

自己抗体検査に関する地域精度保証の検討 (I)

—抗核抗体, 抗 dsDNA 抗体の施設間差—

産業医科大学病院中央臨床検査部

池田勝義 坂栗まゆみ 藤井久美子 大田俊行

要旨 抗核抗体 (ANA) および抗 ds-DNA 抗体について, 九州山口地区の大学病院を中心とした 11 施設の検査値を比較した. インフォームドコンセントを得た膠原病患者血清 (2 症例) を各施設に配布し, ルーチン検体と同様に測定した. また, あわせて測定条件・カットオフ値などについてアンケート調査をおこなった. ANA においては, 測定値 (titer) の施設間差は最大 8 倍 (40~320) であり, カットオフ値は 20 倍が 6 施設で 40 倍が 5 施設であった. 抗 ds-DNA 抗体 (IU/ml) においては, 低値の試料で 2.5~13.0, 高値の試料で 104.0~198.0 であり, カットオフ値分布は 5.0~25.0 であった. 2 つの自己抗体検査における施設間差を調べたところ, 臨床的判断に影響を与える程度に大きなデータ差が確認できた. これらの結果から臨床医は自己抗体測定値の施設間差が依然として存在することを認識するとともに, 検査担当者とともに標準化をすすめる必要がある.

はじめに

臨床検査の医療における存在意義は信頼性の高い生体情報を迅速に臨床医に提供することによって疾病の診断と治療に寄与することである. この信頼性と迅速性を遂行するために精度管理・精度保証は欠かすことが出来ない. 近年, 精度管理は酵素化学検査を中心に著しい改善を示してきたが, 自己抗体検査は全く改善がみられていないどころか, 日本医師会や日本臨床検査技師会の大規模な精度管理調査の項目に入っていないのが現状である.

近年, 免疫血清検査項目は測定機器や測定試薬の改良・発達とともに, 定量化が進んできており, 精度管理の必要性が求められている. また, 社会的にも EBM (EBLM) に基づいた医療を提供することが, 重要な

課題であり, 標準化を含めた免疫血清検査データの共有化を進めることが病診連携を推進してゆくためにも必要である. 免疫血清検査領域で, 抗原を測定する検査は徐々に標準品 (認証 CRM) の整備が進んできているので, ある程度の標準化を進めるめどがたってきたと考えられる. 一方, 抗体, 特に自己抗体検査は試薬として用いられている抗原がメーカーにより少しずつ異なることおよび患者自己抗体の多様性 (isotype, avidity など) があるとの特性から, 一律に標準化を進めることが困難であると考えられている. しかし, 均質な医療を提供するためには, ある程度の標準化 (臨床的標準化) 作業を進めていかなければならない. これらの背景を踏まえて, 自己抗体検査データの九州山口地区における実状を把握し, 今後の方向性を考える目的で, 自己抗体ミニサーベイを実施した.

Key Words: autoantibody testing, anti-nuclear antibody, standardisation, cutoff value, anti-ds DNA antibody

リプリント請求先: ☎807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1 産業医科大学病院中央臨床検査部

大田俊行

対象と方法

抗核抗体および抗 ds-DNA 抗体を対象検査項目とし、九州山口地区の大学病院を中心とした 11 施設 (九州大学病院, 福岡大学病院, 久留米大学病院, 産業医科大学病院, 麻生飯塚病院, 長崎大学病院, 熊本大学病院, 大分大学病院, 宮崎大学病院, 鹿児島大学病院, 山口大学病院) を調査対象施設とした (抗 ds-DNA 抗体は 10 施設)。

インフォームドコンセントを得た膠原病患者血清 (表 1: 症例 1.58 歳女性, 関節リウマチおよびシエーグレン症候群, 症例 2.42 歳女性 全身性エリテマトーデスおよび自己免疫性肝炎) を調査用試料とした。抗核抗体に関しては, 染色像が典型的なものではなく判定が若干難しいもの, 抗 ds-DNA 抗体については, カットオフ値付近と異常高値となるような条件で 2 症

例を選択した。これらの調査用試料を凍結状態で各施設に配布し, ルーチン検体と同様に測定するように依頼した。また, あわせて測定条件・カットオフ値についてアンケート調査をおこなった。調査用試料の HEp-2 細胞を用いた抗核抗体間接蛍光像を図 1 に示す。

結 果

1. 抗核抗体

今回の調査では 11 施設すべてが MBL 社製 HEp-2 細胞を核材とした間接蛍光抗体法 (FANA) によるキットの結果を報告してきたので, この結果について解析した (表 2)。MBL 社製抗核抗体スクリーニングキット (ELISA) を採用していた施設が 2 施設あったが, 集計の対象からは除外した。

カットオフ値は 11 施設中 6 施設が 20 倍, 5 施設が

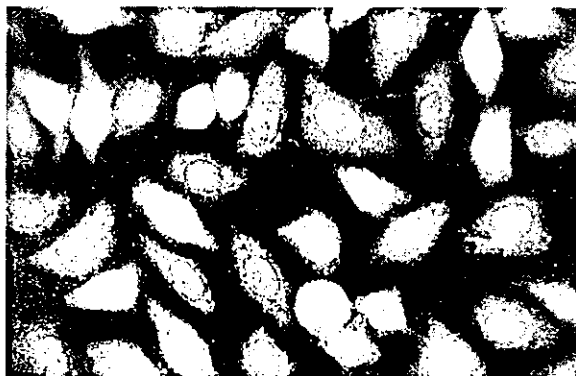
表 1 配布試料に用いた症例の主要データ

| 試料 1 (症例 1) | 試料 2 (症例 2) |
|------------------------|-------------------------|
| 58 歳, 女性 | 42 歳, 女性 |
| RA | SLE, 自己免疫性肝炎 |
| 抗核抗体: 80 倍 (染色型: S, C) | 抗核抗体: 320 倍 (染色型: N, C) |
| 抗 ds-DNA 抗体: 16.4U/mL | 抗 ds-DNA 抗体: 153.9U/L |
| 抗 SS-A 抗体: 93U/mL | RF: 5.9U/L |
| 抗 SS-B 抗体: >200U/mL | CARF: 1.5U/L |
| RF: 74.4U/mL | MMP-3: 131U/L |
| CRP: 0.4mg/dl | CRP: 1.7mg/dl |
| C3: 116mg/dl | C3: 65mg/dl |
| C4: 21mg/dl | C4: 13mg/dl |
| 尿一般検査: 異常所見なし | 尿一般検査: 異常所見なし |

S: speckled, C: cytoplasmic, N: nucleolar

CARF: 抗ガラクトース欠損 IgG 抗体

検体 1 (症例 1)



検体 2 (症例 2)



図 1 配布試料の間接蛍光像 (核材: HEp-2, 血清希釈 1:40)

