

# ELISA 法による *Staphylococcus aureus* に対するヒト血清中抗体の測定

櫻井秀子

筑波大学人間総合等教育研究支援室 (医学系)

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

## 概要

腎臓内科研究室において IgA 腎症の原因について研究支援を行っている。今回は血清中の抗体を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法を用いて測定した。

IgA 腎症は、腎糸球体メサンギウムに IgA, 特に IgA1 を中心とする免疫複合体の沈着があり、緩徐に進行する慢性糸球体腎炎である。常在菌叢である *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) に注目し、Western blotting 法を用いて *S. aureus* 膜抗原と IgA 腎症患者血清中の抗体を解析し、17KDa 及び 35KDa の蛋白と反応する抗体が、患者血清にしばしば存在することが判明した。*S. aureus* 由来の protein A を吸収した抗原を用いた ELISA 法を開発した。IgA 腎症患者の多くは、*S. aureus* 膜抗原に対して高応答性であり、IgA の subclass では IgA1 が主として反応することが明らかになった。

## 1. はじめに

IgA 腎症は腎生検の所見で腎糸球体メサンギウムに IgA, 特に IgA1 を中心とする免疫複合体の沈着があり、慢性に経過する腎疾患である。わが国をはじめ、世界中で最も頻度の高い慢性糸球体腎炎で、30~40%の患者は 20~30 年の長期経過で腎不全に至ると言われており、わが国では維持透析を受けている患者の原疾患では最も多い疾患である。この IgA 腎症の発症機序は不明であり、治療法も未だ確立していない。発症の引き金となる抗原は、特定が難しく、細菌抗原、ウイルス抗原、食物抗原、自己抗原などの報告はあるが IgA 腎症のほとんどは証明されていないのが現状です<sup>[1]</sup>。

当研究室では黄色ブドウ球菌 *S. aureus* 感染後に発症する、ネフローゼ症候群を呈し、急速に進行する腎炎で、主に腎糸球体メサンギウムに IgA の沈着を認めることから、IgA 腎症関連腎炎であることを報告した<sup>[2]</sup>。

従来から IgA 腎症患者では上気道炎、扁桃炎を有することが多く、扁桃摘出術が有効であることが報告されている。IgA 腎症患者で上気道の常在菌である *Hemophilus parainfluenza* の菌体成分の沈着を糸球体に証明した報告がある<sup>[3]</sup>。

*S. aureus* が IgA 腎症の成因原因の一つではないかと検討を行った。ELISA 法により血清中の *S. aureus* に対する抗体を測定し、他の腎疾患との比較を行ったので報告する。本疾患惹起抗原として、上気道粘膜の常在菌である *S. aureus* 膜抗原に着目し、患者の血清を用いて、Western Blotting 法を用いて患者の血清中の抗体の性状を検討し、*S. aureus* 由来の Protein A を吸収した抗原を用いた ELISA 法を開発した。

## 2. 材料及び方法

### 2.1 抗体測定用血清

筑波大学付属病院腎臓内科入院患者内訳  
IgA 腎症 (IgAN) n=94  
MRSA 関連腎炎 (post MRSA GN) n=29,  
紫斑病性腎炎 (HSPGN) n=4,  
膜性腎症 (MN) n=27  
膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN) n=8  
ループス腎炎 (LN) n=39,  
半月体形成腎炎 (Pauci Cr GN) n=19,  
非 IgA 型腎症 (non-IgAN) n=7  
微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) n=11  
巣状糸球体硬化症 (FGS) n=15  
微小変化群 (Minor) n=17  
尿細管間質性腎炎 (TIN) n=6  
良性腎硬化症 (BNS) n=14  
正常人 (Nomal) n=16、以上の血清を用いた。

