

## 酵素標識抗体法による人血清中 IgM, IgA, IgG リウマチ因子の測定値について

唐下博子<sup>1)</sup>・一村光子<sup>1)</sup>・崎山順子<sup>1)</sup>  
大井治昭<sup>1)</sup>・笹井誠二<sup>2)</sup>

The Units of IgM, IgA and IgG  
Rheumatoid Factors by Enzyme Linked Immunosorbent Assay in Human Sera

Hiroko TOHGE<sup>1)</sup>, Mitsuko ICHIMURA<sup>1)</sup>, Junko SAKIYAMA<sup>1)</sup>  
Haruaki OOI<sup>1)</sup>, Seiji SASAI<sup>2)</sup>

The measurement of Rheumatoid Factor (RF) has been a valuable tool in diagnosing Rheumatoid Arthritis (RA) for many years. Since Waaler's discovery of the RF, many studies have been carried out. In the recent years studies have been shown that there is no such correlation between the level of the RF titers and disease activity. In this report we have measured the IgM-RF, IgA-RF and IgG-RF by an Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for 144 normal human sera and 50 patients sera.

At the same time we have measured the titers of gelatin particle agglutination (RAPA) and the Latex agglutination (RA-test). The value of IgG-RF have been most correlated to the titers of RAPA ( $r=0.9037$ ). Using this ELISA technic to detect IgM-, IgA- and IgG-RF, have been aviable more clearly the activity and the stage of Rheumatoid disease.

**Key Words :** ELISA, IgM-RF, IgA-RF, IgG-RF, RA test

### 1. はじめに

慢性関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis : RA) 患者血清中に特異的に出現する因子として命名されたりウマチ因子 (Rheumatoid factor : RF)<sup>1),2)</sup>は, 現在では各種動物の IgG に affinity のある, 人の IgG の Fc 部分に主として反応する自己抗体であることが判明し<sup>3),4)</sup>, RA 以外の自己免疫疾患患者血清中等にも高率に検出されている。さらに RF は免疫グロブリンクラス別に IgM-, IgA-, IgG-, IgE-RF 等としても存在し, その意義についても研究が進んでいる<sup>5)-10)</sup>。

日常臨床検査としての RF の測定方法は時代とともに変遷し, 種々の担体を用いて, ラテックス凝集反応 (LFT), 受身赤血球凝集反応 (RAHA,

Waaler-Rose Reaction), ゼラチン粒子凝集反応 (RAPA) 等による定性, 半定量法あるいは、免疫比濁法 (TIA), 免疫比ろう法 (LNA), ラテックス凝集比濁法 (LFTIA) 等による微量の RF の定量も盛んとなって来た。しかし, これらの方法はいづれも IgM-RF を主として反映した凝集法に基づいた方法であるため, IgM-RF 以外の免疫グロブリンクラス別 RF (Ig-RF) についての動態を把握することは不可能であった。今回私達は酵素標識抗体法 (ELISA) により, 人血清中の IgM-, IgA-, IgG-RF 値を測定し, 日常臨床検査法として簡便に使用されているラテックス凝集スライド法 (RA テスト) および半定量法である RAPA 法との比較を行い, また人血清中の各免疫

1) 岡山大学医療技術短期大学部衛生技術学科  
2) 岡山中央血液検査センター

グロブリン量 (IgM, IgA, IgG) と Ig-RF 値との関連性についても考察を行ったので報告する。

## 2. 材料および方法

健康診断で肝機能検査, 尿検査に異常の認められない健康人144例(男子75名, 女子69名, 20~79才) および RF 測定依頼のあった患者血清50例を用いてマイクロプレート ELISA 法 (免疫グロブリンクラス別 RF 測定試薬; 東洋紡績KK) にて, 図1に示す術式に従って, IgM-, IgA-, IgG-RF 値を測定した。まず, リン酸緩衝液 (pH 7.2) にて

