

200401065A

厚生労働科学研究費補助金  
医療技術評価総合研究事業

# 自己免疫検査の効率的利用法の研究

平成16年度 総括研究報告書

平成17年(2005年)3月

主任研究者 熊谷俊一

## 目次

### I.総括研究報告

- 自己免疫検査の効率的利用法の研究 ..... 1  
主任研究者 熊谷俊一（神戸大学大学院・医学系研究科 臨床病態・免疫学）

### II.分担研究報告

1. 関節リウマチ診断における各種検査の有用性の研究 ..... 23  
熊谷俊一（神戸大学大学院・医学系研究科 臨床病態・免疫学）
2. リウマトイド因子測定値の標準化に向けての基礎的検討 ..... 29  
大田俊行（産業医科大学 臨床検査・輸血部）
3. 抗核抗体検査標準化のための基礎的検討と新規抗核抗体に関する研究 ..... 33  
赤星 透（北里大学医学部 臨床検査診断学）

### III.業績目録 ..... 39

### IV.平成16年度構成員名簿 ..... 41

### V.平成16年度第一回班会議プログラム・議事録 ..... 43

### VI.平成16年度第二回班会議プログラム・議事録 ..... 45

### VII.別刷 ..... 49

〔 I 〕

# 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）  
総括研究報告書

自己免疫検査の効率的利用法の研究

主任研究者 熊谷俊一 神戸大学大学院医学系研究科 臨床病態・免疫学 （職名）教授

研究要旨

リウマトイド因子（RF）、抗核抗体、膠原病関連の自己抗体のより効率的な利用法の検討を目的として、1) RA マーカー検査の基本性能の検討、2) EIA 法による抗核抗体検査結果の比較検討、3) PM/DM 患者血清における抗 7SL RNA 抗体の存在とその性状の検討、4) RF の定量検査の施設間差および試薬間差に関する九州地区の大学病院を主としたミニサーベイを行った。これにより、抗 CCP 抗体などの新規検査の有用性が示唆されると同時に、RF、抗核抗体、疾患特異的自己抗体の測定法・基準値が施設間で変動していることが明らかとなった。そこでこの施設間格差に関しての全国規模の現状把握のため、5) RF、抗核抗体、疾患特異的自己免疫検査の実施状況に関して全国アンケート調査を行った。この結果、RF、抗核抗体の測定方法、測定基準値に関して、想定以上の大きなばらつきが存在することが明らかになり、RF、抗核抗体に関して標準化の必要性が焦点であることが確認された。

この結果を踏まえ、RF 及び抗核抗体の標準化について、6) プール血清による RF の施設間格差確認のための全国サーベイ、7) RA 患者血清による RF 測定値の機器・試薬間差の実態調査、8) 膠原病患者血清による FANA 測定値の全国サーベイの3つの研究プロジェクトを開始した。

更に自己抗体の利用法に関するガイドライン作成のため、9) 自己抗体の効率的利用法に関するガイドライン作成のための膠原病患者サーベイを開始した。

RF、抗核抗体の標準化と自己抗体の利用法に関するガイドライン作成により、自己免疫検査のより適切かつ効率的利用法が確立され、不要な検査の減少により医療費削減につながることを期待される。

A. 研究目的

近年、リウマチ・膠原病関連の検査として、抗環状シトルリン化ペプチド（CCP）抗体を始めとして多種多様な新しい免疫検査法が臨床応用をされつつあるが、多くはその性能が適切に評価されないまま臨床現場に持ち込まれているため、検査結果の誤った解釈による誤診を生じ、また不必要な検査は健全な医療経済を著

しく損なう一因となっている。

さらに近年、専門医と一般医の垣根を越えて地域の医療連携の推進がなされてきており、各医療機関での検査データの精度管理・標準化の重要性が唱えられている。

一方、免疫検査については、後述するように測定法・施設間格差などにより、同一の検査においても測定値のばらつきが大きく解釈の困

難の度合いを増す要因となっている。

このような状況を背景として、本研究では、最近臨床に導入された新しいリウマトイド因子やMMP-3、疾患特異的自己抗体、抗好中球細胞質抗体などの自己免疫検査について、その特性を再評価するとともに、従来のリウマトイド因子や抗核抗体(蛍光抗体法)について、EIA法など検査法による疾患での陽性率や偽陽性率の差を調べ、標準化を目指すことを基本的目的としている。さらに健常人での陽性率を評価し、その上で、膠原病、リウマチ性疾患診断におけるスクリーニング検査としての意義を検討し、各種疾患特異的自己抗体検査との組み合わせにより、診断的中率を上げるためのエビデンスに基づいた検査診断法の樹立を目指すことを目標として研究を開始している。

リウマトイド因子(rheumatoid factor, RF)は、関節リウマチの検査として発見され、古くから用いられている検査であり、その歴史は長い。RFの本態は変成IgGに対する自己抗体であり、そのFc部分に特異的に反応する。当初、赤血球凝集反応や粒子凝集反応などを用いた定性法・半定量法が主流であったが、近年、自動分析器を用いた比ろう法、比濁法等による定量法が主流となってきている<sup>1,2)</sup>。それに伴い施設間格差の問題が浮上してきた経緯がある。このRFに加えて、その他の膠原病関連の自己抗体の標準化を考えた時、これらの施設間格差に関する現状把握が不可欠である。このような観点から我々は2000年に全国の大学病院検査部および福島県内の全病院検査部に対してアンケート調査を行いその結果を報告してきた<sup>3)</sup>。

また、現在、抗核抗体検査には蛍光抗体法が最も広く使用されている。近年、核材が臓器切片からHEp-2細胞へ変更され<sup>4)</sup>、より高感度となりセントロメア抗体も検出できる利点が

出てきた反面<sup>5)</sup>、健常人での陽性率が高く、特異度が低いことや、施設内および施設外変動の存在などの問題点が指摘されている<sup>6)</sup>。膠原病関連の自己抗体の標準化のためにも、まず最初に抗核抗体の施設間格差に関する現状把握が不可欠であると考えられた。

このような観点から、本年度は抗核抗体等の自己免疫検査について、

1. RAならびに関連検査の基本性能の検討
2. EIA法による抗核抗体検査結果の比較検討
3. PM/DM患者血清における抗7SL RNA抗体の存在とその性状
4. RF定量検査の施設間差および試薬間差に関する、九州地区の大学病院を主としたミニサーベイ