表2 抗核抗体 各施設の測定結果

| 症例1 (試料1) | | | | | |
|-----------|--------|------|------|-----------------------|-------|
| 施設 | カットオフ値 | 抗核抗体 | 半定量値 | 染色パターン | 細胞質抗体 |
| 1 | 40 | + | 未実施 | Speckled | + |
| 2 | 40 | + | 未実施 | Homogeneous, Speckled | + |
| 3 | 20 | + | 80 | Speckled | + |
| 4 | 40 | - | 未実施 | - | + |
| 5 | 40 | + | 80 | Speckled | + |
| 6 | 40 | - | 未実施 | - | + |
| 7 | 20 | + | 未実施 | 未記載 | + |
| 8 | 20 | - | 未実施 | - | + |
| 9 | 20 | - | 未実施 | - | + |
| 10 | 20 | + | 80 | Speckled | - |
| 11 | 20 | + | 40 | Speckled | + |

| 症例2 (試料2) | | | | | |
|-----------|--------|------|------|------------------------|-------|
| 施設 | カットオフ値 | 抗核抗体 | 半定量値 | 染色パターン | 細胞質抗体 |
| 1 | 40 | + | 未実施 | Nucleolar, Homogeneous | + |
| 2 | 40 | + | 未実施 | 未記載 | + |
| 3 | 20 | + | 320 | Speckled, Nucleolar | + |
| 4 | 40 | + | 160 | Nucleolar | + |
| 5 | 40 | + | 320 | Nucleolar | + |
| 6 | 40 | - | 未実施 | - | + |
| 7 | 20 | + | 40 | Nucleolar | + |
| 8 | 20 | + | 40 | 核膜 | + |
| 9 | 20 | + | 320 | PCNA または Homogeneous | + |
| 10 | 20 | + | 40 | Nucleolar | - |
| 11 | 20 | + | 80 | Homogeneous, Speckled | + |

40倍であった。調査用試料1の測定結果は11施設中7施設が陽性、4施設が陰性と判定していた。陽性と判定していた施設のうち半定量値を報告した結果を比較すると、40倍が1施設で80倍が3施設であった。また、核の染色パターンに関しては、Speckled型が6施設、Homogeneous型が1施設であった。細胞質抗体は11施設中10施設が陽性と判定しており、1施設のみが陰性であった。調査用試料2の測定結果は11施設中10施設が陽性で1施設のみが陰性と判定していた。陽性と判定していた施設の半定量値を比較すると、40倍~320倍であった。また、核の染色パターンに関しては、Nucleolar型が6施設、Homogeneous型が3施設、Speckled型2施設でありPCNA (proliferating cell nuclear antigen)型と判定していた施設が1施設あった。細胞質抗体は11施設中10施設が陽性と判定していた。

2. 抗ds-DNA抗体

抗ds-DNA抗体は10施設すべてにおいてELISAで測定されており、試薬はすべてMBL社(MESACUP

表3 抗ds-DNA抗体 各施設の測定結果

| 施設 | カットオフ値 | 症例1 | 症例2 |
|----|--------|-------|-------|
| 1 | 12.0 | 5.1 | 141.6 |
| 2 | 5.0 | <5.0 | 104.0 |
| 3 | 12.0 | 9.3 | 144.4 |
| 4 | 25.0 | 18.4 | 176.0 |
| 5 | 12.0 | 16.4 | 153.9 |
| 6 | 12.0 | 4.6 | 115.3 |
| 7 | 12.0 | 19.0 | 198.0 |
| 8 | 12.0 | 9.1 | 135.4 |
| 9 | 10.0 | <10.0 | 109.5 |
| 10 | 12.0 | 9.3 | 165.0 |

単位: IU/ml

DNA-IIテスト(ds)を使用していた(表3)。カットオフ値は7施設が12.0IU/mlであったが、5.0、10.0、25.0IU/mlとしている施設が1施設ずつあった。調査試料1の測定値を比較すると、最低5.0IU/ml以下で最高19.0IU/mlであり、10施設中8施設がカットオフ値以下で陰性、2施設がカットオフ値以上で陽性という結果であった。調査試料2の測定値を比較す

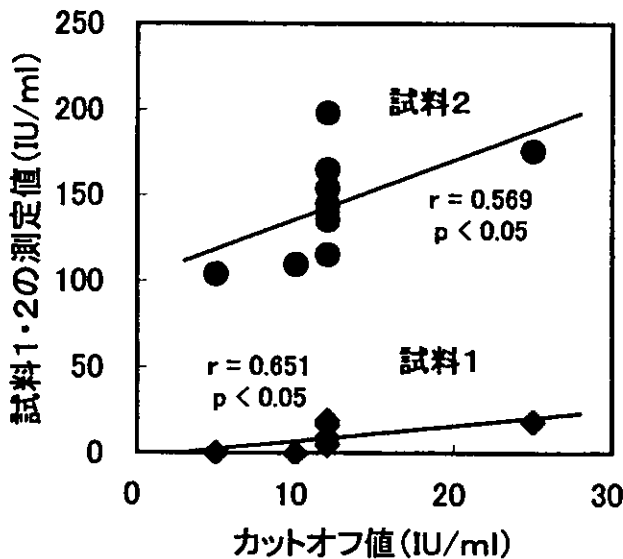


図2 抗ds-DNA抗体 カットオフ値と試料1・2の測定値の相関

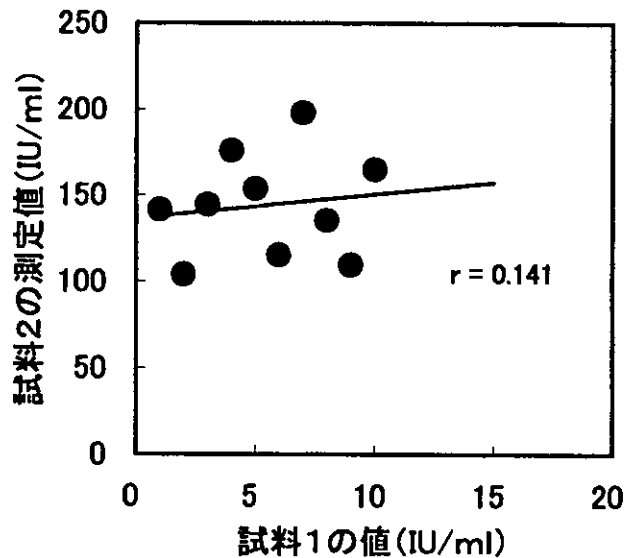


図3 抗ds-DNA抗体 試料1と試料2の測定値の相関

ると、最低値 104.0IU/ml であり最高値は 198.0IU/ml であった。異常高値域における測定値の施設間差は約 2 倍のばらつきを示した。カットオフ値と試料測定値の相関は、有意な関係 ($p < 0.05$) を認めた (図 2)。しかし、試料 1 と試料 2 の測定値の間には有意な相関を認めなかった (図 3)。

考 察

抗核抗体精度管理は検査試薬会社 (MBL 社) の主催のもと本邦において 1983 年に始まり、現在 500 を上回る全国の検査室が参加して実施されている。毎年の成績が報告されているが、近年間接蛍光抗体法による国内での標準化は概ね達成されつつあり良好とされている。しかし、実際は 2001 年度の報告書でも 9% 程度の抗体価の不一致が認められている¹⁾。この精度管理は染色型や抗体価が比較的単純な管理血清的な検体が用いられてきたので決して不一致率が低いとは言えない。実際、カットオフ値付近の検体および数千倍の抗体価の検体、あるいは日常頻繁に遭遇する混在型の染色を示す検体を使用する精度管理が必要とされてきた²⁾。今回用いた検体は検体 1 はカットオフ付近の検体であり、また検体 1・2 ともに混在型の染色を示す検体であり、上の条件に合った検討に値する検体であった。

