C で保存した。この抽出物中の抗体価測定は, 0.1M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5 (0.15M NaCl, 0.05% Tween 20) で 1:2 から 1:10 に希釈し, ELISA 法により測定した。この方法により軟骨表面に吸着した抗体の回収率は 92.8 \pm 9.1% であった。

X. 血漿交換療法

ダブルフィルトレーションモニター KM8500 (クラレ, 大阪) を用いて, double filtration plasmapheresis (DFP)²⁰⁾ を10例の RA 患者に施行した。DFP は毎週2回を, 平均して8週間施行し, 施行前後の血清と, 施行時に回収した排液を -20°C で凍結保存し,

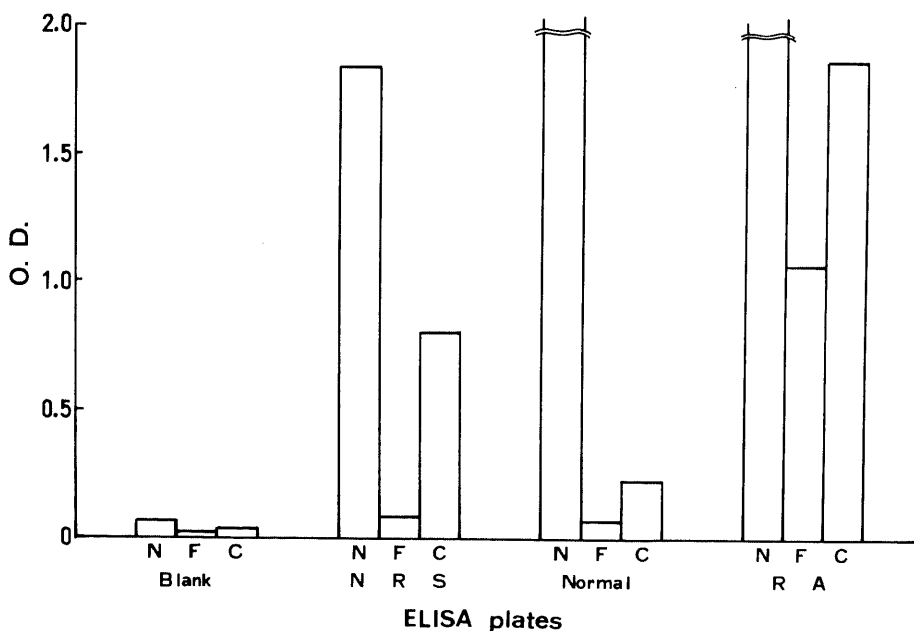


Fig. 1. Hydrophobic absorption of serum IgG components on the plastic surfaces of commercially available ELISA plates. Sera from a patient with RA, a normal control and from a normal rabbit diluted to 1:10 with 0.1M Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 0.15M NaCl were added to the wells of Nunc, Falcon or Costar ELISA plate in 100 μ l aliquots. IgGs adsorbed on plastic surfaces were determined by peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Fc specific) antibodies as described in text. N, Nunc UII (polystyrene); F, Falcon 3910 (polystyrene); C, Costar Serocluster U (polyvinyl 1 chloride).

抗コラーゲン抗体値を ELISA 法を用いて測定した。なお第 2 フィルターは EVA-4A を用い、流速 100ml/M、1 日交換量 2500ml とした。

XI. 統計学的検討

2 変量の相関および回帰分析には、Pearson 積率相関係数 (r) を求め一次回帰式を求めた。相関係数の有意性の検定は t 分布によった。 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. ヒト血清 IgG の ELISA プレートへの吸着

各種 ELISA プレートへのヒト IgG 成分の非特異的吸着につき、方法の項に示した ELISA 法に準じて測定した。すなわち、NRS、正常人及び RA 患者血清を 0.1M Tris-HCl 緩衝液、pH8.0 (含 0.15M NaCl) に 10% となるよう希釈し、その 100 μ l を ELISA プレートに加え、室温で 2 時間反応させた。次いで、ウサギ IgG とも交叉反応を示すペロキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体を 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (0.15M NaCl 及び 0.05% Tween20) (Tris-Tween) で 2000 倍希釈したもの 100 μ l を加え、室温で 2 時間反応後、

OPD を加え、その発色を比較した (図 1)。

その結果、Nunc プレートは NRS、正常人及び RA 患者血清中の IgG 成分を強く吸着していることが明らかであった。これに対して、同じ polystyrene 製の Falcon プレートは NRS 及び正常人血清中の IgG 成分の吸着はごくわずかで、RA 血清中の IgG のみが著明に吸着されていることが示された。また、Costar の polyvinyl chloride 製プレートはいずれの血清に対しても、Nunc と Falcon の中間的な吸着能を有していた。以上のことから、ELISA 用プレートの選択は結果を左右する重要な因子であるとともに、RA 血清中には正常人と比較して、かなりプラスチックに非特異的に結合する IgG 成分が多いことがわかった。

II. ペロキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体の選択

緩衝化 NRS をヒト IgG のプラスチック表面への吸着防止剤として用いる以上、ペロキシダーゼ標識第二抗体は NRS 中の IgG と交叉反応を呈しないことが必須条件である。そこで第二抗体として、ペロキシダーゼ標識ヤギ及びウサギの抗ヒト IgG (Fc 特異的) 抗体について、この特異性を比較した。