をまず行った。

このミニサーベイの結果、RF、抗核抗体、疾患特異的自己抗体の施設間格差に関して大きなばらつきの存在が明らかとなったので、更に全国規模の現状把握のため、

5. リウマトイド因子、抗核抗体、疾患特異的自己免疫検査の実施状況に関するの全国アンケート調査

を行った。この結果、RF、抗核抗体の測定方法、測定基準値に関して、想定以上の大きなばらつきが存在することが明らかとなり、RF、抗核抗体に関して標準化の必要性が焦点であることが確認された。なお、このアンケートに関しては、リウマチ学会少委員会と共同で行った。この結果を踏まえ、RF標準化については

6. RFの施設間格差確認のための患者血清を用いた全国サーベイ
7. RA 確診例におけるRF測定値の機器・試薬間差のサーベイ

を開始した。また、抗核抗体の標準化に関して

は、

8. 管理血清ならびに患者血清を用いた FANA 測定値の施設間格差確認のための全国サーベイ

を開始した。

更に自己抗体の効率的利用法に関するガイドライン作成のため

9. 自己抗体の利用法に関するガイドライン作成のための膠原病患者に対するサーベイ

を開始した。

## B. 研究方法

### 1. RA ならびに関連検査（以下 RA マーカー検査）の基本性能の検討

診断の確定した膠原病患者、RA 患者 79 例（神戸大学）について、インフォームド・コンセントを得て RA マーカーとして RF、ガラクトース欠損 IgG 抗体（CARF）、IgG クラス RF（IgG-RF）マトリックスメタロプロテインナーゼ-3（MMP-3）、抗 CCP 抗体を測定した（倫理面への配慮については後述）。

それぞれの検査項目について感度・特異度から receiver operating characteristic curve analysis（ROC 解析）による比較を行い、RA 診断における有用性を評価した。また、早期 RA やコンビネーション検査での有用性も検討した。

### 2. EIA 法による抗核抗体検査結果の比較検討

抗核抗体検査標準化のための基礎的検討として、わが国で用いられている 2 種類の EIA 法による抗核抗体検査試薬を対象として、抗核抗体検査結果の比較検討を行った。

抗核抗体試薬間差を検討するため、膠原病患者 93 名より血清を採取した（北里大学）。これ

らの血清について、2 種類の市販の EIA 法試薬キットに加え、IPP 法、DID 法、RIA 法により各種の抗核抗体 7 種類測定し、その結果を相互に比較検討した。

### 3. PM/DM 患者血清における抗 7SL RNA 抗体の存在とその性状

多発性筋炎・皮膚筋炎（PM/DM）ではシグナル認識粒子（SRP）に対する自己抗体（抗 SRP 抗体）がしばしば認められる。本研究では、PM/DM 患者血清における抗 7SL RNA 抗体の存在とその性状について解析した。

PM/DM における抗 7SL 抗体について検討するため、32 名の PM/DM 患者（北里大学）、ならびに診断・加療された抗 SRP 抗体陽性の 22 名の PM/DM 患者（米ピッツバーグ大学）より血清を採取した。抗 SRP 抗体は、HeLa 細胞の可溶性抽出物および脱蛋白抽出物を用いた IPP 法によって解析した。

### 4. RF 定量検査の施設間差および試薬間差に関する九州地区の大学病院を主としたミニサーベイ

RF の定量検査の施設間差および試薬間差の実態を把握することを目的に九州地区の大学病院を主としたミニサーベイを実施した。

#### 4-1. RF 定量測定用市販試薬間差の検討

4 種類の RF 定量測定用市販試薬を用いた。測定機器として NIA 試薬はデードベアリング社製専用機 BN-II を使用し、それ以外の試薬は生化学検査用自動分析機（東芝社製 TBA-200FR）を使用した。測定検体は産業医科大学病院の入院または外来患者のうち RF 定量検査の測定依頼のあった 30 名の患者からの 124 血清を用いた。

#### 4-2. RF 定量値の施設間差の検討

九州地方及び山口県の大学病院を中心とした11施設を対象に、インフォームドコンセントの得られた2名のリウマチ・膠原病患者(SLE, RA)の血清を送付し、それぞれの施設内でのRF定量試薬・機器を用いて測定した。また産業医科大学病院でRFの値の付けをした低～高値の7種類のプール血清も同時に送付した。

## 5. RF、抗核抗体、疾患特異的自己免疫検査の実施状況に関して全国アンケート調査

### 5-1. RFのアンケート調査

2004年12月に全国のリウマチ学会教育施設全て(356施設)に対して、アンケートを送付し、RF、抗核抗体、抗DNA抗体などの膠原病関連自己抗体について各検査項目の内部実施の有無、方法、使用試薬の会社名および基準値について調査を行った。有効回答が得られた188施設について、RFおよび関連の検査項目を集計し検討を行った。

### 5-2. 抗核抗体、疾患特異的自己抗体のアンケート調査

抗核抗体、抗DNA抗体などの膠原病関連自己抗体についてもRFと同様に各検査項目の内部実施の有無、方法、使用試薬の会社名および基準値について調査をおこなった。有効回答が得られた186施設について検査項目を集計し検討を行った。

## 6. RFの施設間格差確認のためのサーベイ

### 1) 目的

RFの標準化に向けて、全国の臨床検査室におけるRFの測定状況と測定値を把握し、検査結果のばらつきを評価するとともに、プール血清を用いた補正の可能性を調べることを目的とした。

### 2) 対象

日常検査としてRFを測定している施設で、先のアンケート調査で了解の得られた施設に代表的な検査施設を加えた111施設を対象とした。

### 3) 測定試料

RA患者血清をプールし(各60ml)、十分に攪拌したあと濾紙にて濾過分注し(500 $\mu$ l/バイアル)、4 $^{\circ}$ Cにて保存したものを用いる。RF力価に応じて、4種類のプール血清は概ね次の濃度を目標に作成した。

試料A: 15 U/ml 未満 (陰性)

試料B: 15 U/ml 以上 40 U/ml 未満

試料C: 40 U/ml 以上 150 U/ml 未満

試料D: 150 U/ml 以上

以上の測定用試料を保冷下にて各施設に送付した。試料の測定は2重測定を2日間繰り返し、合計4回測定を行うこととした。

### 6) 測定状況の調査

検体測定と同時に、次の内容について質問紙による調査を行った。

- ・ 測定機器名
- ・ 測定試薬名、メーカー名、ロット番号
- ・ 測定パラメーター (サンプル量、試薬量、測定波長、測光モードと測光ポイント)
- ・ キャリブレーションの本数とそれぞれの濃度、ロット番号
- ・ 測定可能濃度範囲 (直線性)
- ・ 基準範囲またはカットオフ値とその根拠 (自施設作成、文献など)
- ・ 再検基準