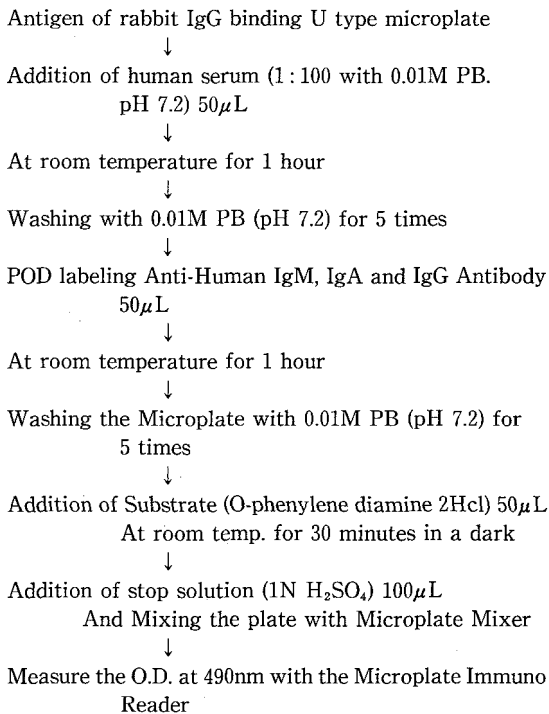


Fig. 1. Procedure of ELISA detecting Rheumatoid factors at each Immunoglobulin class

1:100に希釈した人血清50 $\mu$ lをU字型マイクロプレートに固定してある牛アルブミン-抗牛アルブミン家兎IgG抗体に反応, 洗浄(プレート・ウォッシャー; 日本インターメッド社)後, 抗人IgM, IgA, IgGに対するPOD標識抗体と反応後洗浄し, 酵素反応による発色を490nm(イムノリーダー; 日本インターメッド社)にて比色し, 検量

線より各Ig-RF値(IU/ml)を求めた。また患者血清については, LFTのスライド法(RAテスト; 協和薬品KK)にて定性反応, RAPA法(セロディア-RA; 富士レビオKK)にて半定量反応を各々説明書に従って実施した。さらに患者血清中の免疫グロブリン量(IgM, IgA, IgG)は, SRID法(血漿蛋白定量用免疫拡散法; MBL社)にて, 説明書に従い, 形成された沈降輪より各々の濃度(mg/dl)を求めた。

## 3. 結果

健康人血清中のIgM-, IgA-, IgG-RF値は対数正規分布を示し, 表1に平均値( $\bar{M}$ )と標準偏差( $2\sigma$ )を示した。健康人血清中の各々のIg-RF

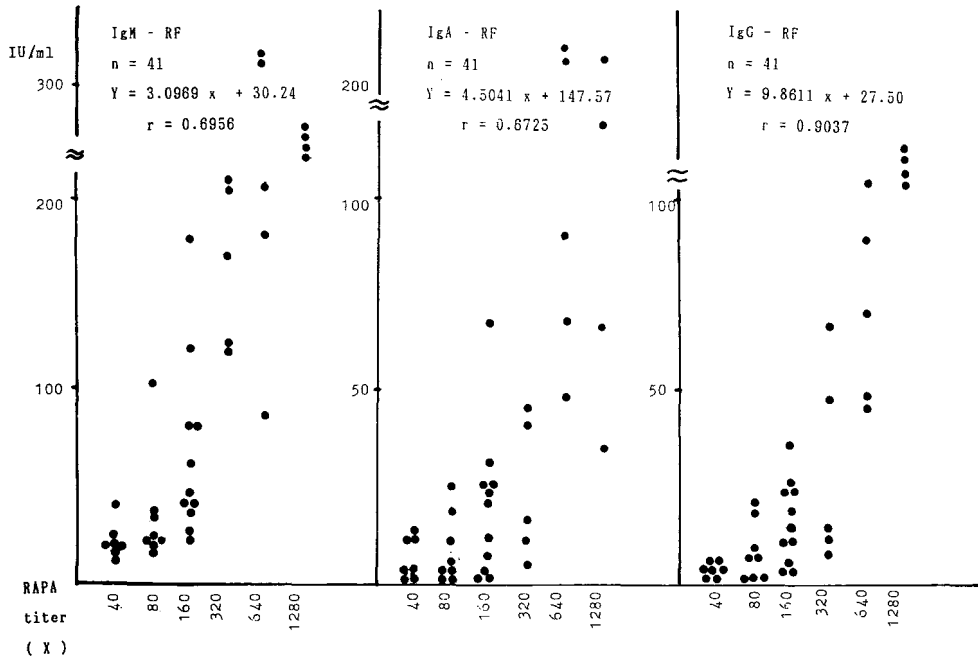
Table 1. Normal value of serum IgM-, IgA- and IgG-Rheumatoid Factor by ELISA