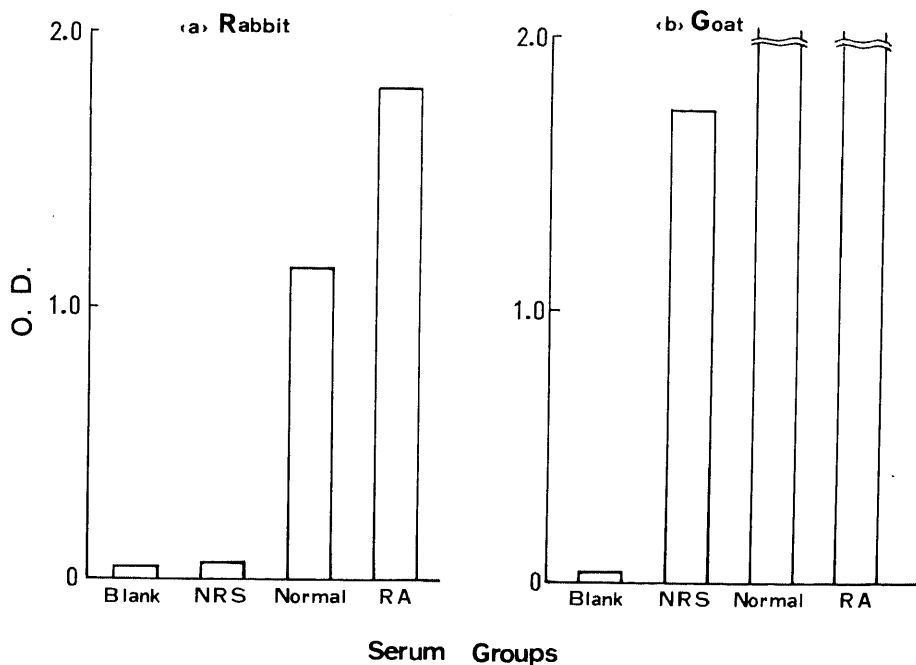


Fig. 2. Demonstration of no cross-reactivity of rabbit anti-human IgG with normal rabbit serum used as a blocking agent in this ELISA system. The diluted sera described in Fig. 1 was added to Nunc plate and the IgG adsorbed on the plastic plate were determined by peroxidase-conjugated rabbit (a) or goat (b) anti-human IgG (Fc specific) as described in Fig. 1.

方法は前述したと同様、Nunc プレートに NRS, 正常人及び RA 血清を吸着させ、第二抗体は2000倍希釈して用いた (図 2a, b). 両抗体ともヒト IgG とよく反応した. 一方、予想されたごとく、ヤギ由来の抗体は NRS 中の IgG と強い交叉反応性を示したのに対して、ウサギ由来の抗体はまったく NRS とは反応せず、その OD 値はブランク値と差はなかった.

III. ペロキシダーゼ標識ウサギ抗ヒト IgG (Fc) 抗体の希釈倍率の検討

第二抗体の最適濃度を決定するため、NRS, 正常人及び RA 血清を前述したと同様に結合させた Costar 及び Falcon プレートを用い検討した. 第二抗体は Tris-Tween で1000~16000倍に希釈し、その 100 μ l を各ウェルに加え、室温で2時間反応させたのち、OPD を加え発色を比較した (図 3a, b).

その結果、Costar 及び Falcon のプレートの間には本質的な差はなく、第二抗体の濃度が高いほど RA も正常人血清も高い値を示した. しかし、1000倍希釈では Costar プレートでいく分バックグラウンド値が高くなる傾向が見られ、感度も考慮すると2000倍希釈が

最適濃度と決定した (図 3a, b).

IV. NRS によるヒト血清 IgG の ELISA プレートへの吸着阻害効果

ヒト血清中の IgG 成分の ELISA プレートへの非特異的吸着に対する NRS の阻害効果を前述した RA 患者血清を用い検討した. RA 患者血清は種々の濃度の緩衝化 NRS (0~100%) にて10倍に希釈し、その 100 μ l を Nunc, Falcon 及び Costar プレートに加え、室温で2時間放置した. 次いでペロキシダーゼ標識ウサギ抗ヒト IgG 抗体 (2000倍希釈) を加え、さらに室温で2時間反応させ、各プレートに吸着したヒト IgG 量を比較した (図 4). その結果、いずれのプレートにおいても、NRS の濃度に比例し、ヒト IgG のプラスチック表面への吸着は著明に阻害された. しかし、NRS 濃度 1~50% ではヒト IgG の吸着防止は十分ではなく、Terato らの報告しているごとく、100% 濃度の NRS が必要であることが確認された. しかし、100% 濃度の NRS でヒト血清を10倍に希釈した場合でも、Nunc プレートではヒト IgG の明らかな吸着が認められ、バックグラウンド値よりも有意に高い

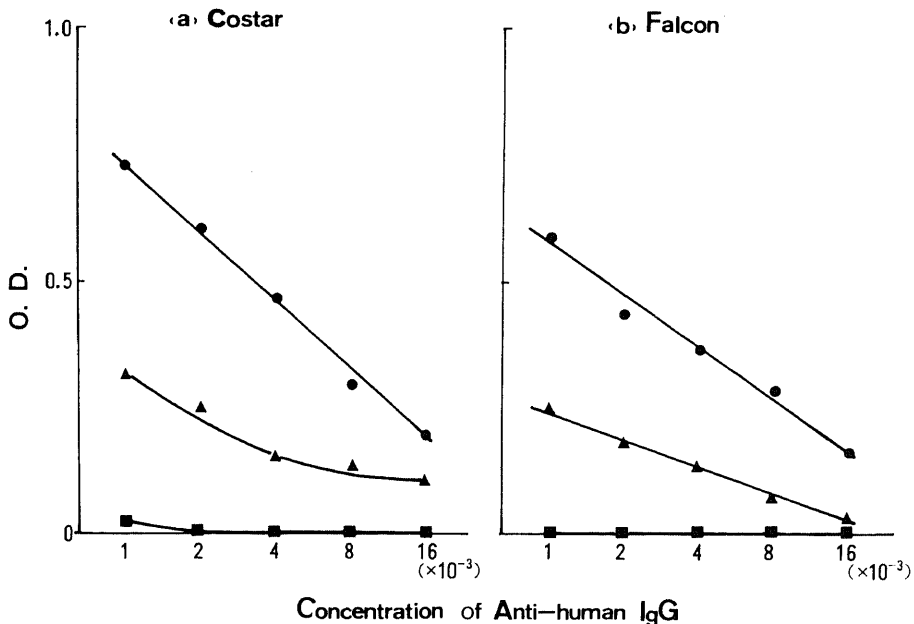


Fig. 3. Effect of dilution rate of peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgG on the assay sensitivity. The diluted sera described in Fig. 1 were added to Costar (a) and Falcon (b) plate and the IgG bound to the plastic were determined by peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgG serially diluted to 1 : 1000~1 : 16000 with Tris-Tween. ●, RA serum; ▲, normal control serum; ■, normal rabbit serum.