## 7. RA 確診例における RF 測定値の機器・試薬間差の実態調査

### 1) 目的

RA 確診例において RF 測定値が機器・試薬の違いでどの程度異なるのかを把握すること

を目的とした。

## 2) 対象

50～100 例の RA 患者血清を対象とした。5 施設（神戸大、北里大、福島医大、産業医大、長崎大）の測定値の比較を開始した。

## 3) 測定試料

RA 患者血清 50～100 検体を収集し、各患者血清を分注し（500  $\mu$ l/バイアル）し 4℃にて保存したものを作成した。測定用試料は保冷剤下にて送付した。試料の測定に関しては、2重測定を行うこととした。

## 8. 抗核抗体の標準化のための管理血清及び患者血清による FANA 測定値の比較

検査法や顕微鏡による施設間格差を解析し、標準化を図る目的で、2005 年度アンケートで協力可能との回答を得た施設を対象として、研究を開始した。

### 1) 管理血清の選定

MBL 社製 HEPASERA-1（4 型別、力価 160～320 倍）、ANA 管理血清（homogenous 型、20 IU）を用いた。

配布検体として、HEPASERA-1 の 4 種類の血清（Homogenous 型、Speckled 型、Discrete speckled 型、Nucleolar 型）を用い、力価 160 倍の検体と下限値確認のために 40 倍検体を用意した。

### 2) 管理血清による測定感度の測定と補正

ルーチン法にて測定し、MBL 表示値との差（乖離管数）より、各施設の測定値に対する補正係数を算出することとした。

### 3) 目標

管理検体（160 倍）の平均測定力価  $\pm$  1 管内に 90%以上の施設が含まれることを目標とする。

### 4) 患者血清による FANA 測定値の比較

上記管理血清の他に、分担研究者赤星により北里大学で準備された患者血清を参加施設に配布した。抗核抗体型としては、Homogenous、Speckled、Discrete speckled の 3 タイプを用意した（力価は 160 倍、40 倍の 2 種類に調整）。検体については、基本的に単一患者由来の血清とする。これらの検体を一施設につき 8 種類（一検体 0.2 ml）を配布し、測定値の変動を評価する予定で、平成 17 年 3 月に全国約 50 のリウマチ学会教育施設、主要な検査会社 10 社に検体を配布した。

管理血清に対する測定値より測定感度、補正係数を算定し、患者血清については補正測定値を評価することとした。

## 9. 自己抗体の利用法に関するガイドライン作成

上記 RF 標準化、抗核抗体標準化のためのサーベイと平行して、患者データを収集し膠原病関連の診断に際しての効率的自己抗体の利用法に関するガイドラインを作成する手順を以下のように定めた。

### 9-1. 対象

班員の施設から以下の例数を目標に血清を収集する。

SLE	100 名
RA	100 名
血管炎	50 名
強皮症	50 名
筋炎 (PM/DM)	50 名
シェーグレン	50 名
MCTD	50 名

### 9-2. 患者選択基準

(1) RA については ACR 改訂基準、そのほかの膠原病については、それぞれの分類（診断）基準を満たす。



(2) 1995年以降に診断されていること(2000年以降が望ましい)。

(3) 患者の診断確定時の血清が、1ml確保できていること(新規患者がより望ましい)。

(4) 上記血清を採集した前後1ヶ月以内に、CBC、生化学のデータ測定を行っていること。

(5) 診断確定時のカルテが保存されていること。

(6) SLE、PM/DM、血管炎については、ステロイド大量療法を行う前か直後、RAについては治療前であること。

### 9-3. 測定項目

全例FANAおよびRFマーカー検査、抗CCP抗体、MMP-3、CBC、基本的生化学検査データを測定する。MESACUP ANA等のMulti-ANAの測定により、効率的にスクリーニングが行えるかも検討する。

抗核抗体については、それぞれの力価(何倍陽性か)の場合にその疾患(例えばSLE)である可能性が何%であるかを算出し、力価として何倍を陽性のカットオフとして採用するかを各疾患で評価する。

次に設定されたカットオフで陽性、陰性に分類。図13に従い、陰性ならSS-A、Jo-1、ANCAを測定する。陽性例はさらに染色型で分類し、Homogeneous型ならdsDNA、ssDNA、(出来れば抗ヒストンも)、Speckled型ならSS-A、SS-B、Sm、RNP、Scl-70、Peripheral型ならdsDNA、Discrete speckled型ならセントロメアの各抗体をそれぞれ測定する。Nucleolar型はSScとみなすことにする。

染色型と疾患特異的自己抗体の対応が上記である、すなわち、例えばRNP抗体はSpeckled型のみをとるとみなすと、そうでない症例は(実際には測定していないが)RNP陰性と思なせるので各疾患での陽性・陰性が半別可能であ

る。これを基に、さらにメタ・アナリシスのデータを加えて膠原病を疑ってFANAを測定し、FANA陽性でXという染色型であったらXXという疾患である可能性を判定する。この図に従った場合の正診率をまず今回の症例で、次に前向きに検証し、適宜補正して最終的な「自己抗体検査を用いた検査診断の指針」とすることとした。

### (倫理面への配慮)

本研究のうち、本年度施行のリウマチ学会教育施設へのアンケート調査では個人情報に含まれないため、特に配慮は要しない。患者の検体採取を必要とした研究については各大学の倫理委員会の承認を得た上で、患者個人のインフォームドコンセントを得た。

## C. 研究結果

### 1. RAマーカー検査の基本性能の検討

#### 1-1. RAマーカーの感度、特異度の比較

各マーカーのRAでの感度、RA以外のリウマチ性疾患患者(non-RA)における特異度を比較したところ、抗CCP抗体が感度81.0%と最も高感度であり、特異度も92.4%とIgG-RFを除く他のマーカーに比較して有意に高値であった( $p < 0.02$ )。

#### 1-2. ROC解析による各マーカーとの比較

RAを疾患群、non-RAを対照群としてROC解析を行い各マーカーの比較を行ったところ、抗CCP抗体は他のマーカーより有意に高値で( $P < 0.05$ )、RAの鑑別検査として抗CCP抗体が最も優れていることがわかった。

#### 1-3. 早期RAでの感度比較

RA79例について、発症2年未満の早期RA16例と、発症2年以上のRA63例とに分け、それぞれの感度を比較した。早期RAではCARFの感

度が 75.0%と最も高率で、それに次ぐ抗 CCP 抗体の感度は 68.8%であった

#### 1-4. コンビネーションでの感度・特異度

5 種類の検査をすべて行うことができた RA75 例について、これらの検査を組み合わせた場合の RA 診断のための効率を検討した。抗 CCP 抗体は単独でも特異度の高い検査であったが、RF は MMP-3 と併用することにより両者陽性の場合の特異度が 92%と高くなった。