### 2.2 *S. aureus* 標準株 8325 の膜蛋白調整

*S. aureus* を BHI 培地 (Brin Heart Infusion) (DIFCO) を用いて 37°C 16 時間振盪培養して、遠心にて集めた *S. aureus* を TE buffer (10mM Tris Hcl, 1mM EDTA pH 8.0) に浮遊させて lysostaphin (和光純薬) を用いて 37 °C 45 分反応させ *S. aureus* を溶菌させた。超遠心と超音波、CAPS により *S. aureus* の粗分画を得た。さらにヒト IgG を結合させ sepharose 4B (Amersham Bio)にて *S. aureus* 由来の protein A を吸収した精製抗原を得た。*S. aureus* 抗原は Western blotting 法により、protein A の存在の有無を確認し ELISA 用抗原とした。

### 2.3 Western blotting 法

*S. aureus* 膜蛋白は 12.5 % SDS-PAGE (SDS-ポリアリルアミド電気泳動) 後、PVDF 膜 (polyvinylidene fluoride) (Millipore) 25V、1 時間電氣的に転写した。5 % スキムミルク加 TBS でブロッキングを行い、PVDF 膜を種々の抗体、IgA 腎症血清、二次抗体にペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG (rabbit), ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgA (rabbit) (DAKO)、その他ペルオキシダーゼ標識抗 protein A 抗体 (IMS) も反応させ、ECLpuls (Amersham Bio) で発光させフィルムに露光した。

## 2.4 ELISA 法

精製した *S. aureus* 膜蛋白を coating buffer ( 20mM Sodium Carbamate Buffer pH9.8 ) で希釈して 96 穴の ELISA 用プレート ( Costar ) に一晩コーティングした。0.5 % BSA 0.05 % Tween PBS ( T - PBS ) で特異的な吸着をブロックした後に、T - PBS 洗浄後 100 倍希釈血清を加え 1 時間反応、T - PBS 洗浄後、希釈ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ( rabbit ) ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgA ( rabbit ) ( DAKO )、1 時間反応後、T - PBS で洗浄する。基質 ABTS 2,2-azaino-di(3-ethylbenzthiazoline) sulfonic acid を加え、15 分後に 2mM 窒化ナトリウム加え反応を停止し、イムノリーダー ( 405nm ) で測定した。*S.aureus* 膜蛋白に対する IgA のサブクラスの測定は抗ヒト IgA1 , IgA2 ( mouse ) ( Nordic Immunological Labratoris ) を用い、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ( rabbit ) ( ZIMED ) を用いた。

## 2.5 統計解析

Analysis of variance ( ANOVA ) を用い、 $P < 0.05$  を有意とした。

## 3. 結果

### 3.1 *S. aureus* の膜蛋白の性状の検討

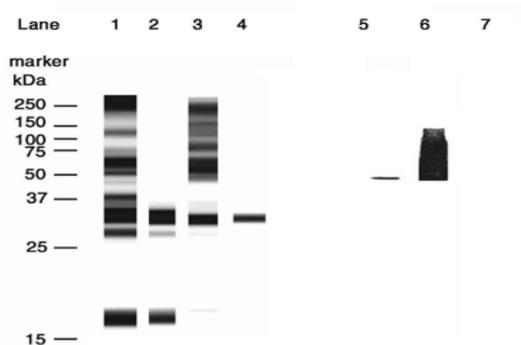


図 1 *S. aureus* の膜成分の Western blot 法

lane 1. 3 crude membrane *S. aureus*

lane 2. 4 protein A 吸収 membrane *S. aureus*

lane 1. 2 第一抗体 IgAN 患者血清

第二抗体 HRP 抗ヒト IgG

lane 3. 4 第一抗体 IgAN 患者血清

第二抗体 HRP 抗ヒト IgA

lane 5 protein A

lane 6 crude membrane *S. aureus*

lane 7 protein A 吸収 membrane *S. aureus*

lane 5. 6. 7 HRP 抗 protein A (chicken)