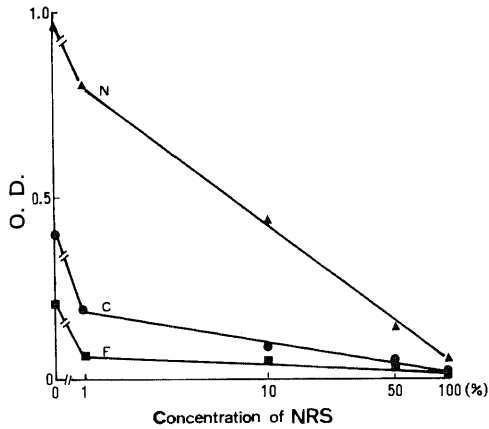


Fig. 4. Blocking effect of NRS on hydrophobic adsorption of human IgGs onto the plastic surface of ELISA plates. Serum from a patient with RA was diluted to 1 : 10 with 0.1M Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 0.15M NaCl and various concentrations of NRS. The diluent was added to ELISA plates in 100 μ l aliquot and reacted for 2 hr at room temperature. The amount of IgGs adsorbed on the surfaced was determined by ELISA using peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgG (Fc) as described in text. \blacktriangle , Nunc U II (polystyrene); \blacksquare , Falcon 3910 (polystyrene); \bullet , Costar Serocluster U (polyvinyl chloride).

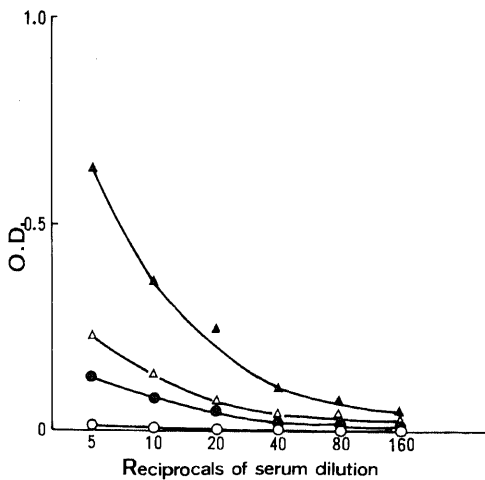


Fig. 5. dilution effect of human sera on anti-type II collagen antibody titers. \blacktriangle , RA serum/Nunc U II; \triangle , Normal serum/Nunc U II; \bullet , RA serum/Falcon 3910; \circ , Normal serum/Falcon 3910.

OD 値が観察された。

V. ヒト血清の希釈倍率の検討

RA 患者血清は正常人血清よりも ELISA プレート
のプラスチック表面に吸着する IgG 成分量が著明に
多いこと、その吸着防止には100%濃度の緩衝化
NRS が必要なことが今までの検討結果より推察され
た。しかし、ELISA 法における非特異的反応を除外
し、特異的に抗体を測定するためには、試料血清の希
釈倍率も当然重要な因子となることが推察される。
よって、RA 患者血清を最低何倍まで希釈すべきかを
IgG 吸着能の最も高い Nunc プレートと、最も低い
Falcon プレートをを用い検討した (図 5)。その結果、
RA 患者血清を100%緩衝化 NRS で40倍以上に希釈
すれば、Falcon プレートではヒト IgG の吸着は無視
できるまでに抑制された。同様の傾向が、Nunc プ

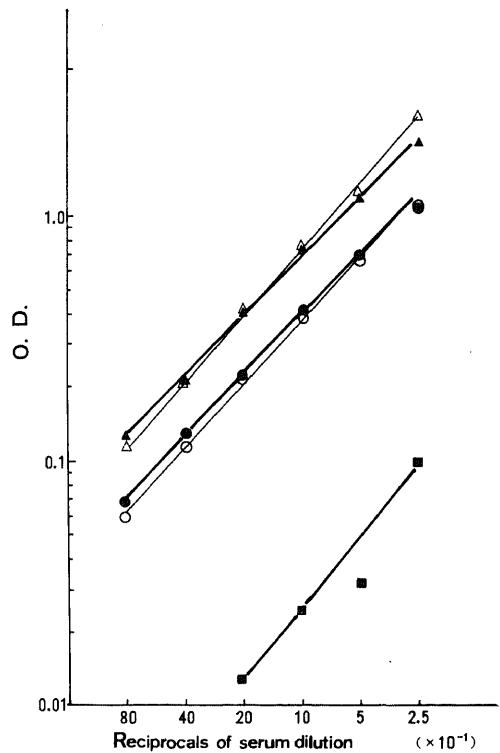


Fig. 6. Comparison of the sensitivity for the assay of collagen antibodies in three different ELISA plates. Serum from a patient with RA were assayed for the antibody titers using HII (closed symbols) or CII (open symbols)-coated ELISA plates. \blacktriangle & \triangle , Nunc U II; \bullet & \circ , Costar Serocluster U; \blacksquare , Falcon 3910.