IU/ml	IgM-RF		IgA-RF		IgG-RF	
	mean	2 $\sigma$	mean	2 $\sigma$	mean	2 $\sigma$
man (n=75)	9.09	2.24 ~ 36.87	3.07	0.72 ~ 19.09	4.21	1.31 ~ 13.56
woman (n=69)	9.07	2.27 ~ 36.17	3.56	0.52 ~ 24.47	3.58	1.06 ~ 12.04

値は, 男子総平均値と女子総平均値について, 有意差検定(Student's T test; t検定)を行ったが, いずれのIg-RF値についても男女間では有意差は認められなかった。

患者血清については, RAPA法でのRF価(RAPA価)と各々のIg-RF値について, 表2に相関図を示した。Ig-RF値とRAPA価との回帰式は,  $y = 9.8611x + 27.4999$  相関係数  $r = 0.9037$ , IgM-RF値とRAPA価は,  $y = 3.0969x + 30.2442$   $r = 0.6956$ , IgA-RF値とRAPA価は,  $y = 4.5041x + 147.5722$   $r = 0.6725$ で, IgG-RFとRAPA価との相関が最も高かった。また, 患者血清中の各Ig-RF値間の相関については, IgM-RF値とIgG-RF値では, 回帰式  $y = 0.3367x - 2.3153$   $r = 0.8284$ , IgA-RF値とIgG-RF値については,  $y = 0.4124x + 11.1731$   $r = 0.6553$ , IgM-RF値とIgA-RF値については,  $y = 1.0066$

Table 2. Correlation diagram for the titers of RAPA and IgM, IgA and IgG Rheumatoid Factor



x + 48.6659 r = 0.6276 となった。また、RAPA 価の半定量値別の各々の Ig-RF 値の平均値 ( $\bar{M}$ ) と標準偏差 ( $\pm\sigma$ ) の値の関係を表 3 に示した。

Table 3. The value of IgM, IgA and IgG Rheumatoid factor relation to the titers of RAPA

RAPA(x)	IgM-RF		IgA-RF		IgG-RF	
	mean	$\pm\sigma$	mean	$\pm\sigma$	mean	$\pm\sigma$
40	22.21	8.83	5.81	6.73	3.34	1.17
80	34.63	27.78	7.96	9.17	8.51	6.99
160	67.40	46.04	19.65	19.18	15.35	10.68
320	164.20	33.58	23.66	16.23	29.59	24.43
640	180.00	100.34	105.12	78.56	51.67	36.17
1280 <	200 <		105.30	62.91	100 <	

RAPA 価が 1,280 x 以上の検体では、IgM-RF 値は全例 200IU/ml 以上、IgG-RF 値も全例 100IU/ml 以上を示した。また、ラテックス凝集スライド法 (定性反応) である RA テストの結果を、(-) ~ (±), (+), (++) の 3 段階に分類し、各々の Ig-RF 値の平均値 ( $\bar{M}$ ) と標準偏差 ( $\pm\sigma$ ) 値を表 4 に示した。日常臨床検査として、簡便に利用されている RA テストで (+) と判定された場合、今回