## 2. EIA 法による抗核抗体検査結果の比較検討

IPP 法の検査結果をもとに、2 種類の EIA キットによる 7 種類の自己抗体の測定結果を比較すると、感度は 61.1%から 100%、特異度は 64.9%から 100%、全体一致率も 68.0%から 100%までと、予想以上に幅広く乖離していた。この差異は、市販 EIA キットに用いられている抗原の性状が異なること（リコンビナント蛋白または核抽出蛋白）などに由来する可能性が示唆された。

疾患標識抗体は疾患特異性が高いため、診断的価値に優れた検査であると考えられている。しかし、現行で使用されている 2 種類の抗核抗体検査キットを比較検討すると、試薬間格差が極めて大きいことが明らかになった。

## 3. PM/DM 患者血清における抗 7SL RNA 抗体の存在とその性状

IPP 法による解析により、32 名の患者（日本人 10 名、アメリカ人 22 名）に抗 SRP 抗体が検出された。さらに 7SL RNA のみを認識する抗 7SL RNA 抗体が 6 名（日本人 5 名、アメリカ人 1 名）の PM/DM 患者血清中に存在することが確認された。この新規抗核抗体は、手指腫脹などの臨床症状を呈する PM/DM 患者や冬期に発症する患者に多く認められることが明らかとなった。

本研究結果から 7SL RNA のみを認識する新規の自己抗体である抗 7SL RNA 抗体の存在が初めて証明された。また、この抗体が RNA のみを認識し、従来から報告されていた RNA・蛋白複合体を認識する自己抗体とは異なることが証明された。

## 4. RF 定量検査の施設間差および試薬間差に関する九州地区の大学病院を主としたミニサーベイ

### 4-1. RF 測定値の試薬間差に関して

4 つの試薬に関して 124 検体の RF 定量値の相関は、TIA 用試薬と LAIA 用試薬 2 種類との間の相関性が相関係数 0.923、0.956、0.958 と比較的良好であった。特に 70 IU/ml 以下では直線的な相関を示した。一方、NIA 用試薬と他の 3 種類の試薬間の相関は各測定値間には比較的大きなばらつきを認めた（相関係数：0.882、0.908、0.926）。次に、各試薬で測定した RF の結果を試薬の添付文書に記載されていたカットオフ値によって陽性、陰性に分類し一致率を計算したところ、表 1 に示すように最も悪い一致率は TIA 試薬と NIA 試薬との間で 84%であった。以上より、用いる試薬によって RF の陽性・陰性判定が誤ってなされる可能性が示唆された。

### 4-2. RF 測定値の施設間差について

2 種類の患者血清（試料 1 は RF 陰性血清、試料 2 は RF 陽性血清）を 11 施設に送付し、それぞれの施設でのカットオフ値により陽性・陰性を判定した。試料 1 は 11 施設中 10 施設で陰性、1 施設で陽性と判定され、試料 2 は 11 施設全てで陽性と判定された。RF の低～高値の 7 種類の試料の測定を施設間で測定したところ、濃度が高値となると施設間差が広がる傾向を認めた。

## 5. RF、抗核抗体、疾患特異的自己免疫検査の実施状況に関して全国アンケート調査

### 5-1. RFのアンケート結果

#### 5-1-1. RF定性法

RF定性法は近年、定量法の普及に伴い使用頻度が低下している方法であるが、小規模医療機関などでは用いられている。図1に示すようにRF定性法実施施設は院内実施が26施設、外注53施設であった。RF定性検査のみ採用している施設やRF定性、半定量、定量と全て採用しているなど種々の施設が見られた。使用試薬分布についてはRA 77が多く、その他RA-S、イアトロRA等が見られた。いずれもラテックス凝集反応による定性試薬である。外注会社名を回答された中では会社の内訳はSRL 8、MBL 4、三菱化学ヤトロン 2、他であった。

#### 5-1-2. RF半定量法

半定量法については、院内実施25施設、外注57施設であった。方法は全て粒子凝集法であるセロディアRA（富士レビオ）であり、基準値も全て40倍という結果であった。

#### 5-1-3. RF定量法

RF定量法は現在主流となっているが、種々の測定法が用いられ、施設間格差が問題となっている。図2に示すように院内実施は152施設、外注は25施設であった。測定原理ではラテックス凝集免疫法を選択した施設が70施設と多く、これに加えてさらに細かくラテックス比濁法、比濁法との回答がそれぞれ6施設と5施設あった。このようにラテックスを用いた方法が多くなっているのが近年の現状である。その他、免疫比濁法50施設、免疫比濁法25施設であった。図3に示すように基準値分布では5 IU/mlから40 IU/mlまで幅広く分布していた。10、15、20 IU/mlにおける頻度の高まりがみられた。基準値

の作成方法についてはメーカー指定値を用いている施設が112施設と最も多く、次いで自施設作成が45施設、文献値の利用が18施設という結果であった。メーカー指定値は10、15、20などの値を用いており、一方自施設作成基準値は中間的な値を用いていた。図4に示す測定法分布では、やはりラテックスを用いる方法が最も多いことがわかる。ラテックスを用いた比濁法（latex turbidimetric immunoassay、LA-TIA）が77施設と最も多く、ラテックスを用いない比濁法（turbidimetric immunoassay、TIA）が42施設と次に多く、第三位がラテックスを用いた比濁法（latex nephelometric immunoassay、LA-NIA）で39施設という結果であった。

図には示していないが、質問項目としてRF測定に用いている機器についても調査したが、これは非常に多様であった。10施設以上で用いられている機器を略語で列挙すると、BNII：28施設、日立 7600：20施設、日立 7170：19施設、TBA 200 FR：15施設、BM 2250：11施設、BNpro：11施設という結果であった。

#### 5-1-4. IgG-RF

図5に示すように、IgG-RFについては全て外注で測定されていた。試薬はエイテストIgGが66施設と最も多く、次いでスマイテストIgGが38施設であった。

#### 5-1-5. 抗ガラクトース欠損IgG抗体（Carbohydrate in rheumatoid factor、CARF）

図6に示すように院内実施の施設は6施設と少なく、ほとんどが外部委託対応であった。試薬はほとんどがピコルミCARFであり、一部定性法のクリニサーチCARFが用いられていた。定性法を院内で実施している施設も見られた。