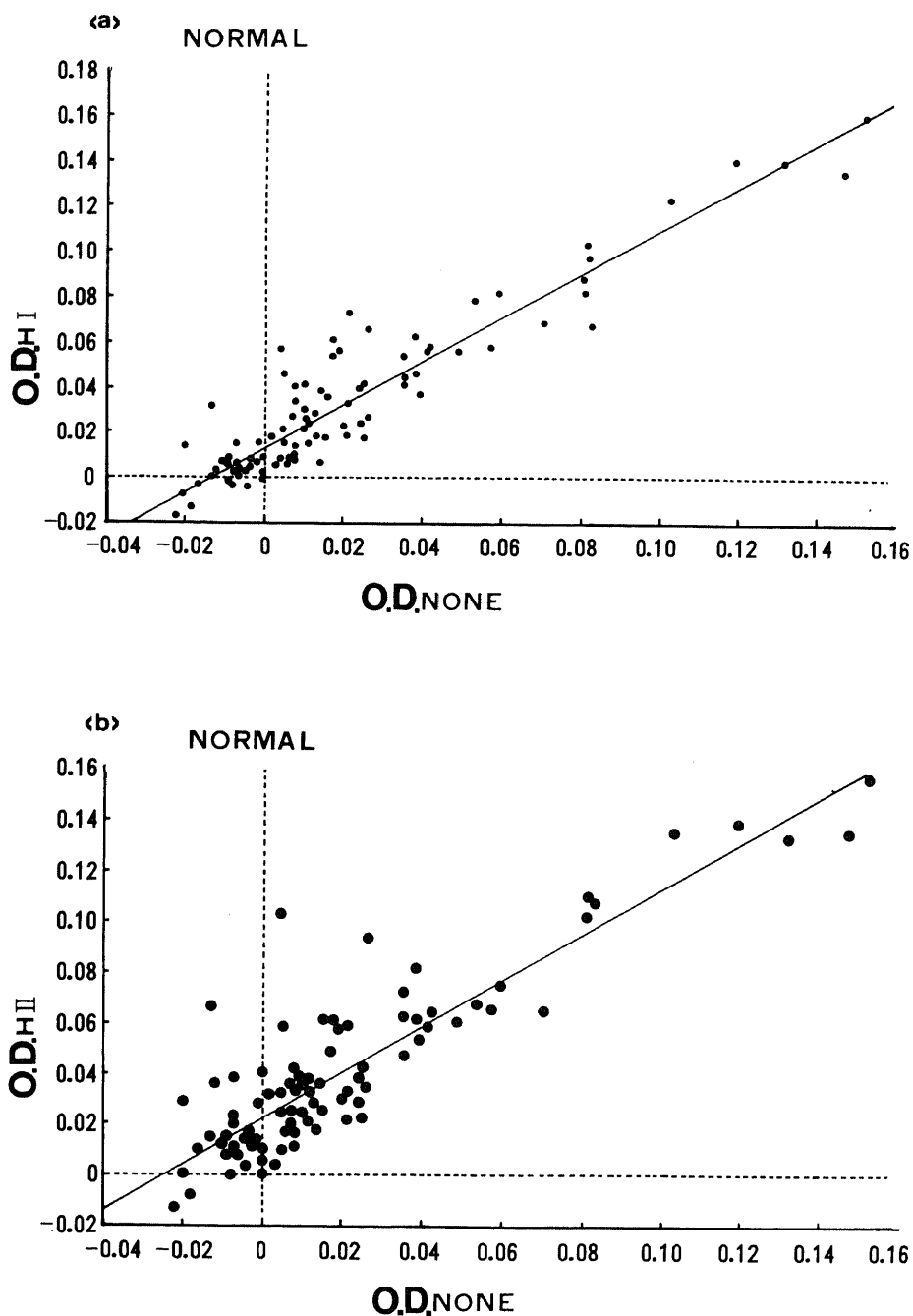


Fig. 7. Regression analysis of the titers against uncoated, HI- or HII-coated plastic surface in ELISA for normal sera. One hundred normal sera diluted to 1 : 50 with buffered NRS were reacted with uncoated (NONE) HI- or HII-coated wells of Costar polyvinyl chloride microtiter plates as described in Fig. 4. Relationships between titers NONE and titers HI (a) and between titers NONE and titers HII (b) were shown by regression lines.
 (a) $Y=0.973X+0.013$ ($r=0.931$, $p<0.01$) (b) $Y=0.916X+0.023$ ($r=0.881$, $p<0.01$)

プレートでも認められたが、この場合は160倍以上の希釈が必要であった。同様に正常人血清で検討した結果、Falconでは5倍以上、Nuncでは40倍以上の希釈倍率でIgGの吸着は無視できる程度に抑制された。

VI. ELISA プレートの感度の比較

ニワトリII型コラーゲン(CII)を免疫し関節炎を発症したカニクイザルの血清を用い、三種のプレートの測定感度を比較した。各々のプレートに、HIIまたはCIIを5 μ g/mlコートし、RA血清を緩衝化NRSで25~800倍に希釈して用いた。また、第二抗体はウサギの抗ヒトIgG抗体がサルIgGと十分に交叉反応を示したので、ヒトIgG測定の場合と同様に2000倍希釈して用いた(図6)。その結果、NuncとCostarプレートでは、ヒトRA血清は25~800倍希釈範囲で、HIIおよびCIIに対するOD値は直線性を示し、両者には大きな差は認められなかった。これに

対しFalconプレートでは前2者に比べて、OD値は約1/3であった。すなわち、NuncとCostarプレートはヒトIgGの吸着能に著明な差異があるものの、II型コラーゲンの吸着能にはほとんど差がないものと推察された。一方、Falconプレートは前2者に比べて、ヒトIgGのみでなくII型コラーゲンの吸着能も著しく低いことが明らかとなった。

VII. 個々の血清の与えるバックグラウンド値

正常人血清100例を用いて、Costarプレートを用いた場合の非特異的反応によるバックグラウンドの実測値のばらつきの範囲について検討した。正常人血清はすべて緩衝化NRSで50倍に希釈し、方法の項に述べたELISA法により測定した。また、Costarプレートには、HIまたはHIIをコートしたもの及び、抗原溶解に用いたリン酸緩衝液のみを加えたものの三種類を用い、それぞれに対するOD値(OD_{HI}, OD_{HII},

Table 1. Incidence of antibodies HII, CII, BII, HI and BI in sera from patients with rheumatoid arthritis.