抗核抗体検査は、HEp-2 細胞を核材として用いた

間接蛍光抗体法が 11 施設中 10 施設で使用されていた。本法は ELISA 法と比べて、ほぼすべての核抗原に対する抗体を検出することができ、細胞質抗体をも併せて検出可能であるのでスクリーニング検査として日常使われてきている。その反面、手技が比較的煩雑であり、鏡頭に熟練を要するなどの操作上の特性をもち、また、顕微鏡の性能差 (明るさ、解像力) などにも大きく依存するので、測定誤差が大きいことが問題となっている。

今回の測定結果の比較では、陰性～弱陽性と考えられる関節リウマチ患者 (症例 1) の血清において、各施設のカットオフ値で判定した場合、7 施設が陽性で 4 施設が陰性という結果となり、臨床判断におけるばらつきを認めた。カットオフ値付近の試料であったためこのような結果になったと考えられるが、半定量値は 40 倍～80 倍の範囲であり許容範囲内のばらつきと考えられる。近年、カットオフ値に関して 40 倍では偽陽性が多く出るなどの理由から、160 倍が妥当ではないかとの指摘がなされてきた³⁾⁴⁾。仮に、カットオフ値を 160 倍と仮定すると、試料 1 はすべて陰性と判定されることになり、全施設で一致した判断が可能となる。間接蛍光抗体法による抗核抗体のカットオフ値に関しては、未だにメーカーのカットオフ値を採用している検査室が多く問題である。宮脇は 1991 年の健康者の HEp-2 細胞 (MBL 社製キット) を用いた抗核

抗体価は20倍以上が12.6%、40倍以上が8%であり40倍をカットオフ値としたが、5年後の1996年に再度MBL社製キットを用いた同一の落射式蛍光顕微鏡と同一人物(複数)が判定した結果では40倍以上は45.1%、80倍以上は24.8%、160倍以上は9.7%でありカットオフ値を160倍まで上方修正せざるを得ない状況が発生したと述べている³⁾。同様にTanらは15の施設が参加した国際共同研究において健常者における抗核抗体価は40倍で31.7%、80倍で13.3%、160倍で5.0%、320倍で3.3%と報告し40倍と160倍の2点における各施設での健常者陽性率を明記した報告書を添付する必要性を述べている⁴⁾。今後本邦でも各施設で積極的に検討する必要がある。試料2の血清においては、11施設中の10施設が陽性と判定しており、ほぼ一致した結果であったが、半定量値は40倍から320倍まで広範囲であり、3管差のばらつきを認めた。

核の染色パターンに関しては、今回用いた試料の細胞質抗体が強く、染色パターンが混在するためにやや判定困難な試料であったことも原因であり、結果がばらついたものと考えられた。特に試料2は高力価の抗ds-DNA抗体を含んでいたが、古くから抗ds-DNA抗体との対応が知られているperipheralパターンを判読した施設は皆無であった。この点に関してHEp-2細胞は以前用いられていたラット肝細胞や白血球に比べて高感度であるが故に血清の希釈によってperipheralパターンが脱落することが関係したのかもかもしれない²⁾。このような背景からか、近年、染色パターンに関して検査室側が苦勞して観察したパターンが臨床側に無視されつつある。本来染色パターンの識別は抗核抗体の対応抗原が十分に明らかにされなかった時代に、その多様性と疾患または病態を明らかにする目的で導入されたが、その主な対応抗原が明らかにされた今日では抗核抗体が陽性であればRNPやSmといった抗原に特異的な抗体の測定をおこなうのが常識となっている。このような染色パターン判読の不必要性の流れは検査室側からみたととき大きな問題であり、各検査室の業務の効率化を図る上で考慮するべきであろう。

次に、抗ds-DNA抗体検査であるが、間接蛍光抗体法、RIA法、ELISA法が使用されている。今回はこの中で主流な測定法となりつつあるELISA法測定値の施設間比較をおこなった。カットオフ値に関して

は、10施設中7施設が12.0IU/mlであり、ほぼ統一したカットオフ値が使用されていた。この12.0IU/mlが臨床的に妥当かどうかは、今回の検討からは結論できないので、改めて感度・特異度に関する検討が必要である。他の3施設は、5.0、10.0、25.0IU/mlというカットオフ値を使用しており、施設内で独自に設定されたものか、従来法のカットオフ値をそのまま使用しているのかは明らかではないが、測定値との相関は有意であったので、その妥当性はあるものと推測された。しかし、試料1の測定値を比較すると、最小値は5.0IU/ml以下で最大値が19.0IU/mlであり、約4倍の開きを認めた。各施設のカットオフ値で判定すると、8施設は陰性、2施設が陽性という結果となり、判定の不一致がみられ、臨床判断を左右しかねない問題となる可能性がある。試料2の測定値は、最小値が104.0IU/ml、最大値が198.0IU/mlでありいずれも陽性であるが、測定値として約2倍の開きを認めた。また、試料1と試料2の測定値が有意な相関を示していなかったことから、測定値の誤差⁵⁾は系統的なものよりも偶発的なものが主体である可能性が高いと考えられた。抗ds-DNA抗体は診断のみにとどまらず、治療効果などの経過観察にも汎用される定量検査でもあるので、時系列的にデータを使用することが多い。したがって、測定値の定量安定性が要求される検査であり、施設間で大きな測定値差が存在することは、病診連携などの医療連携上も問題であり、至急改善する必要がある。

今回検討した検査項目は、全身性エリテマトーデス(SLE)の分類基準⁶⁾に採用されている項目でもあり、カットオフ値および測定値が施設によって一致していないことは、臨床的な判断に差をもたらす可能性が考えられる。このことを改善するために、今後、測定値の精密度および正確度を追究できるコントロールサーベイを設計し、地域的な標準化作業を進めることが重要である。

結 語

今回少数施設ではあったが、2つの自己抗体検査における施設間差を調べたところ、臨床的判断に影響を与える程度の大きなデータ差が確認できた。今後、施設内精度などを把握し、測定値差の原因が特定できる

調査を企画し実施してゆく必要がある。自己抗体検査においても、標準化作業を進めることで地域的医療連携に貢献できるものと思われるので、免疫血清領域の検査室の精度評価に関する地域的システムを構築すべきである。

参 考 文 献

- 1) 医学生物学研究所：2001年度自己抗体精度管理報告書。抗核抗体，抗DNA抗体，抗ENA抗体，抗ミトコンドリア抗体，抗平滑筋抗体 2003；1-49.
- 2) 宮脇昌二，浅沼浩子。抗核抗体。臨床検査 1997；41：508-516.
- 3) 宮脇昌二。膠原病検査の進歩と病態解明。抗核抗体・抗DNA抗体。日本内科学会雑誌 1997；87：2402-2408.
- 4) Tan, E.M., Feltkamp, T.E.W., Smolen, J.S. et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. Arthritis Rheum 1997；40：1601-1611.
- 5) 三宅一徳。精度管理法—内部精度管理と外部精度管理。臨床検査情報学。臨床病理レビュー特集号第113号，東京，宇宙堂八木書店，2000年，68-74.
- 6) Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982；25：1271-1277.