#### 5-1-6. 外来患者RF平均検査頻度

関節リウマチ外来患者にどの程度の頻度でRF測定を行うのかを質問した結果は図7に示す通

りである。選択肢としてあげたのは1か月に1回、3-6か月に1回、1年以上に1回、その他という構成であった。3-6か月に1回はやはり多かったが、1か月に1回も多かった。またそれぞれ、その他の部分でご自分がなされる検査頻度を回答頂いた。

#### 5-1-7. 薬剤による検査頻度の変更

関節リウマチに対して用いる種々の薬剤によってRF測定頻度を変更するか否かを調べたところ、変更するが76回答、変更しないが85回答であった。

#### 5-1-8. コントロールサーベイへの参加

標準化を目的としたコントロールサーベイへの参加協力の是非について、RF測定可能と回答した施設は111施設、およびこれに加えて条件付で可能は25施設であった。条件では費用の関係や検査部長の許可が必要、などが多かった。

### 5-2. 抗核抗体、疾患特異的自己抗体のアンケート調査結果

#### 5-2-1. 抗核抗体

今回のアンケートでは蛍光抗体法についてのみを対象とし、実施率の低いEIA法については含めなかった。図8に示すように蛍光抗体法の院内実施32%、外注依頼65%、その他は分類不可(記載誤記入等)であった。院内実施の中での使用試薬の会社の内訳はMBL86%、三菱化学ヤトロン7%、一方、外注依頼の中での使用試薬の会社の内訳はSRL41%、MBL33%、三菱化学ヤトロン9%であった。外注依頼の中では検査センターであるSRL(自社開発試薬)の占める割合が大きかった。

#### 5-2-2. 抗核抗体(定性、LEテスト)

LEテストはラテックス凝集法のみなので、この方法のみの内訳になる。図9に示すように院内実施25%、外注依頼52%、その他は分類不

可であった。院内実施の中での使用試薬の会社の内訳は日本BCG(旧協和薬品工業)62%、MBL32%、一方、外注依頼の中での使用試薬の会社の内訳は日本BCG43%、SRL22%、MBL10%であった。

#### 5-2-3. 抗dsDNA抗体

抗dsDNA抗体の原理はRIA法とELISA法に分けられる。図10に示すように院内実施17%、外注依頼80%、その他は分類不可であった。院内実施の中での方法の内訳はELISA法91%、RIA法3%と、管理区域外では実施できないRIA法の内部実施は極めて少ない状況であることがわかる。一方、外注依頼の中での方法の内訳はELISA法57%、RIA法23%であった。院内実施の中での使用試薬の会社の内訳(ELISA法)はMBL27施設、三菱化学ヤトロン4施設、一方、外注依頼の中での使用試薬の会社の内訳(ELISA法)はMBL31施設、SRL25施設、三菱化学ヤトロン35施設であった。RIA法は三菱化学ヤトロン製のみであった。

#### 5-2-4. 抗ssDNA抗体

抗ssDNA抗体の原理はELISA法のみである。院内実施12%、外注依頼75%、その他は分類不可であった。院内実施の中での使用試薬の会社の内訳はMBL22施設、三菱化学ヤトロン2施設、一方、外注依頼の中での使用試薬の会社の内訳はMBL61施設、SRL67施設であった。

#### 5-2-5. 抗U1-RNP抗体、抗Sm抗体、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体、抗Scl-70抗体、抗Jo-1抗体、抗セントロメア抗体

図11に示すように院内実施の施設は、10-30施設と少なく、殆どが外部委託対応であった。原理別には、院内ではELISA法が占める割合が高かったが、外部委託ではDID法の占める割合が院内より高い傾向であった。抗セン

トロメア抗体の蛍光抗体法を実施する施設は極めて少なく、ELISA法が多くを占めていた。

#### 5-2-6. マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 (MMP-3)

図12に示すように院内実施の施設は、3施設と極めて少なく、殆どが外部委託対応であった。原理としては、ラテックス凝集法も最近上市されているが、実際に使用している施設はなく、すべてEIA法であり、使用試薬メーカー別に外部委託では第一ファインケミカル63%、MBL3%であった。

#### 5-2-7. コントロールサーベイへの参加

標準化を目的としたコントロールサーベイへの参加協力の是非について、可能と回答した施設は47施設であった。

#### 5-2-8. 使用カットオフ値

蛍光抗体法による抗核抗体検査院内実施59施設の中で使用しているカットオフ値の割合は、1:20希釈39%、1:40希釈44%、1:80希釈8%であり、1:20希釈と1:40希釈が殆どを占めていた。

### 6. リウマトイド因子の施設間格差確認のためのサーベイ

プロトコールに従い、患者のプール血清を作成し、全国111施設への検体を配布し、施設ごとの測定を依頼した。現在17年4月上旬を目処に、測定値のサーベイを行い、データ解析を行う。

### 7. RA 確診例におけるRF測定値の機器・試薬間差の実態調査

RAの患者血清の収集は完了し、患者血清を参加5大学に配布した。4月下旬には、データ収集の完了を予定している。

### 8. 標準血清及び患者血清によるFANA測定値の比較

プロトコールに従い患者のプール血清を作成し、全国約50施設への検体を配布し施設ごとの測定を依頼した。現在17年4月中旬を目処に、測定値のサーベイを行い、データ解析については、4月下旬に完了の予定である。

### 9. 自己抗体の利用法に関するガイドライン作成のための膠原病患者に対するサーベイ

所定の膠原病患者データ収集のためのデータベースの設計が終了した。参加5大学から症例の登録を開始した。データに関しては6月下旬に収集完了の予定である。

## D. 考察

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis, RA) は関節滑膜の炎症と増殖による骨軟骨の破壊を特徴とする慢性炎症性疾患である。RAに対する治療においては、早期診断によって関節破壊や機能障害を防ぐことが重要であり、感度・特異度がともに優れた、早期診断が確実に行なえる検査、あるいはRAの進行性や関節病変の予後判定が可能な検査の開発が望まれてきた。近年、こうしたRAの診断のためにいくつかの新しい検査法が開発され、RAの血清診断や血液検査による予後推定が可能になることが期待されているが、これらの新規検査はいまだ大規模な検討に基づくエビデンスに乏しく、適切な検証が必要である。

RF検査は、定性法、半定量法の時代から定量法の時代が変わってきており、それに伴って測定値の施設間格差が大きくクローズアップされている。今回ミニサーベイにおいても施設間差が見られたことから、標準化のためには正確な現状把握が必須であると考えられたため、ま