Case No	ESR (2H)	Optical Density at 492nm									
		HII (%)		CII (%)		BII (%)		HI (%)		BI (%)	
6	116	.707	100	.723	83	.794	57	.301	19	.119	0
10	38	.172	100	.019		.039		-.029		-.015	
23	125	.091		.116	0	.106	100	.071		-.013	
24	26	.194	100	-.049		-.057		-.039		.089	
26	109	.162	100	.065		.102	100	-.036		-.079	
29	94	.772	92	.447	71	.621	51	-.017		-.008	
38	84	.186	66	.087		.139	76	.021		-.014	
42	99	-.008		-.016		.113	100	-.024		-.027	
47	33	.295	100	.330	53	.016		.025		.046	
48	54	.096		.030		.031		.004		.114	86
49	75	.155	92	.063		.133	84	-.023		-.015	
51	70	.041		.025		.408	86	.011		.256	100
58	132	.568	59	.639	100	.380	85	-.026		-.119	
65	6	.230	69	-.015		.768	97	.014		.915	95
73	120	.543	95	.436	51	.643	92	.024		-.011	
74	126	.908	94	.725	68	.970	73	.045		-.013	
89	141	.031		.114	75	.006		-.003		.021	
90	115	.293	100	.096		.240	52	.056		.043	
92	130	1.115	100	1.203	78	.941	84	.014		.009	
93	167	.099		.020		.011		.010		.184	72
94	149	.151	100	.054		.168	93	.028		.026	

RA sera diluted to 1 : 50 with buffered NRS were assayed for antibodies against HII, CII, BII, HI and BI by ELISA as described in text. Sera showing OD values higher than 0.1 were subjected to inhibition test using corresponding antigen. (%): Inhibition percent

ODNONE)を比較した結果(図7a, b), 実測値の平均±SD値はODNONE=0.0180±0.0337, ODHI=0.0305±0.0352, ODHII=0.0390±0.0350で各々のOD値は図に示したごとくODNONEとODHI, ODNONEとODHII, ODHIとODHIIは各々相関関係 r が0.931 ($p<0.01$), 0.881 ($p<0.01$), および0.958 ($p<0.01$)で有意な相関を示した. すなわち, ELISAにおける個々の血清のバックグラウンド値は, 血清中のIgG成分のプラスチック表面への非特異的吸着によることが明らかとなった. 言い換えると, ヒト血清中の抗コラーゲン抗体価を判定する場合, 個々の血清は個々のバックグラウンド値を与えるため, 各々の血清につきブランク値を正確に判定することが重要であることが明らかとなった.

VIII. RA患者血清中の抗II型コラーゲン抗体価の陽性率について

RA患者血清96例につき, 同様に, ヒト(H-), ニワトリ(C-), ウシ(bovine, B-)のIおよびII型コラーゲンに対する抗体価を, Costar プレートを用いて, NRSをブロッキング剤とするELISA法により判定した. 各々のブランク値を差し引いた値を表1に示した. 吸光度(OD値)が0.1以上を陽性とし, さらに抗体の特異性を確認するためにインヒビションテストを行い, 50%以上インヒビションを受けた時を陽性と判定した. その結果, HII, CII, および bovine type II collagen (BII)に対するRA患者の抗体陽性率は各々15/96 (15.6%), 8/96 (8.3%), 15/96

(15.6%)で, BIに対しては, 4/96 (4.2%)であった. しかし, HIに対する抗体は全例陰性であった. RA患者の抗HII抗体陽性15例中, 6例はCII, BIIの両者にも陽性を示し, さらにBIIだけに陽性を示すものは6例, CIIだけに陽性を示すものは1例であった. すなわち, 抗HII抗体陽性15例中の13例(86.7%)が, CII, BIIまたはその両者に陽性を示し, 異種II型コラーゲン分子上の共通抗原部分が主に認識されていることが推察された. 臨床的には, HII, CII, BIIに陽性を示す群には, 血沈, c-reactive protein (CRP)の亢進したdefinite~classical RA例が多く, 一方, HII, BIIに陽性を示す6例中3例は, early RAの症例であった.

一方, 抗体陽性例において, RAのstage, classとの直接的な因果関係は明らかとはならなかった. しかし, 抗HII抗体陽性例では, 抗体価と血沈値(2時間値)との間には, $r=0.506$ ($p<0.05$)の相関が認められ, 抗HII抗体がRAの活動性に関与していることが推察された(図8).

IX. 軟骨表面の抗II型コラーゲン抗体の陽性率

RA 7例より, 上述した方法で軟骨表面の抗体を抽出し, ELISA法により測定した(表2). RA患者7例中4例(57.1%)に陽性が存在した(OD値0.241~6.602). 一方, 対照として7例の変形性膝関節症患者と, 2例の関節症のない大腿骨頸部骨折患者の関節軟骨を用い, 同様の方法で測定したが, 陽性検体はなかった.

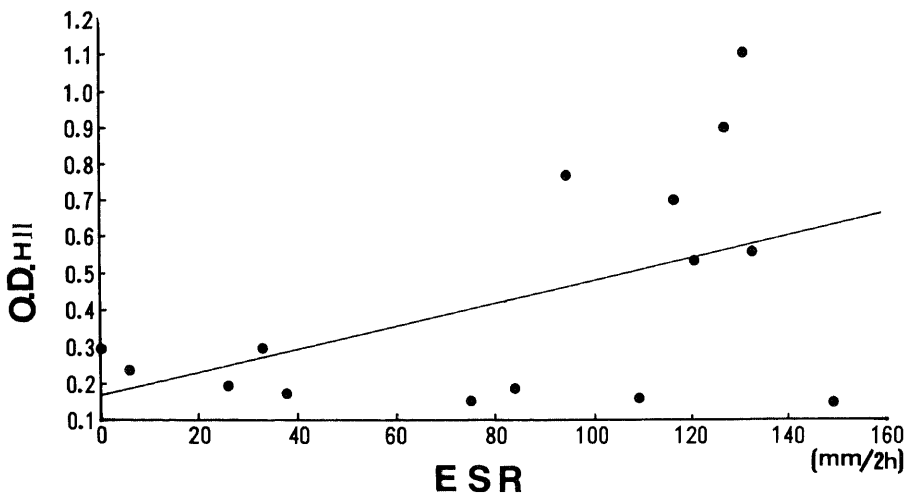


Fig. 8. Correlation between antibody titers to HII and ESR values in RA patients.

$$Y = 0.00322X + 0.164 \quad (r = 0.506, p < 0.05)$$

Table 2. Incidence of antibodies against H II on cartilage from patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and from normal controls.