〈Abstract〉

Standardization of Autoantibody Measurement (I) ; Inter-institutional Differences of Anti-nuclear Antibody and Anti-dsDNA Antibody

IKEDA, K., SAKAGURI, M., FUJII, K. & OTA, T.

Central Clinical Laboratory, University of Occupational and Environmental Health

The measurements of anti-nuclear antibody (ANA) and anti-dsDNA antibody from 11 institutions, ten university hospitals and one general hospital, in the Kyushu-Yamaguchi area were compared. Two rheumatic disease patient's sera, obtained with informed consent, were distributed to each institution and were measured together with a routine sample. A questionnaire was also distributed that inquired about the measurement conditions, the cutoff value and so on. For the ANA measurements, an eight-fold difference in antibody titer (40-320) was observed between institutions. The cutoff value for a positive ANA was 20 in five institutions and 40 in six institutions. The anti-dsDNA antibody value (IU/ml) was 104.0-198.0 in one sample and 2.5 to 13.0 in the other sample. The cutoff values ranged from 5.0 to 25.0. Inter-institutional differences in auto-antibody measurements should be considered in the diagnosis of disease because of the potential impact on because it affects clinical judgment. While rheumatologists recognize the differences between institutions in the measurement of autoantibodies, it is necessary to recommend standardization of both technique and cutoff value for these procedures.

III. 関節リウマチの成因と病態生理

炎症メディエーター サイトカイン インターロイキン-8

Interleukin-8

赤星 透

Key words : IL-8, 好中球, 関節リウマチ

はじめに

関節リウマチ(RA)は滑膜組織の増殖と血管新生, 炎症性細胞浸潤を病理学的特徴とする慢性炎症性疾患である。RAではT細胞をはじめ, B細胞, 樹状細胞, $M\phi$ などの免疫担当細胞が滑膜組織内に濾胞状またはびまん性に集積し, 増殖滑膜細胞とともにパンヌスを形成している。一方, 関節腔に貯留した関節液には多数の好中球が浸潤している。これらの滑膜炎局所に浸潤した細胞は活性化され, 様々な生理活性物質の産生・放出などを介してRA関節炎の病態形成に関与している。なかでも, 好中球は浸潤細胞数も多く, RAの炎症病態の形成に重要な役割を担っていると考えられている。

本稿では, 好中球走化能をもつケモカインであるインターロイキン-8(interleukin-8: IL-8)のRAにおける役割について紹介する。

1. IL-8の構造と機能

ケモカインは8-14 kDaの塩基性, ヘパリン結合性のポリペプチドである。ケモカインは分子内のシステイン(C)の配置により, CXCケモカイン, CCケモカイン, Cケモカイン, CX3Cケモカインの4つに分類される¹⁾。CXCケモカインはN末端側の2つのCの間に他のアミノ酸が

1個介在する構造をしている。また, CXCケモカインはCXCモチーフの直前にELR(Glu-Leu-Arg)モチーフが存在する群と存在しない群に分かれ, ELR(+)CXCケモカインは主に好中球に, ELR(-)CXCケモカインは主にリンパ球に対して走化因子として作用している。IL-8(CXCL8)はELR(+)CXCケモカインに属する代表的なケモカインである。IL-8は72個のアミノ酸により構成され, 最初の2つのシステインはC-Q-C(Cys-Gln-Cys)構造をとる。IL-8の産生細胞としては, 単球・ $M\phi$, 線維芽細胞, 滑膜細胞, 血管内皮細胞, 好中球などがあり, 炎症性サイトカイン(IL-1や $TNF\alpha$ など)や細菌由来因子(LPSなど)などの様々な刺激によりIL-8を産生する。IL-8は好中球走化能に加え, 好塩基球やT細胞(CD8+)の遊走活性をもつ。更に, IL-8は好中球活性化作用を有し, リゾチーム酵素の放出や LTB_4 の産生, 活性酸素の産生などを誘導するとともに, 好中球の血管内皮細胞への接着を増強させる²⁾。更に, IL-8は血管新生にも関与することが報告されている。

2. IL-8受容体の構造と機能

IL-8に特異的に結合するIL-8受容体は2種類同定され, CXCR1, CXCR2と命名されている。これらの受容体はいずれも第2染色体上(2p35)

Tohru Akahoshi: Department of Laboratory Medicine, Kitasato University School of Medicine 北里大学医学部 臨床検査診断学

にコードされ、アミノ酸配列上の相同性は77%である。IL-8受容体はケモカイン受容体に共通した7回膜貫通型、G蛋白共役型の構造を有している³⁾。IL-8はCXCR1とCXCR2の2つの受容体に結合するが、GROやENA-78、NAP-2などのCXCケモカインはCXCR2には結合するが、CXCR1に対しては親和性が低い。CXCR1とCXCR2のIL-8に対する結合親和性はともに高いが、CXCR1はCXCR2に比べてIL-8への親和性が相対的に低いため、高濃度のIL-8には主にCXCR1が、低濃度のIL-8には主にCXCR2が反応する可能性が指摘されている。また、これらの受容体の発現は細胞により異なり、好中球はCXCR1とCXCR2をともに発現しているのに対して、T細胞やNK細胞、樹状細胞、好塩基球などはCXCR2のみを発現している。

3. RAにおけるIL-8発現

RA患者では変形性骨関節症(OA)患者に比較し、滑膜炎組織や関節液におけるIL-8の発現量が有意に増加している。活動期のRA患者滑膜炎組織においては、synovial lining cellやM ϕ 、滑膜線維芽細胞、血管内皮細胞などがIL-8を産生している⁴⁾。また、早期RA患者の滑膜炎局所においても、synovial lining cellやM ϕ のIL-8産生が増加していることが報告されている⁵⁾。IL-8はRA患者関節液中にng/mlのオーダーで存在し、OA患者の関節液中のIL-8に比較し有意に高値である。更に、RA患者末梢血単球のIL-8産生能は、無刺激状態ならびにLPS刺激においても健常人に比較して有意に亢進している。また、RAにおいてはIL-8だけでなく、GROやENA-78などのCXCケモカインの産生も亢進していることが報告されている。

RA患者では、関節炎局所への好中球浸潤とIL-8産生・IL-8反応性が抗リウマチ薬による治療効果と相関していることが報告されている。レフルノミドやメトトレキサート投与症例では、関節腔への好中球浸潤が抑制されるとともに、末梢血好中球のIL-8に対する走化能が抑制されている⁶⁾。また、RA患者に抗TNF α 抗体を投与することにより、関節炎局所への細胞浸潤が

抑制されると同時に、炎症局所におけるIL-8を含めたケモカイン産生が有意に抑制される。これらの結果は、IL-8がRAの炎症病態形成に一定の役割を担っていることを示唆している。