ず全国規模のアンケート調査を行った。この調査でも RF 定性法、半定量法を利用している施設は比較的少なく、やはり RF は定量法の時代となっているため、RF 測定の標準化を考えた場合、その対象は RF 定量法とならざるを得ないことは明らかである。一方、現在利用可能な RF の臨床的意義に関するデータは、以前の定性法、半定量法に基づいているものが多い。我々は RF 定量値の意義について報告した<sup>4)</sup>が更に大規模な検討が必要であろう。また初期診療における RF 検査の使い方については臨床検査医学会から「DRG / PPS 対応臨床検査ガイドライン」が作成されており、RA などが疑われた患者について、免疫学的マーカーとして RF と抗核抗体 (ANA) が採用されている<sup>5)</sup>。

RF 定量測定に種々の原理に基づく種々の測定法が用いられており、測定値の試薬間差が施設間差のベースになっている。試薬間差は測定原理の差による要因の他に、抗原である IgG の変成条件、その他、既にほぼ枯渇している WHO 標準品に準拠した社内標準品の値づけが各社で異なるなど種々の要因が想定される。IgG の変成条件では 1-3g/dl 濃度の IgG に対して 63°C で 10 分あるいは 62°C で 20 分などの加熱処理が用いられてきたが、各メーカーは種々の方法で作成していると考えられるが、その方法は企業秘密であり公表され得ない。今回の調査でも明らかなように RF 測定値の標準化を阻止する大きな障害は試薬間差・機器間差であり、今後、試薬メーカーとの連携のもとにできるだけ施設間差を是正すべきである。

測定値の施設間差がある現状では、とりあえず自施設での適切な基準値の設定が必要である。少なくとも自施設の測定試薬が推奨する基準値を用いる必要がある。適切な基準値が設定されていれば、他施設とは値を比較できない

としても、自施設内での RF 陽性の判定は適切である。現在広く用いられているアメリカリウマチ学会の RA 分類基準の 1 項目に RF が採用されているが、細則として、施設間差のある現状を鑑みて、健常者の陽性率が 5% 以下なら方法を問わないと記載されている<sup>6)</sup>。今回の調査でも明らかであったように RF 定量法の基準値の幅広い分布は施設間格差を示すものである。

IgG-RF と CARF については外注での対応が多かった。また CARF についてはほぼ 1 種類の試薬しかない。IgG-RF は、通常測定される RF が IgM クラス主体であるのに対して IgG クラス RF のみを検出する検査である。CARF は抗原として酵素処理によって生成したガラクトース欠損 IgG を用いて全ての免疫グロブリンクラスの RF を検出する。抗原が異なるが、ほとんど同じ RF を検出していると報告されている<sup>7)</sup>。なお抗 CCP 抗体については現在保健未収載のため、今回のアンケートには含めなかった。

個別研究による検討では、早期 RA での抗 CCP 抗体の感度は 68.8% と CARF の感度 75.0% に比較して低値であった。CARF については RF よりも高い感度が得られ早期 RA 診断に有用であるとされているが、やはり RA 以外のリウマチ性疾患に対する特異度が低いことが問題となっている。早期 RA における抗 CCP 抗体の陽性率は 40~60% との報告が多くなされており、RA 以外のリウマチ性疾患に対する特異度も高いことから、早期 RA 診断においても有用であるといわれている。さらに抗 CCP 抗体と RF を組み合わせることでより高い感度、特異度で早期関節炎患者における RA と他のリウマチ性疾患の鑑別が可能であるとされている。

これらの検査をどのように組み合わせる使用の良いかは大変重要であり、臨床疫学的なエビデンスに基づき、臨床的エビデンスの収

集と対費用効果を考えた検査診断の検証によるガイドラインの作成が重要である。我々の検討からは、RA 診断のためにはまず RF 検査を行い、陽性なら MMP-3 を検査し、陰性なら抗 CCP 抗体を検査することにより、効率よく血清診断ができることが考えられるため、今後多数例により検証する予定である。

一方、抗核抗体検査は、操作が煩雑でありかつ判定が目視のため客観性に乏しいために、検査に習熟を必要とする。最近、これらの欠点を改善するために、ELISA 測定装置を使用した染色操作の自動化や抗体価測定を省力化できる蛍光画像自動解析装置<sup>11)</sup>の応用も提唱されているが、広く普及するには至っていない。

蛍光抗体法はその対応抗原により染色型が異なるため、染色型の判定は疾患特異的抗核抗体の鑑別に重要であると考えられてきた。しかしセントロメア型や PCNA 型など一部のものを除いて直接診断にはつながらないとして重視しない専門医も存在する。

このため、スクリーニング検査として抗核抗体を用いる際には、抗体価が課題となる。1997 年に Tan らは、蛍光抗体法において、多くの全身性エリテマトーデス (SLE)、強皮症 (SSc)、シェーグレン症候群 (SS) 患者では 1:320 以上の抗体価を示すこと、健常人の陽性率が 1:40 希釈で 31.7%、1:160 希釈で 5.0% と高率であったことから、自施設での健常者による 1:40 希釈と 1:160 希釈の陽性率を明記して検査結果を報告するよう勧告している<sup>9)</sup>。我々が行った日本人での調査でも健常人陽性率

(1:40 希釈) は 26.8% と高率で、健常人は低抗体価に多く分布し、SLE、SSc、SS、混合性結合組織病 (MCTD) は 1:160 希釈以上の高抗体価に多く分布していることが判明した(ただし RA は健常人分布に近い)<sup>12)</sup>。したがって、

健常人と膠原病を鑑別する上で蛍光抗体法は定性検査のみの判定ではなく、定量検査も実施する必要があると考えられる。

他方、施設間差につながる要因として最も関係の強いものの一つに、蛍光顕微鏡があげられる。蛍光顕微鏡の落射方式・透過方式の差(一般的には落射方式の感度が高い)、励起フィルターの差(狭帯型 BV・BV・UV、この順で感度は低くなる)、またレンズ等の性能の良し悪しも顕微鏡の新旧機種の違いに大きく関係していると考えられる。さらに、注意しなければならないのは蛍光顕微鏡の感度を下げる働きがある減光フィルターの使用である。これは核材や顕微鏡を新規導入するときなど、従来法との感度調節の目的のために一部の施設で使用されている。また、核材も試薬メーカーによって固定法が異なり、染色の強さに影響を及ぼす場合がある。これらの感度の要因は抗体価の変動の原因や本来あるべき染色型の見落としにつながると思われる。これらの実態を把握する意味からもコントロールサーベイを含めた調査を行うことは重要である。