Diagnosis	stage	class	O.D.H II
RA	III	II	0.011
RA	III	III	0.451
RA	III	IV	6.602
RA	IV	IV	0.458
RA	III	III	0
RA	IV	IV	0.241
RA	III	III	0.020
OA			0.007
OA			0
OA			0
OA			0
OA			0.009
OA			0
OA			0
Normal			0.027
Normal			0

OD values more than 0.1 were positive. OA, osteoarthritis; RA, rheumatoid arthritis.

X. DFP 施行患者血清と排液中の抗体価

DFP 施行の RA 患者10例のうち classical RA の3例のみが抗体陽性であり、その1例は H II, C II, B II に、1例は H II と B II に、もう1例は B I のみに対し抗体陽性であった。DFP 施行前後の血中の抗体価を比較すると、施行後では抗体価は約30%減少し、逆にその排液中は、その分濃縮されていた。しかし、血中抗体価は3~4週間で元の値近くに復帰しており、DFP では一時的な抗体の除去はできるが、約8週間の長期にわたっては、血中抗体価の抑制は認められなかった。一方 C II, B II は、血中、排液中とも、ほぼ同一の経過を示した(図 9a, b, c)。また、従来から言われている血清学的諸検査は一時的に改善するものの、長期にわたってはリバウンド現象を呈し、再び悪化傾向を示していた。臨床的にも、関節症状の軽度の改善はあるものの、著明なものではなかった。

考 察

ヒト血清中の抗II型コラーゲン抗体に関する報告はこの数年数多くなされている。しかし、RA における陽性率は0.3~95%と、報告者によって著しく異なる^{10)~16)}。また、RA 患者血清中の抗体の特異性に関して、II型コラーゲンにのみ特異的であるとする報告¹⁰⁾と、I, II, III, IV型コラーゲンすべてに対して反応する抗体を有しているとする報告¹⁴⁾もある。さらに変性したII型コラーゲンに対する抗体価は、未変性コ

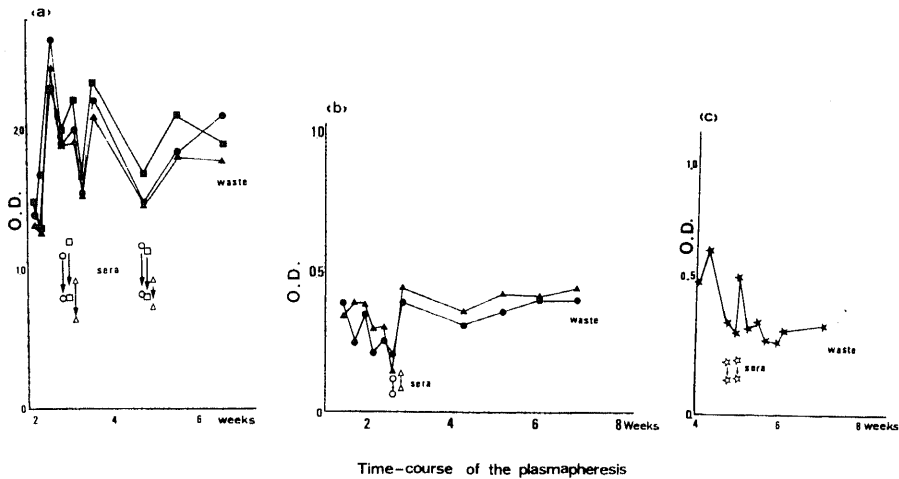


Fig. 9. Time-course of the serum levels of antibodies against H II, C II, B II and B I in three RA patients (a, b, c) before and after treatment of double filtration plasmapheresis. ●&○, H II (waste, serum); ■&□, C II (waste, serum); ▲&△, B II (waste, serum); ★&☆, B I (waste, serum).

ラーゲンに対する抗体価より高く、従って、慢性炎症の二次的な結果として抗II型コラーゲン抗体が産生されるとの報告¹⁹⁾もあり、RAにおける抗II型コラーゲン抗体の病因的意義はまったく不明と言ってよい。

今まで報告されたデータの不一致点は、抗体の測定システムの違いだけでなく、すべての測定系に含まれる非特異的な反応に起因すると考えた。そこで最近報告されたNRSを非特異的反応の防止剤として用いたELISA法の基礎的な検討を行った。その結果、今まで述べて来たごとく、非特異的反応をほぼ完全に除去した特異性の高い抗II型コラーゲン抗体の測定法を確立することができた。すなわち、ヒト血清中のIgGのプラスチック表面への非特異的吸着をウサギ血清のごとき異種血清でブロックし、感度の高いCostarプレートを不使用し、各々の血清に応じたバックグラウンド値を正しく差し引くことで、非特異的反応をほぼ除去したELISA法が完成した。

この方法により、RA患者血清中の15.6%にHIIコラーゲンに対する特異的抗体が認められ、さらにCIIコラーゲンに対しては8.3%、BIIコラーゲンに対しては15.6%の陽性率を示した。しかし、HIに対する抗体はまったく認められず、従来の多くの報告²¹⁾とは異なった結果が得られた。また、RA患者血清中の抗HII抗体は、CII、BIIまたはその両者と交叉反応性を示すことから、従来より動物のコラーゲン関節炎モデルで明らかとなっているように、本抗体もII型コラーゲン分子上の種を越えた共通抗原を認識しているものと推察される。すなわち、RAの発症にはII型コラーゲンの抗原としての特異性が関与している可能性もあり、今後の研究の発展が期待される。

臨床的にはRAのstageやclassと抗II型コラーゲン抗体との因果関係は認められなかったが、血沈との相関が認められることから、本抗体がRAの病因の一つとして、その活動性に関与している可能性も考えられる。一方、最近double filtration plasmapheresis^{22)~24)}の有効性について論議されているが、今回の測定では、一時的な抗体の除去は可能であるが、長期にわたっては抗体価の変動は少なく、もしII型コラーゲン抗体が病因の一つと考えられるなら、DFPは効果的な治療法になり得ないと推察される。