4. 関節炎モデルにおけるIL-8抑制の意義

関節炎におけるIL-8産生亢進は関節炎のモデル動物においても証明されている。マウスではヒトIL-8とCXCR1に相当する分子がなく、CXCR2を介した系が好中球浸潤に関与している。一方、家兎はCXCR1とCXCR2をともに発現していることから、IL-8の作用を評価することに適した実験動物である。家兎関節腔内にLPSやIL-1を注入することにより惹起されるLPS誘発関節炎またはIL-1誘発関節炎や、痛風性関節炎の実験モデルである尿酸結晶誘発性関節炎などでは、関節炎局所でのIL-8発現が亢進している。更には、オプアルブミン(OVA)などの抗原で家兎を免疫した後に、関節腔内に抗原を投与することにより誘導される慢性の抗原誘発性関節炎でも、IL-8の産生が亢進している。しかし、これらの関節炎モデルにおいては、IL-8以外のケモカインや他の走化因子(補体成分C5aやLTB $_4$ など)の産生も亢進していることから、関節炎におけるIL-8の役割を解析するためには、IL-8の特異的な抑制法を用いた解析が必要である。

IL-8の特異的抑制法としては、抗IL-8中和抗体やIL-8受容体結合阻害物質などがある。表1に家兎関節炎モデルにおけるIL-8抑制の効果を示す。抗IL-8中和モノクローナル抗体の投与はIL-1やIL-8誘発関節炎における関節腔内への白血球浸潤(好中球浸潤が主体)を抑制するとともに、関節腫脹も有意に抑制する⁷⁾。また、抗IL-8中和抗体は尿酸結晶誘発性関節炎における白血球浸潤を有意に抑制する⁸⁾。一方、非ペプチド系のCXCR2特異的アンタゴニストを経口(25mg/kg)投与すると、IL-8誘発関節炎やLPS誘発関節炎などの急性関節炎における白血球浸潤抑制(好中球のみならず単球やリンパ球の浸潤も抑制される)が認められるだけでなく、PGE $_2$ やLTB $_4$ などのアラキドン酸代謝産物、関

表1 家兎関節炎モデルにおけるIL-8抑制の効果

| 家兎関節炎モデル | 抑制法 | 効果 |
|------------|------------------|--|
| IL-1誘発関節炎 | 抗IL-8抗体 | 白血球浸潤抑制, 関節腫脹抑制 |
| IL-8誘発関節炎 | CXCR2 antagonist | 白血球浸潤抑制 |
| LPS誘発関節炎 | 抗IL-8抗体 | 白血球浸潤抑制, 関節腫脹抑制 |
| LPS誘発関節炎 | CXCR2 antagonist | 白血球浸潤抑制, エイコサノイド産生抑制, IL-8・TNF α 産生抑制 |
| 尿酸結晶誘発性関節炎 | 抗IL-8抗体 | 白血球浸潤抑制 |
| 抗原誘発性関節炎 | CXCR2 antagonist | 白血球浸潤抑制, 関節腫脹抑制, エイコサノイド産生抑制, IL-8・TNF α 産生抑制 |

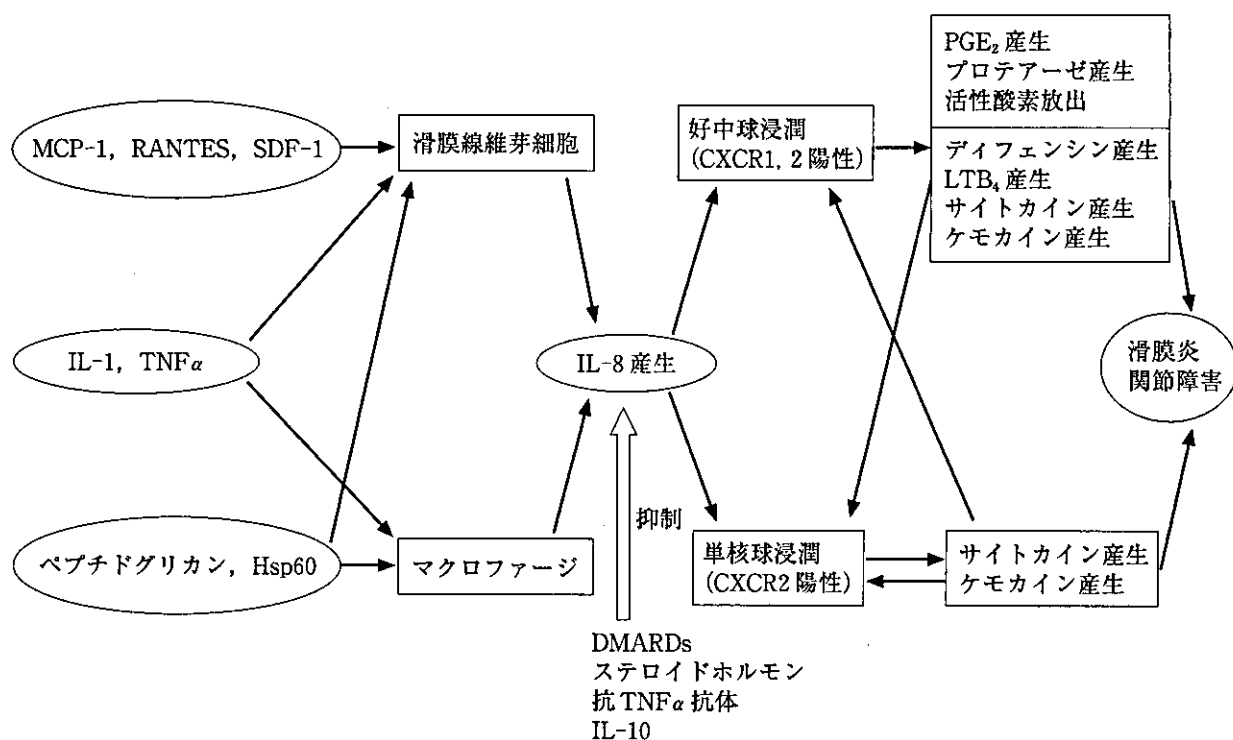


図1 関節炎におけるIL-8の作用

節液中のIL-8やTNF α などが有意に抑制される。また、抗原誘発性の慢性関節炎モデルにおいても、CXCR2特異的アンタゴニストの経口投与(抗原感作後の関節内への抗原投与日から、25mg/kgのアンタゴニストを1日2回、14日間連日投与)は、関節腔への白血球(好中球, 単球, リンパ球)浸潤, 関節腫脹, PGE $_2$ やLTB $_4$ 産生, IL-8やTNF α 産生などを有意に抑制する⁹⁾。

これらの関節炎モデルにおけるIL-8抑制の結果は、IL-8が関節炎における好中球浸潤に主要な役割を担っていることを示している。

5. RAにおけるIL-8の役割

RAの病因は不明であり、RA滑膜炎の直接的な誘因も明らかではない。しかし、近年の抗TNF α 抗体や可溶性TNF α 受容体などのTNF α 制御法の開発により、TNF α がRAにおける炎症性サイトカインカスケードの最上流に位置していることが臨床的にも証明された。IL-8はTNF α やIL-1刺激により滑膜細胞やM ϕ から誘導されるだけでなく、MCP-1やRANTES, SDF-1などのケモカイン刺激により滑膜線維芽