今回のリウマチ学会教育施設でのアンケート調査の結果から、使用カットオフ値は 1:20 希釈と 1:40 希釈で 83% を占めていた。Tan ら<sup>9)</sup>および我々<sup>12)</sup>の報告にあるように膠原病の鑑別のためには 1:40 希釈よりも 1:160 希釈の方が適切であり、現状使用されているカットオフ値が適切なカットオフ値と乖離しており、カットオフ値は正に向けた膠原病診断の検査診断法の樹立が必要である。

RF の標準化に関しては、RF 検査の外部精度管理は現在全くおこなわれていない。しかし過去には精度管理調査がおこなわれていた。1996 年の日本医師会精度管理調査(平成 8 年度臨床検査精度管理調査結果報告書、日本医師会

1997) においてRF 定量検査はLAIA とTIA の変動係数は30%以上であり、施設間差が大きい実態を示したが改善策を見いだせないまま今日を迎えている。今回のミニサーベイにおいてもRF 定量値の、小さくない施設間差が依然として存在し、陰性を陽性とするような誤判定も見られたことより、施設間差や結果判断の不一致などの是正に向けた早急な取り組みが必要である。

RF 測定値の標準化に関して1) RF 定量値のよりどころである標準血清がない(国内のWHO 標準品は1995年頃にほぼ枯渇したと見られる)、2) 測定法・測定機器が多く存在する、3) 測定試薬も多くの試薬メーカーが製造しIgG分子上の抗原決定基に一貫性がないなどの問題点が指摘されてきた。これらの点を踏まえ、本研究班では標準化に向けての作業を開始しており、プール血清によって管理血清ないしは標準血清の作成が可能であるかを全国サーベイにより検討する。将来的にRF、FANAの標準化が実現した場合には、JCCLS 認証の国内標準品を作製することが必要となろう。

さらに抗核抗体の標準化に関しては、安定した感度評価方法を検討し実施するためには、参加施設における蛍光顕微鏡の感度なども含めたより詳細な検討が必要である。

検査の標準化を踏まえた自己抗体検査の効率的な使用法ガイドラインの作成については、現在専門医以外には、解釈が困難な自己免疫疾患関連抗体のより効率的な利用法が確立され、診断効率の向上及び不要な検査の減少により、医療経済上も医療費削減につながることを期待される。そのためには、健常者(小児、高齢者も含め)の基準値設定、臓器特異的自己免疫疾患などにおける抗核抗体の意義の評価なども、将来的に検討が必要となる。

## E. 結論

RA マーカー検査の基本性能の検討、EIA 法による抗核抗体検査結果の比較検討、PM/DM 患者血清における抗7SL RNA 抗体の存在とその性状から、抗CCP 抗体などの新規検査の有用性が示唆された。

RF の定量検査の施設間差および試薬間差に関する九州地区の大学病院を主としたミニサーベイ、全国のリウマチ学会教育施設に対するアンケート結果から、抗核抗体及び膠原病関連自己抗体の実施状況に関する現状が把握された。RF には依然として大きな施設間格差が存在し、抗核抗体に関しては、現状使用されているカットオフ値は適正值から乖離しており、いずれも早急な是正が必要であることが明確となった。

RF マーカー検査や抗核抗体の標準化、適正使用に関しては、今後より大規模な臨床研究による検討が必要である。現在、本班によるRF 及び抗核抗体の標準化、膠原病関連自己抗体利用のガイドラインの作成についての研究が進行しており、成果が期待される。

## 引用論文:

- 1) 吉田 浩: 血清学的検査(CRP、RF、HCV 抗体). 第31回精度管理調査報告書. 日本医師会, p78-83, 1998.
- 2) 吉田 浩: 血清免疫検査. 我が国の臨床検査精度管理-30年のあゆみ-. p145-146, 日本医師会, 1998.
- 3) 今福裕司、吉田 浩: 自己抗体測定の現状と問題点-リウマトイド因子. 臨床病理, 49: 580-584, 2001.
- 4) 吉田 浩、今福裕司: RF の測定の問題点とRA 診断における意義. 臨床リウマチ, 16:74-80,



2004.

5) 吉田 浩: RA 又は他の炎症性多発関節症.

DRG/PPS 対応臨床検査のガイドライン 2002. 日本臨床検査医学会 日常初期診療における臨床検査の使い方小委員会, p85-88, 2002.

6) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315-324, 1988.

7) Imafuku Y, Yoshida H, Yamada Y. Reactivity of agalactosyl IgG with rheumatoid factor. *Clin Chim Acta*, 334: 217-233, 2004.

8) Kozin F, Fowler M, Koethe S: A comparison of the sensitivities and specificities of different substrate for the fluorescent antinuclear antibody test. *Am J Clin Pathol* 74:785-790, 1980

9) Tan EM, Rodnan GP, Gracia I et al: Diversity of antinuclear antibodies In progressivesystemic scleriosis:anti-centromere antibody and Its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum* 23:617-625, 1980

10) Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS et al: Range of antinuclear antibodies In "healthy" Individuals. *Arthritis Rheum* 40: 1601-1611, 1997

11) 山崎順子, 陣内記代, 野口昌代, 他: 蛍光画像自動解析装置「Image Titer」による抗核抗体測定の評価. *医学と薬学*, 44: 961-968, 2000

12) Hayashi N, Kawamoto T, Mukai M, et al: Detection of antinuclear antibodies by use of an enzyme immunoassay with nuclear HEp-2 cell extract and recombinant antigens:

Comparison with immunofluorescence assay in 307 Patients. *Clin Chem* 47: 2

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1) 熊谷俊一, 林伸英. RA の早期診断 RA の免疫学的検査. *診断と治療* 91 ; 783-90 : 2003

2) 林伸英, 熊谷俊一. リウマチ診断のための新しい検査. *臨床病理* 51;030-1035 : 2003

3) 熊谷俊一, 西村邦宏, 林伸英. 免疫検査の最近の話題(2) 関節リウマチ(RA). *臨床病理* 52:836-843:2004

4) 荒木智奈美, 林伸英, 森山雅子, 森信早穂子, 向井正彦, 小柴賢洋, 河野誠司, 熊谷俊一. 関節リウマチ検査である抗環状シトルリン化ペプチド抗体(抗CCP抗体)の有用性. *臨床病理* 52 ; 966-972 : 2003

5) 大田俊行, SLE にて発症し関節リウマチ様の高度の骨破壊に至った一例. *九州リウマチ*. 24(1);60-65 : 2004

6) 池田勝義, 自己抗体検査に関する地域精度保証の検討 ( I ) . *九州リウマチ*. 23(2);211-226 : 2004

7) Yusaku Kanoh , Analysis of the oligosaccharide chain of human serum immunoglobulin G. *Oncology* 66:365-370:2004