Lane 1 及び lane 3 に *S. aureus* 粗膜成分を加え、患者血清で染色すると多数のバンドが検出された。一方、ヒト IgG 結合 Sepharose 4B で protein A 吸収の膜成分、( ELISA 用抗原 ) のバンドは主に 35kDa と 17kDa の 2 本であった。ELISA 用抗原は Western blot 法の解析では、*S. aureus* 由来の protein A のバンドは認められなかった ( 図 1 )。

### 3.2 ELISA による血清 IgG 抗体価の測定

血清 IgG の測定では、IgA 腎症、MRSA 感染後腎炎、紫斑病性腎炎患者の血清では、他の腎炎患者に比し、*S. aureus* に対する抗体価は有意に高値であった ( 図 2 )。

### 3.3 ELISA 法による血清 IgA 抗体価の測定

血清 IgA では、IgA 腎症患者の抗体価は膜性糸球体腎炎 ( MCNS )、non - IgA 腎症を除き *S. aureus* に対する抗体価は有意に高値であった ( 図 3 )。

### 3.4 血清 IgA subclass の検討

*S. aureus* 抗体価は IgA 腎症患者血清で、*S. aureus* に対する IgA 1 class の抗体価は他の腎疾患患者に比し有意に高値であった ( 図 4 上 )。一方、IgA 2 class では、正常人、膜性腎症、膜性増殖性腎炎患者では高値である傾向が認められた ( 図 4 下 )。

## 4. 考察および結論

IgA 腎症患者では、*S. aureus* に対する IgA 1 抗体価が高く、抗体の存在下、免疫複合体として糸球体に沈着している可能性が示唆された。

現在、融合蛋白を用いた ELISA 法を開発中であり、本疾患の発症機序の解明、IgA 腎症の診断、ならびにその治療法の開発に有用な手段となると考えられる。

## 謝辞

*S. aureus* 標準株を供与していただいた基礎医学系太田敏子教授に感謝いたします。

この報告にあたり多大なるご協力いただいた臨床医学系、小山哲夫教授に感謝いたします。また腎臓内科研究室の川村恵実さん、スタッフの皆様にも感謝いたします。

## 参考文献

- [1] 腎と透析：特集 IgA 腎症 30 年，東京医学社，Vol.46; No.1, 1999.
- [2] A. Koyama, M. Kobayashi, N. Yamaguchi et al., Glomerulonephritis associated with MRSA infection: A possible role of bacterial superantigen, *Kidney int* 47; 207-216, 1995.
- [3] S. Suzuki, Y. Nakatomi, H. Sato, et al., *Haemophilus parainfluenzae* antigen and antibody in renal biopsy samples and serum of patients with IgA nephropathy. *Lancet* 345; 12-15, 1994.