細胞からも産生される¹⁰⁾。また、ペプチドグリカンやHsp 60などは、Mφに発現している toll-like receptor 2 (TLR2)への結合を介して、IL-8発現を誘導することが報告されている¹¹⁾。IL-8の過剰産生はCXCR1とCXCR2を介して好中球浸潤を惹起するとともに、CXCR2を介してT細胞などの単核球浸潤を惹起する。急性炎症においても慢性炎症においても、好中球浸潤は生理活性物質の産生を介して炎症病態を誘導するだけでなく、好中球自身がディフェンシンやLTB₄、ケモカインなどの産生を介して単核球浸潤を直接誘導する。更に、浸潤したT細胞や単球、樹

状細胞、B細胞などは活性化され、サイトカインやケモカイン、生理活性物質、免疫グロブリンなどを産生し、RAの慢性炎症病態の形成に関与すると考えられる(図1)。

おわりに

RAにおけるIL-8の発現とその病態的意義について概説した。IL-8はRAにおける好中球浸潤に重要な役割を担っているケモカインである。今後、臨床応用が可能なIL-8抑制法が開発されれば、RAにおけるIL-8の作用の詳細がより明らかになるものと期待される。

■ 文 献

- 1) Baggiolini M, et al: Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15: 675-705, 1997.
- 2) Murphy PM: Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Semin Hematol* 34: 311, 1997.
- 3) Murphy PM, Tiffany HL: Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 253: 1280-1282, 1991.
- 4) Koch A, et al: Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J Immunol* 147: 2187-2191, 1991.
- 5) Takahashi Y, et al: The participation of IL-8 in the synovial lesions at an early stage of rheumatoid arthritis. *Tohoku J Exp Med* 188: 75-87, 1999.
- 6) Kraan MC, et al: Inhibition of neutrophil migration soon after initiation of treatment with leflunomide or methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43: 1488-1495, 2000.
- 7) Akahoshi T, et al: Essential involvement of interleukin-8 in neutrophil recruitment in rabbits with acute experimental arthritis induced by lipopolysaccharide and interleukin-1. *Lymphokine Cytokine Res* 13: 133-135, 1994.
- 8) Nishimura A, et al: Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis by a neutralizing antibody against interleukin-8. *J Leukoc Biol* 62: 444-448, 1997.
- 9) Podolin PL, et al: A potent and selective nonpeptide antagonist of CXCR2 inhibits acute and chronic models of arthritis in the rabbit. *J Immunol* 169: 6435-6444, 2002.
- 10) Nanki T, et al: Chemokines regulate IL-6 and IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 167: 5381-5385, 2001.
- 11) Pierer M, et al: Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by toll-like receptor 2 ligands. *J Immunol* 172: 1256-1265, 2004.

Topics

▷免疫検査の最近の話題(1)◁

膠原病(RA以外)

赤 星 透*

Recent Advances of Immunologic Laboratory Testing in Rheumatic Diseases

*Tohru AKAHOSHI, MD**

Immunologic laboratory tests serve critical roles in the care of patients with various rheumatic diseases. These tests can provide relevant information of rheumatic diseases based on their immunopathophysiological condition. Although immunologic laboratory tests are quite useful for the determination of diagnosis and the estimation of disease activity, organ involvement and prognosis, they are frequently misused and resulted in an inappropriate diagnosis and treatment. Appropriate use of immunologic laboratory tests and accurate clinical interpretation of the test results can prevent false diagnosis and unnecessary treatment. In order to improve clinical care of patients with rheumatic diseases, clinicians caring patients with rheumatic disease should recognize meanings, characteristics and limitations of each result of immunologic laboratory testing. This article reviewed recent advances in immunologic laboratory testing such as antinuclear antibody, anti-DNA antibody and anti-neutrophil cytoplasmic antibody, and introduced guidelines for these testing. These guidelines based on evidences of EBM may contribute to the appropriate use of immunologic laboratory tests for rheumatic diseases.

[Rinsho Byori 52 : 743~750, 2004]

*Department of Laboratory Medicine, Kitasato University School of Medicine, Sagamihara 228-8555

【Key Words】 antinuclear antibody (抗核抗体), anti-DNA antibody (抗 DNA 抗体), anti-neutrophil cytoplasmic antibody (抗好中球細胞質抗体), guideline (ガイドライン), rheumatic disease (リウマチ性疾患), mannose-binding lectin (マンノース結合レクチン)

膠原病・リウマチ性疾患の日常診療においては、抗核抗体をはじめとした各種の自己抗体や補体などの免疫学的検査が行われる。近年、膠原病に関連した自己抗体研究が著しく進歩し、数多くの自己抗体検査が臨床応用されるようになった。これらの免疫学的検査は、膠原病・リウマチ性疾患の診断や予後判定、臓器障害の有無、疾患活動性の評価、治療効

果の判定などを目的として汎用されるだけでなく、免疫病理学的な膠原病の病型分類や病態解明にも利用されている。しかし、一方では免疫学的検査に対する不十分な理解から、不適切な使用もしばしば散見される。本稿では、膠原病に関連した免疫学的検査の適性使用を中心に、最近の話題を紹介する。

*北里大学医学部臨床検査診断学(〒228-8555 相模原市北里 1-15-1)

I. EBMに基づいた 免疫学的検査のガイドライン

膠原病・リウマチ性疾患における免疫学的検査は、1950年代からのリウマトイド因子や抗核抗体、抗DNA抗体などの測定に始まる。その後、様々な自己抗体が発見され、市販の検査用キットが数多く提供されるようになり、日常診療における免疫学的検査の選択肢は著しく拡大した。今日では、病院の臨床検査部や検査センターが提供する検査項目の中から、必要な免疫学的検査を容易に選択することが可能となっている。しかし、この免疫学的検査の多様性と容易さは、不十分な理解に基づいた不適切な検査の実施による誤解や誤診、不適切な治療、さらには医療費の増大などを惹き起こす危険性を孕んでいる。もとより、臨床検査の適正使用のためのガイドラインは臨床検査医学の教育者や専門医の重要なテーマであり、我が国でも専門家による取り組みが行われている。しかしながら、今やこの免疫学的検査の理解と適正使用に係わる問題は日常診療の現場において見過ごすことが出来ない課題となっている。

アメリカリウマチ学会(ACR)では、学会内に免疫学的検査の特別委員会(The American college of rheumatology ad hoc committee of immunologic testing guidelines)を設置し、EBMに基づいた免疫学的検査のガイドラインについて検討している。この委員会では、今日までに抗核抗体と抗DNA抗体に関する多数の英文の研究論文をretrospectiveに解析し、臨床医の診療に有益な免疫学的検査のあり方を報告している^{1)~3)}。すなわち、集積した多くの論文の質をEBMの基準に基づいて格付けし、評価に値する論文のみから診断(diagnosis)や予後(prognosis)、長期経過観察(monitoring)などと免疫学的検査との相関性を統計的に解析している。判断の基準は、膠原病・リウマチ性疾患における各検査の感度、特異度、さらには尤度比(likelihood ratio; LR)に基づいている¹⁾。尤度比は検査結果がpost-test probabilityに影響を与えるかどうかを示す指数である。尤度比の算定式は、陽性尤度比(positive LR) = 感度/(1 - 特異度)、陰性尤度比(negative LR) = (1 - 感度)/特異度で表わされる。すなわち、ある疾患を疑う患者に陽性尤度比が高い検査を実施し、結果が陽性であれば、検査によってprobabilityが上昇することから、その検査は診断に有用であると位置づけることが出来る。