私達が測定した ELISA 法での IgM-RF 値の  $\bar{M}$  は、52.79IU/ml、IgA-RF 値の  $\bar{M}$  は、25.54IU/ml、IgG-RF 値の  $\bar{M}$  が、17.00IU/ml となった。同様に RA テスト (++) の場合の IgM-RF 値 ( $\bar{M}$ ) は、134.43IU/ml、IgA-RF 値 ( $\bar{M}$ ) は、48.53IU/ml、IgG-RF 値 ( $\bar{M}$ ) が、44.58IU/ml となった。

Table 4. The value of IgM, IgA and IgG Rheumatoid factor relation to the result of Latex agglutination

RA test	IgM-RF		IgA-RF		IgG-RF	
	mean	$\pm\sigma$	mean	$\pm\sigma$	mean	$\pm\sigma$
- ~ ±	16.09	14.50	8.14	4.24	3.18	2.87
1 +	52.79	53.83	25.54	43.65	17.00	25.80
2 +	134.43	74.56	48.53	65.00	44.58	41.36

患者検体 50 例中 30 例については、さらに血清中の免疫グロブリン量 (IgM, IgA, IgG) を測定し、各 Ig-RF 値との関係の回帰式と相関係数 (r : correlation coefficient) を表 5 に示した。患者血清中の IgM-RF 値と IgM 濃度の  $r = 0.16$ 、IgA-RF 値と IgA 濃度の  $r = 0.26$ 、IgG-RF 値と IgG 濃度の  $r = -0.02$  といずれも相互には相関が

なかった。

Table 5. Relation to the RF Immunoglobulin classes and each Immunoglobulin in human sera

Relation	Regressive Expression	correlation coefficient (r)
IgM to IgM-RF	$y = 0.253x + 240.6$	0.16
IgA to IgA-RF	$y = 0.704x + 325.9$	0.26
IgG to IgG-RF	$y = -0.273x + 1592.7$	-0.02

#### 4. 考察および結語

リウマチ因子の検出・測定は、1987年改訂のARA (American Rheumatism Association) によるRA診断基準7項目中の1つに位置づけられ<sup>11)</sup>、本邦においても、従来より実施されて来たRAテスト、Waalser-Rose反応等により、患者血清中や関節液中に出現しているRFの力価を指標に、リウマチ性疾患の診断、治療方針の決定に用いられて来た。近年では、さらに日常臨床検査室においては、多数の検体のRF価を測定する為に、器械化が進み、TIA法、LNA法、LFTIA法等を用いたRFの定量化 (IU/ml, U/ml) が実施されている<sup>12)</sup>。しかし、これら器械化導入にともなって用いられるRF測定試薬の使用抗原が、人由来のIgGや家兎由来のIgG等と本邦でもRFの反応性には、使用方法による差異が大きく<sup>13),14)</sup>、現在、RF価測定の標準化が検討、進行中である。

今回、私達は家兎IgGを抗原に用いたRF価・RF値の測定方法として、RAPA法、ELISA法を用い、さらに人由来のIgGをLatexに吸着させた抗原を用いたRAテストでの定性反応を実施して、患者血清中のRF価を測定した。RAPA価とELISA法で測定したIgG-RF値とは最も相関が高く、またELISA法で測定した患者血清中のIgM-RF値とIgG-RF値も高い相関を示していたことより、従来から述べられて来た凝集法は、

IgM-RF値のみを反映するのではなく、ELISA法で測定した結果IgG-RF値をも反映していることが考えられる。また、病態と各Ig-RF値についてもすでに報告されている様にIgG-RF高値例には悪性の慢性関節リウマチ (MRA) 患者が多く、IgA-RF高値例には、シェーグレン症候群 (SjS) 患者例が多いとの報告もある。また、今回私達が測定した50例の患者血清中の2例に、IgA-RFが200IU/mlを越すものがあり、これはIgM-RF, IgG-RF値とは一定の相関を有していなかったことより、何らか通常のRFが出現する病態で、時期が異なった場合をとらえているのではないかと興味を持たれた<sup>15)</sup>。