### Anti-*S. aureus* antibodies (IgG)

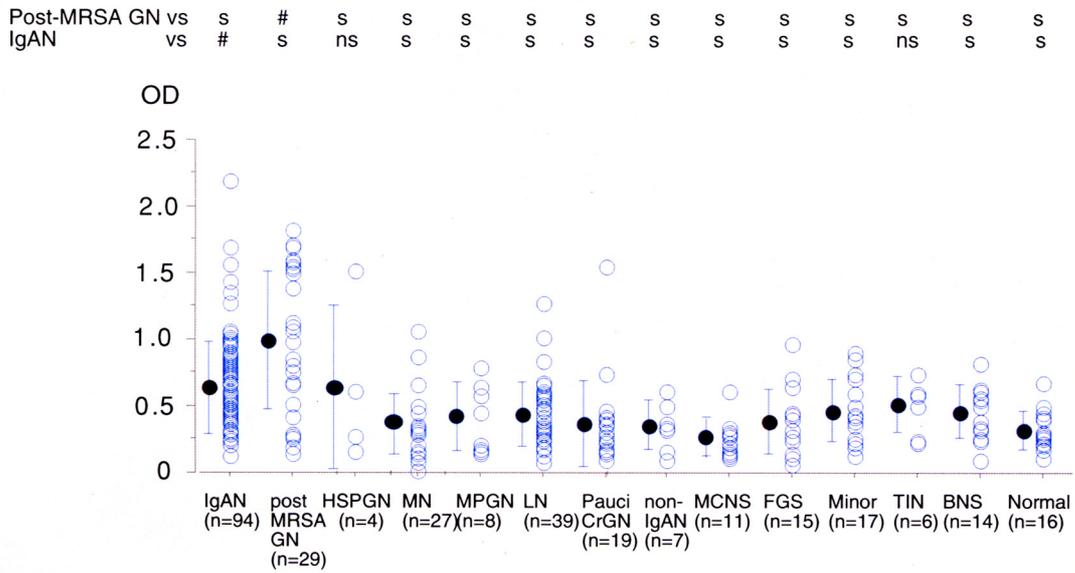


図 2. *S. aureus*に対する血清 IgG抗体価

### Anti-*S. aureus* antibodies(IgA)

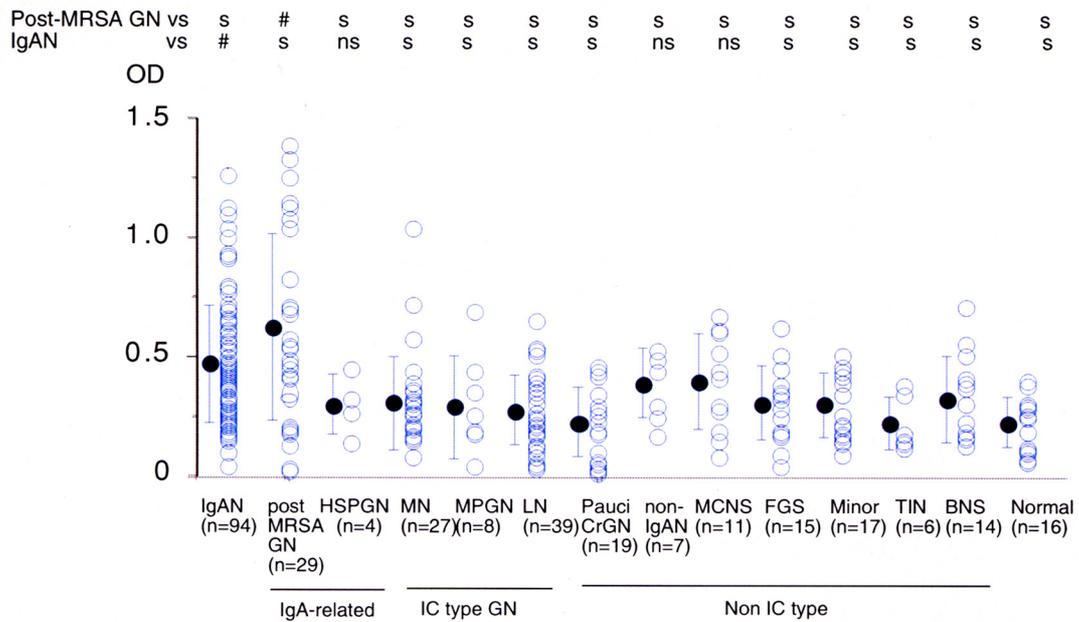
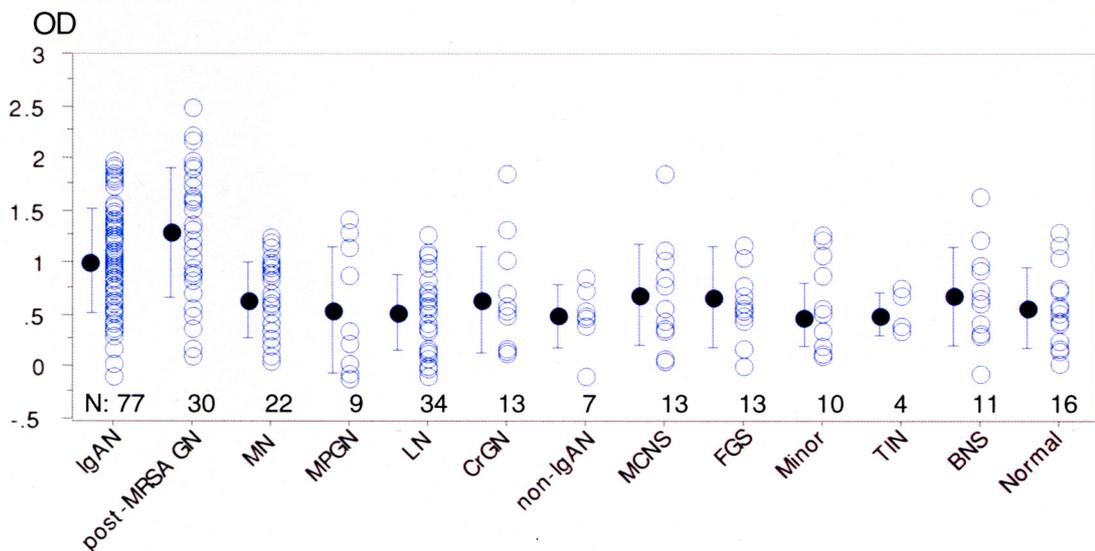