8) Yusaku Kanoh , Changes in serum IgG oligosaccharide chains with prostate cancer progression. *Anticancer research* . 24:3135-3140:2004

9) Takashi Satoh. Novel autoantibodies against 7SL RNA in patients with Polymyositis/ Dermatomyositis. 投稿中

10) Hiroyuki Watabe, Anti-inflammatory roles

of liver X<sub>2</sub> receptor (LXR) in monosodium urate monohydrate crystals 投稿中

11) Yousuke Murakami, Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells-1. 投稿中

12) 赤星 透, 関節リウマチと抗 CCP 抗体. Medical Practice. 21;1756:2004

13) 赤星 透, 膠原病 (RA 以外). 臨床病理 52;743-750:2004

14) 赤星 透, インターロイキン-8. 日本臨床 63;163-166:2004

## 2. 学会発表

1) 荒木智奈美, 林伸英, 森山雅子, 辻剛, 向井正彦, 小柴賢洋, 河野誠司, 熊谷俊一. 新しい関節リウマチ検査である抗環状シトルリン化ペプチド(CCP)抗

体. 第50回日本臨床検査医学会総会(2003)

2) 林伸英, 荒木智奈美, 森山雅子, 金川寿賀代, 辻剛, 森信暁雄, 小柴賢洋, 河野誠司, 熊谷俊一. 新しい関節リウマチ検査である抗環状シトルリン化ペプチド (CCP) 抗体の評価. 第31回日本臨床免疫学会総会(2003)

3) 関節リウマチにおける抗環状シトルリン化ペプチド (CCP) 抗体の評価

林 伸英, 金川寿賀代, 辻 剛, 森信早穂子, 小柴賢洋, 河野誠司, 熊谷俊一. 第48回日本リウマチ学会(2004)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

図 1. 自己抗体の使用手順

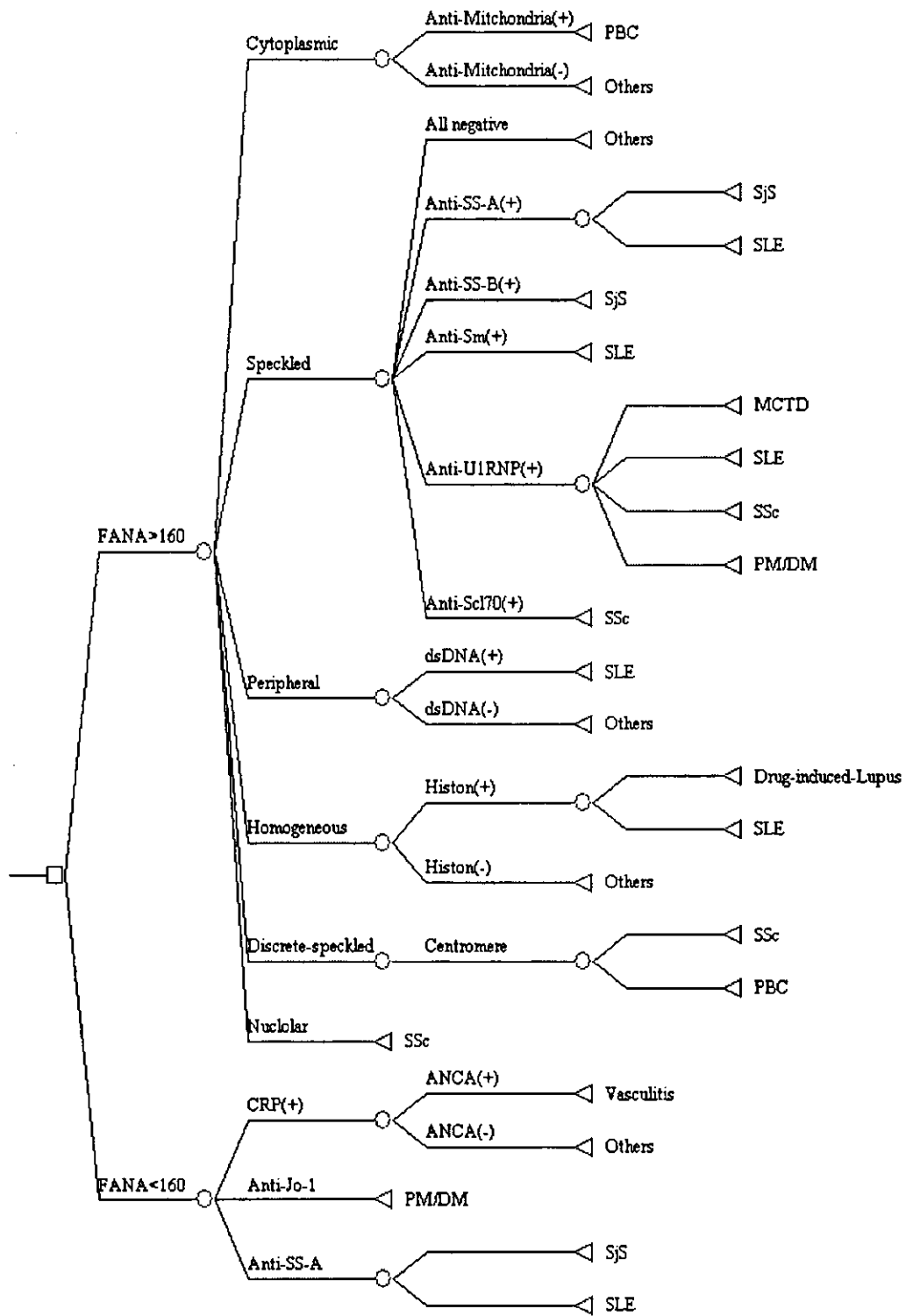


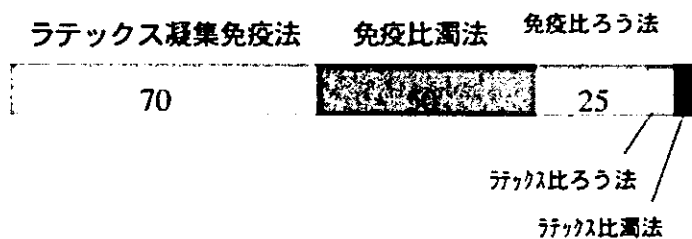
図 2. RF 定性法



【 院 内 : 26 , 外 注 : 53 】

図 3. RF 定量法 実施施設 と 測定原理

測定法原理



【 院 内 : 152 , 外 注 : 25 】

図 4. RF 定量法 基準値 分布 と 設定方法