また、ELISA法で測定したIgM-RF, IgA-RF, IgG-RF各々について、同一患者血清中の免疫グロブリン量 (IgM, IgA, IgG) との相関をみると、これらには、相互に相関がみられなかったことより、ELISA法により測定された各々のIg-RFは、RF独自の測定意義を有していることも解った。従って、従来法のRAテスト等でRFの検出がされ得ないseronegative<sup>16)</sup>な例等について、今回私達が用いたELISA法により、IgM-RF, IgA-RF, IgG-RF値を日常臨床検査室にて測定することにより、未解明のリウマチ性疾患の病態、治療方針の指標として何らかの新しい情報手段となることが期待される。

#### 文 献

1. Waaler E.: On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscle. *Acta Path Microbiol Scand*, 17; 172-188, 1940
2. Rose H.M., Ragan C.V., Pearce E. and Lipman M. O.: Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Pro Soc Exp Biol Med.*, 68; 1-6, 1948
3. Nativig J.B., Gaarder P.I. and Turner M.W.: IgG antigens of the C-gamma-2 and C-gamma-3 homology regions interacting with rheumatoid factors. *Clin Exp Immunol.*, 12; 177-183, 1972
4. Jones M.G., Shipley M.E., Hearn J.P. and Hay F.C.: Specificity of rheumatoid factors in relation to the

- disease state in rheumatoid arthritis.  
Ann Rheum Dis, 49; 757-762, 1990
5. Carson D.A., Chen P.P., Fox R.I., Kipps T.J., Jirik F., Goldfien R.D., Silverman G., Radoux V. and Fong S.:  
Rheumatoid Factor and Immune Networks.  
Ann rev Immunol., 5; 109-126, 1987
  6. 渡辺一雄, 西間木友衛, 佐藤由紀夫, 粕川禮司:  
各種疾患におけるリウマトイド因子の臨床的意義.  
臨床免疫, 17: 1029-1036, 1985
  7. 小林茂人: リウマトイド因子の臨床的意義.  
臨床免疫, 21: 80-84, 1989
  8. 星恵子, 水島裕: クラス別リウマトイド因子の臨床的意義.  
臨床免疫, 17: 1022-1028, 1985
  9. Paquet M.G., Auvinet M., Raffin T., Girard P., Bouvier M., Lrjeune E. and Monier J.C.:  
IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF, IgE RF and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis.  
Ann Rheum Dis., 46; 65-71, 1987
  10. Ernst E., Espersen G.T., Andersen M.V. and Grunnet N.: RF-Classes (IgM, IgG, IgA) in a Group of Highly Active RA-Patients in Relation to disease Activity and Treatment.  
Scnd J Rheum., 75; 250-255, 1988
  11. Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., Mcshane D.J., Fries J.F., Cooper N.S., Healey L.A., Kaplan S. R., Liang M.H., Luthra H.S., Medsger T.A., Mitchell D.M., Neustadt D.H., Pinals R.S., Schaller J. G., Sharp J.T., Wilder R.L. and Hunder G.G.:  
The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis.  
Arth Rheum., 31: 315-324, 1988
  12. 唐下博子, 一村光子, 崎山順子, 大井治昭, 川並 恢:  
RA テスト・RF, 総合臨床, 40: 1554-1557, 1991
  13. Toumi T.: Which antigen to use in the detection of rheumatoid factors? Comparison of patients with rheumatoid arthritis and subjects with 'false positive' rheumatoid factor reactions.  
Clin Exp Immunol, 77: 349-355, 1989
  14. 血清検査研究班事業報告: 衛生検査, 38: 834-845, 1989
  15. Walker S.M., McCurdy D.K., Shaham B., Brik R., Wietting H., Arora Y. and Lehman T.J.A.:  
High Prevalence of IgA Rheumatoid Factor in severe Polyarticular-onset Juvenile Rheumatoid Arthritis, but not in Systemic-onset or Pauci articular-onset Disease.  
Arth Rheum, 33: 199-204, 1990
  16. Eggelmeijer F., Otten H.G., Rooy H.H., Daha M.R. and Breedveld F.C.: Significance of rheumatoid factor isotypes in seronegative rheumatoid arthritis.  
Rheumatol Int, 10: 43-46, 1990

(1991年10月29日受理)