図 3 . *S.aureus*に対する血清 IgA抗体価

## Anti-*S. aureus* Antibodies (IgA1)

Post-MRSA GN vs IgAN vs s # s s s s s s s s s s s s s



## Anti-*S. aureus* Antibodies (IgA2)

Post-MRSA GN vs IgAN vs s # s 0.08 0.1 s ns ns ns ns ns ns ns ns 0.06

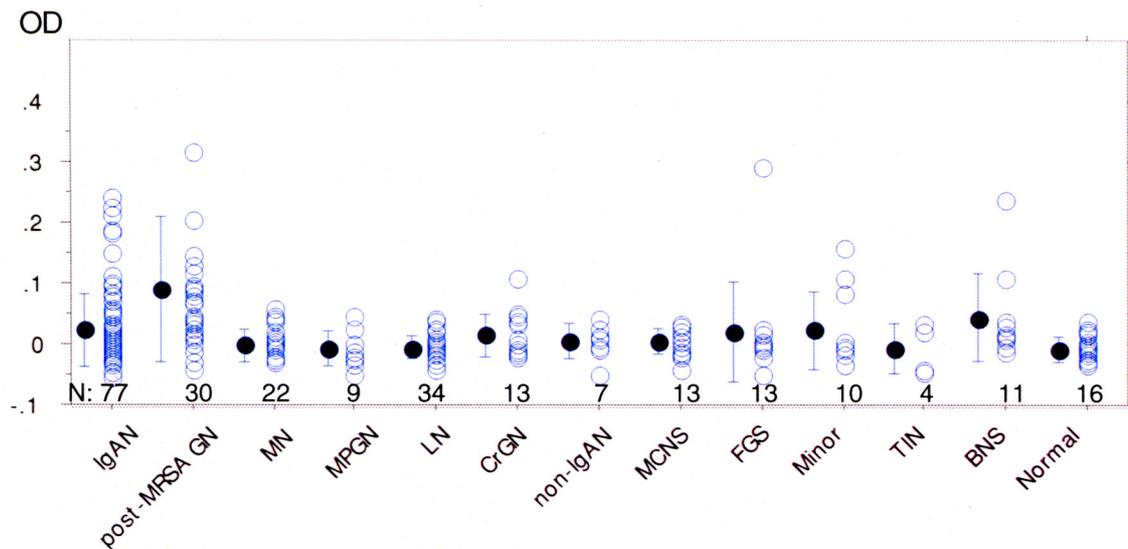


図4 . *S. aureus*に対する血清 IgA1および IgA2の抗体価