以上の結果、一部のRAにおいてII型コラーゲンが自己抗体として何らかの病因的意義を有している可能性が示唆された。しかし、抗体の陽性率は当初予想したより著しく低かった。この理由として、ELISAにおける非特異的反応を十分除去するため、血清を50倍以上に希釈する必要があり、測定感度が不十分である

ことが考えられる。一方、患者における抗体産生部位についても、関節局所、すなわち滑膜上のリンパ球のような局所を仮定すれば当然血中抗体価の低さや頻度の低さも説明できる。すなわち、II型コラーゲンは不溶性の結合組織成分であり、関節局所で産生された抗体は軟骨表面に蓄積され、血液中にはその一部しか流出してこないことが考えられ、このことは、RA患者の軟骨の60%以上にII型コラーゲン抗体の結合が見られたとのJasinらの報告²⁵⁾からも推察され、今後の重要な問題である。そこで、我々は小数例ではあるが、RA及びosteoarthritis(OA)患者軟骨上に抗体が存在するか否かを検討した。その結果、たしかにRAのみに特異的に軟骨表面に高濃度に抗体が結合していることが明らかとなり、上記の仮説を支持する結果が認められた。従って、今後はアクティブなRA患者の関節軟骨表面の抗II型コラーゲン抗体の陽性率、血中抗体価との関係、IgGのsubclass、II型コラーゲン分子上の認識エピトープなどにつき、詳しく研究する必要がある。それによって、RAにおけるII型コラーゲンの自己抗原としての可能性、さらには抗II型コラーゲン抗体の慢性関節炎における病因的意義がさらに明らかにできるものと考えられる。

結 論

特異性の高いELISA法を確立し、その方法により、RA患者血清中の抗II型コラーゲン抗体と軟骨表面上の抗体を測定し、RAにおける抗II型コラーゲン抗体の病因的意義を検討した。

1. ELISAによるヒト血清中の抗体測定にみられる非特異的反応は、主にヒト血清中のIgGのプラスチック表面への非特異的な吸着によること、及びその吸着量はプラスチックの材質で著しく異なることが明らかとなった。

2. 上記非特異的反応は、ウサギ血清のごとき異種血清をヒトIgG吸着のブロッキング剤として用いることにより十分除去できることが明らかとなった。

3. ブロッキング剤として100%濃度のNRSを用い、ヒト血清を50倍以上に希釈することにより特異的に抗コラーゲン抗体が測定できた。

4. 測定用プレートとしては、感度の高さと非特異的反応の低さから、Costarプレートが適していることが明らかとなった。

5. 本測定法を用い、96例のRA患者血清中の抗ヒトII型およびI型コラーゲン抗体を測定した結果、RAのみに特異的に抗ヒトII型コラーゲン抗体が、15.6%に見い出された。

6. ヒトI型コラーゲンに対する抗体はまったく認められず、従来の報告とは異なった結果が得られた。

7. 抗ヒトII型コラーゲン抗体陽性血清は、ニワトリ、ウシII型コラーゲンとも交叉反応性を示し、本抗体はII型コラーゲン分子上の共通抗原を認識している可能性が示された。

8. 抗II型コラーゲン抗体はRA軟骨表面にも57.1%の頻度で認められ、本抗体が関節炎の病因的な役割を有している可能性が示唆された。

9. 血漿交換療法では、一時的に抗体の除去は可能であるが、長期には血中抗体価の変動は見られず、もし上記抗体が病因として第一義的役割を有しているとするなら、本治療法は、RAにとって効果のないものと推察された。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御指導と、御校閲を賜りました恩師野村進教授に深甚なる謝意を表します。また、親身なる御教示を戴きました、東京医科歯科大学難治疾患研究所永井裕教授と、直接御指導、御教示戴きましたエーザイ筑波研究所寺戸昭博士に心より感謝いたします。さらに、貴重な御助言、御校閲を賜りました金沢大学医学部第一病理学教室中西功夫教授に深謝致します。統計学的検討について御助言戴きました金沢大学医学部衛生学教室橋本和夫教授に深謝致します。また、本研究遂行に際して御助言、御協力戴きました金沢大学医学部整形外科非常勤講師宗広忠平博士に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨の一部は、第70回中部日本整形外科災害外科学会(1988年名古屋)、第32回日本リウマチ学会(1988年仙台)において発表した。

文 献

- 1) Miller, E. J.: Isolation and characterization of a collagen from chick cartilage containing three identical chains. *Biochemistry*, **10**, 1652-1659 (1971).
- 2) Trentham, D. E., Townes, A. S. & Kang, A. H.: Autoimmunity to type II collagen: An experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.*, **146**, 857-868 (1977).
- 3) Terato, K., Hashida, R., Miyamoto, K., Molimoto, T., Kato, Y., Kobayashi, S., Tajima, T., Otake, S., Hori, H. & Nagai, Y.: Histological, immunological and biochemical studies on type II collagen-induced arthritis in rats. *Biomed. Res.*, **3**, 495-505 (1982).
- 4) Courtenary, J. S., Dollman, M. J., Dayan, A. D., Martin, A. & Mosedale, B.: Immunization against heterologous type II collagen induced arthritis in mice. *Nature*, **283**, 666-669 (1980).
- 5) Wooley, P. H., Luthra, H. W., Stuart, J. M. & David, C. S.: Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (Ir region) linkage and antibody correlates. *J. Exp. Med.*, **154**, 688-700 (1981).
- 6) Stuart, J. M. & Kang, A. H.: Editorial: Monkeying around with collagen autoimmunity and arthritis. *Lab. Invest.*, **54**, 1-3 (1986).
- 7) Cremer, M. A., Townes, A. S. & Kang, A. H.: Collagen-induced arthritis in rodents. A review of clinical, histological and immunological features. *The Rhyumach*, **24**, 45-46 (1984).
- 8) Stuart, J. M., Townes, A. S. & Kang, A. H.: The role of collagen autoimmunity in animal models and human disease. *J. Invest. Dermatol.*, **79**, 121-127 (1982).
- 9) Terato, K., Hasty, K. A., Cremer, M. A., Stuart, J. M., Towns, A. S. & Kang, A. H.: Collagen-induced arthritis in mice: Localization of an arthritogenic determinant to a fragment of the type II collagen molecule. *J. Exp. Med.*, **162**, 637-646 (1985).
- 10) Michaeli, D. & Fudenberg, H. H.: The incidence and antigenic specificity of antibodies against denatured human collagen in rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **2**, 153-159 (1974).
- 11) Andriopoulos, N. A., Mestecky, J., Miller, E. J. & Bradley, E. L.: Antibodies to native and denatured collagens in sera of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **19**, 613-617 (1976).
- 12) Mentel, J., Steffen, C., Kolart, C., Kojer, M. & Smolen, J.: Demonstration of anticollagen antibodies in rheumatoid arthritis synovial fluids by C^{14} -radioimmunoassay. *Arthritis Rheum.*, **21**, 243-248 (1978).
- 13) Clague, R. B. & Moore, L. J.: IgG and IgM antibody to native Type II collagen in rheumatoid arthritis serum and synovial fluid. Evidence for the presence of Collagen-Anticollagen Immune Complex in synovial fluid. *Arthritis Rheum.*, **27**, 1370-1377 (1984).
- 14) Stuart, J. M., Huffstutter, E. H., Townes, A. S. & Kang, A. H.: Incidence and specificity of