陽性尤度比が高い、または陰性尤度比が低い検査が臨床的に有用であると判定される。

A. 抗核抗体(anti-nuclear antibody; ANA)

ANAは膠原病・リウマチ性疾患の診療に欠かすことが出来ない重要な臨床検査である。ANAの測定方法としては、間接蛍光抗体法(ANA-IIF)が今でもGold Standardである。ヒト喉頭癌由来の上皮細胞株(HEp-2)がsubstrateとして汎用されるようになってから、ANA-IIFの感度の上昇と共に特異度の低下が生じている。健常人でも、1:40で25~30%、1:80で10~15%、1:160でも5%以上が陽性となることが報告されている。特に、高齢者や女性では陽性率が高くなることから、基準値の設定には注意が必要である。また、ANAの定性検査は意味がなく、必ず陽性倍率を記載し、検査結果に対する評価を加えることが求められる。抗核抗体検査における施設格差を無くするためにも、検査規格や検査技術の統一化が必要であろう。最近では、免疫固相法(ELISA)を用いたANA検査が一部で行われている。しかし、この方法は偽陽性率が高いことに加え、間接蛍光抗体法による染色型(抗原の局在性)から得られる情報も欠如していることなどから、推奨できる検査法とは言い難い。

ACRのad hoc committeeが報告した膠原病におけるANAの評価をTable 1とTable 2に示す²⁾。SLE患者と非SLE患者全体を比較した場合、ANAの平均特異性は57%であるのに対し、平均感度は93%と極めて高い。また、ANAの陽性尤度比は2.2と高値であり、陰性尤度比も0.11と低値であることから、ANAはSLEの診断に有用な検査であると言える。臨床的にSLEが疑われる患者がANA陽性であれば、SLEを考慮し抗dsDNA抗体や抗ENA抗体などの検査を引き続き行うことが必要となる。しかし、症状に乏しい患者がANA陰性であればSLEを除外することは可能であるが、特異性が低いことから症状とは無関係にANA陽性のみを以ってSLEと診断することは出来ない。一方、SLEの疾患活動性とANA抗体価との相関関係を示すエビデンスは得られていないことから、SLE患者におけるANAの継続的な測定(sequential measurement)の意義は疑問である。むしろ、SLE患者の経過観察には抗dsDNA抗体の測定の方が適切である。

全身性硬化症(SSc)においては、ANAの陽性尤度比は1.86、陰性尤度比は0.27であることから、ANAはSScの診断のために有用な検査と言える。しかし、SLEの場合と同様にANA抗体価とSScの疾患活動

Table 1 膠原病・リウマチ性疾患における抗核抗体検査の有用性

| 疾患 | 対象論文数 | 感度(%) | 特異度(%) | | | | 尤度比 | |
|------------------|-------|-------|--------|-----|-----|----|------|------|
| | | | 他の膠原病 | 他疾患 | 健常者 | 全体 | 陽性 | 陰性 |
| SLE | 21 | 93 | 49 | 75 | 78 | 57 | 2.2 | 0.11 |
| SSc | 30 | 85 | 44 | 75 | 71 | 54 | 1.86 | 0.27 |
| PM-DM | 14 | 61 | 52 | 91 | 82 | 63 | 1.67 | 0.61 |
| Sjögren's | 16 | 48 | 44 | 91 | 71 | 52 | 0.99 | 1.01 |
| Raynaud's | 12 | 64 | 48 | 8 | 15 | 41 | 1.08 | 0.88 |
| JRA | 21 | 57 | NA | NA | NA | 39 | 0.95 | 1.08 |
| JRA with uveitis | 21 | 80 | NA | NA | NA | 53 | 1.68 | 0.39 |
| RA | 14 | 41 | 38 | 85 | 82 | 56 | 0.93 | 1.06 |

文献2)より引用

Table 2 膠原病・リウマチ性疾患の診断・予後・経過観察における抗核抗体検査の意義

| 疾患 | 診断 | 予後判定 | 経過観察 |
|--------------------|-----------------|-----------------------------|------|
| SLE | 有用, 陽性なら次の検査を行う | 不明 | 不明 |
| SSc | 有用 | 抗 Scl-70 抗体と抗セントロメア抗体は有用 | 不明 |
| PM/DM | 有用性は低い | 抗 synthetase 抗体は有用 | 不明 |
| SjS | 有用性は低い | SLE などの合併例では有用 | 不明 |
| Raynaud's | 有用ではない | Primary と secondary の鑑別には有用 | 不明 |
| JRA | 有用ではない | uveitis 合併例に関しては有用 | 不明 |
| RA | 有用ではない | 不明 | 不明 |
| Drug-induced lupus | 診断基準の一部 | 不明 | 不明 |
| MCTD | 診断基準の一部 | 不明 | 不明 |

文献2)より引用, 一部改変

性には相関性はなく, 予後判定や経過観察のための継続的な測定の必要性は明確ではない。むしろ, 抗 Scl-70 抗体や抗 centromere 抗体測定の方が予後判定に有用である。多発性筋炎・皮膚筋炎 (PM-DM) やシェーグレン症候群 (SjS) では, ANA の感度, 特異度, 尤度比ともにやや劣るため, 診断における有用性は高くない。また, 疾患活動性と ANA の相関性を示すエビデンスもない。むしろ, 筋炎患者では抗 synthetase 抗体を測定することが間質性肺炎や関節炎などの臓器障害の有無や予後を推測するために有用である。ANA は若年性関節リウマチ (JRA) の診断のためには有用な検査ではない。しかし, ANA は uveitis を呈する JRA に対しては感度, 陽性尤度比, 陰性尤度比ともに優れているため, JRA 患者に対しては uveitis の合併を考慮して ANA を測定することが求められる。一方, 関節リウマチ (RA) の診断や予後判定には ANA はまったく有用性を示さない。混合性結合組織病 (MCTD) や薬剤誘発性ループスにおいては, ANA は診断基準の一部に含まれており, ANA の測定は必須であるが, 疾患活動性や予後との

関連性は確認されていない。

Table 3 に膠原病における ANA 検査の総括を示す。

Table 3 膠原病・リウマチ性疾患における抗核抗体の意義

| | |
|-----------------------|---|
| 診断に極めて有用 | 全身性エリテマトーデス 全身性硬化症 (強皮症) |
| 診断に有用 | シェーグレン症候群 多発性筋炎・皮膚筋炎 |
| 経過観察や予後判定に極めて有用 | 若年性関節リウマチ レイノー現象 |
| 診断基準に含まれる | 薬剤誘発性ループス 混合性結合組織病 自己免疫性肝炎 |
| 診断, 経過観察, 予後判定に有用ではない | 関節リウマチ 多発性硬化症 甲状腺疾患 感染症 特発性血小板減少性紫斑病 線維筋痛症 |