antibodies to type I, II, III, IV and V collagen in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases as measured by ^{125}I -radioimmunoassay. *Arthritis Rheum.*, **26**, 832-840 (1983).

15) **Beard, H. K., Ryvar, R., Shingle, J. & Greenbury, C. L.**: Anticollagen antibodies in sera from rheumatoid arthritis patients. *J. Clin. Pathol.*, **33**, 1077-1081 (1980).

16) **Ebringer, R. w., Rook, G., Swan, G. J. & Bottazzo, F.**: Autoantibodies to cartilage and type II collagen in relapsing polychondritis and other rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, **40**, 473-479 (1981).

17) **Gossiau, B. & Barrach, H. J.**: Enzyme-linked immunosorbent microassay for quantification of specific antibodies to collagen type I, II, III. *J. Immunol. Methods.*, **29**, 71-77 (1979).

18) **Watson, W. C., Cremer, M. A., Wooley, P.H. & Townes, A. S.**: Assessment of the potential pathogenicity of type II collagen autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis: Evidence of restricted IgG 3 subclass expression and activation of complement C 5 to C 5a. *Arthritis Rheum.*, **29**, 1316-1321 (1986).

19) **Terato, K., Shimozuru, Y., Hasty, K. A., Cremer, M. A., Stuart, J. M., Townes, A. S. & Kang, A. H.**: Localization of an arthritogenic

epitope to a fragment of the type II collagen molecule. *Jap. J. Inflammation*, **6**, 351-356 (1986).

20) **Agishi, T. & Kaneko, I.**: Double filtration plasmapheresis. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, **26**, 406-411 (1980).

21) **Mestecky, J., Miller, E. J., Gay, S. & Andriopoulos, N. A.**: Immune response to collagen. In Panayi, G. S. & Johnson, P. M. (eds.) *Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis*, p63 Reedbooks, Chersey, Surrey, 1979.

22) **Wallace, D. J. & Goldfinger, D.**: **Plasmapheresis and lymphoplasmapheresis in the management of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.*, **22**, 703-710 (1979).

23) **Rothwell, R. S. & Davis, P.**: Controlled study of plasma exchange in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **23**, 785-788 (1980).

24) **Dwosh, I. L. & Giles, A. L.**: Plasmapheresis therapy in rheumatoid arthritis, a controlled, double-blind, crossover trial. *N. Eng. J. Med.*, **308**, 1124-1129 (1983).

25) **Jasin, H. E.**: Autoantibody specificities of immune complexed sequestered in articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, **28**, 241-248 (1985).

Experimental Studies on Anti-Type II Collagen Antibodies in Sera of Patients with Rheumatoid Arthritis Mitusada Sagara, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **97**, 942—955 (1988)

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay, rheumatoid arthritis, anti-type II collagen antibody, normal rabbit serum, double filtration plasmapheresis

Abstract

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of the anti-type II collagen antibody was established. The use of the Costar plate coated with the undiluted normal rabbit serum as a blocking reagent prevented nonspecific adsorption of human immunoglobulin G on the plastic plate surface. Thus, the assay provided more accurate measurement. It is essential to dilute the sample sera more than 50 times. By using this ELISA, the anti-type II collagen antibody levels in sera of patients with rheumatoid arthritis (RA) were measured, and the incidence of positive serum was evaluated. The

anti-type II collagen antibodies extracted from the rheumatoid articular cartilage were also determined by using the novel ELISA method. Out of 96 patients with RA, 15 (15.6%) gave a positive reaction for the anti-type II collagen antibody, but no appreciable level of antibodies against type I collagen was detected. The positive sera for the human anti-type II collagen antibody showed cross reactivity against both chick and bovine type II collagens, suggesting that there are the common epitopes on these type II collagen molecules recognized by the anti-human type II collagen antibody. In contrast to the RA sera, when the occurrence of the anti-type II collagen antibody on the articular cartilage obtained at the time of operation was examined, 4 (57.1%) out of 7 patients with RA showed positive reaction for the anti-type II collagen antibodies, but neither the 9 cases of arthrosis deformans nor the normal subjects examined showed such reactions. The occurrence and titer of the anti-type II collagen antibodies in RA sera was well correlated with elevation of erythrocyte sedimentation rate of the patients, but no causative relations were detected between the antibody level and the stage and/or class of the disease, suggesting that the occurrence of anti-collagen antibodies might be associated with the activity of RA. Treatment of RA patients with double filtration plasmapheresis was successful in reducing the plasma level of the anti-type II collagen antibody in the patients. However, the effect of this treatment was transient and the titers of the antibody was shown to return to the initial level within several weeks, indicating the limited efficacy of the treatment.