文献2)より引用

Table 4 SLEにおける抗 dsDNA 抗体の意義

| | 感度(%) | 特異性(%) | 陽性尤度比 | 陰性尤度比 |
|---------------------|-------|--------|-------|-------|
| SLE vs 健常者 | 57 | 97 | 16.4 | 0.49 |
| SLE 活動性 vs 非活動性 | 66 | 66 | 4.14 | 0.51 |
| SLE 腎症あり vs なし | 65 | 41 | 1.7 | 0.76 |
| SLE 活動性腎症 vs 非活動性腎症 | 86 | 45 | 1.7 | 0.30 |

文献3)より引用, 一部改変

このような ANA 検査の臨床検査的な意義は、リウマチ専門医や臨床検査専門医などには認識されているが、EBMに基づいた検査指針として一般臨床医に広く認識されているとは言い難いのが現状であろう。

B. 抗 DNA 抗体

抗 DNA 抗体の測定法には様々な方法があるが、radioimmunoassay 法 (Farr assay) や *Crithidia luciliae* を用いた免疫蛍光抗体法、ELISA 法などが一般的に用いられている。Radioimmunoassay (Farr assay) は高親和性抗 dsDNA 抗体を主に測定していることが利点であるが、免疫グロブリンの isotype は不明である。また、抗原への 1 本鎖 DNA (ssDNA) の混入も完全には除外出来ない。*Crithidia luciliae* を用いた免疫蛍光抗体法は kinetoplast に対する抗 dsDNA 抗体を測定するものであるが、操作が煩雑であり、免疫グロブリンの isotype も測定出来ない。一方、ELISA 法は高親和性と低親和性の抗 dsDNA 抗体をともに測定していることから、前 2 者に比べ特異性が劣り、かつ抗原に ssDNA の混入も否定出来ないことが欠点であるが、isotype の測定は可能である。このように、それぞれの検査法には利点と欠点があるが、高親和性抗 dsDNA 抗体と組織障害との関連性を考慮すれば、radioimmunoassay 法や免疫蛍光抗体法が推奨されるべき検査法と言える。しかし、検査の煩雑さと検査経費などの点から、これらの検査法の使用は減少し、逆に ELISA 法による測定が普及しつつある。

健常人において抗 dsDNA 抗体が陽性となることは通常みられず、陽性の場合でもその抗体価は低い。一方、SLE においては、抗 dsDNA 抗体の平均感度は 57.3% であるが、平均特異度は 97.4% と極めて高く、陽性尤度比は 16.4、陰性尤度比も 0.49 と大変優れている (Table 4)。したがって、抗 dsDNA 抗体の測定は SLE の診断に極めて有用な検査である³⁾。事実、抗 dsDNA 抗体は SLE の診断基準の 1 つに挙げられている。しかし、抗 dsDNA 抗体の特異度は

100%ではないので、除外診断のための指標としてはならない。また、ANA-IIF と抗 dsDNA 抗体の結果は相関するため、ANA-IIF 陰性の症例に対して抗 dsDNA 抗体を測定することは無意味であり、ANA-IIF 陽性で SLE が疑われる症例において抗 dsDNA 抗体を測定すべきである。一方、抗 ssDNA 抗体は ELISA 法で測定されているが、臨床的意義に乏しく、医療経済的な観点からも有用な検査とは言い難い。

従来より、抗 dsDNA 抗体は SLE の活動性やループス腎炎と関連することが指摘されてきた。多くの論文の知見を集積した EBM の観点からもこの点が報告されている。SLE の疾患活動性における抗 dsDNA 抗体の平均感度と平均特異度はともに 66%、陽性尤度比と陰性尤度比はそれぞれ 4.14、0.51 であり、著しく高いとは言えないが、抗 dsDNA 抗体が疾患活動性と相関することが確認された。しかも、radioimmunoassay 法や *Crithidia* を用いた免疫蛍光抗体法による結果が ELISA 法による結果よりも疾患活動性との相関性が高いことが示されている³⁾。多くの SLE 症例では、抗 dsDNA 抗体価は疾患活動性と相関する傾向にあるが、一部には疾患活動性と無関係に高力価の抗 dsDNA 抗体が持続する症例が存在することも知られている。

また、Table 4 に示すように、腎症の有無や腎症の活動性と抗 dsDNA 抗体の相関性も軽度ながら認められ、病理学的分類においても type IV のびまん性増殖性腎炎と抗 dsDNA 抗体との間には、より高い相関性が確認された。しかし、これらの相関性は決して高いものではなく、ループス腎炎の病態形成には多数の因子が複雑に関与し合っているものと推測される。SLE の再燃の予知に抗 dsDNA 抗体の測定が有用であるか否かについては、基礎となる報告論文数が少ないため不明である。

以上の EBM に基づいた解析から、SLE の診断において抗 dsDNA 抗体の測定が有用であること、SLE の疾患活動性や腎症と抗 dsDNA 抗体の間には

Table 5 ANCA 関連血管炎における ANCA 検査の有用性

| | IIF+ | cANCA+ | pANCA+ | ELISA+ | PR3+ | MPO+ | IIF+and ELISA+ |
|-------------------------------|------|--------|--------|--------|------|------|----------------|
| Sensitivity (%) | 67 | 42 | 25 | 55 | 35 | 20 | 52 |
| Specificity (%) | 93 | 96 | 96 | 99 | 99 | 99.7 | 99 |
| Positive predictive value (%) | 45 | 51 | 38 | 83 | 80 | 88 | 88 |
| Negative predictive value (%) | 97 | 95 | 94 | 96 | 95 | 93 | 96 |
| Positive LR | 9.4 | 11.8 | 6.9 | 54.2 | 45.6 | 79.8 | 82.1 |
| Negative LR | 0.36 | 0.6 | 0.78 | 0.45 | 0.66 | 0.8 | 0.48 |

文献 6) より引用

相関性は認められるものの限度があるため、他の症状や所見と合わせて総合的に評価すべきこと、さらには再燃予知における抗 dsDNA 抗体の意義は不明であり、抗体単独での評価は避けるべきであることなどが指摘されている³⁾。

C. 抗好中球細胞質抗体 (ANCA)

抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody : ANCA) は 1982 年の発見以来、疾患特異性や対応抗原の解析が進み、全身性血管炎症候群における有用な検査項目として位置付けられるようになった⁴⁾⁵⁾。ANCA の検査法には、エタノール固定をした健常人末梢血好中球を基質とした IIF 法と ANCA 対応抗原を用いた ELISA 法がある。IIF 法ではその染色像から P-ANCA と C-ANCA が区別されるが、“rim” pattern を示す atypical ANCA や細胞質の granularity などが乏しい atypical C-ANCA なども稀にみられることに注意が必要である。ELISA 法は P-ANCA の対応抗原である myeloperoxidase (MPO) や C-ANCA の対応抗原である proteinase-3 (PR-3) に対する抗体価を測定するもので、複数の測定キットが市販されている。いずれも、添付されている標準品をもとに EU または U/ml などの単位で抗体価を算出する。ANCA の検査法に関しては、我が国の厚労省難治性血管炎班のものを含め多くの報告がなされている。Table 5 には Johns Hopkins 大学のグループが発表した IIF 法と ELISA 法による ANCA 検査の有用性に関する結果を示す⁶⁾。この研究では、ANCA を測定した 856 名の患者について、最終診断と検査結果との関連性を検討している。この中で ANCA 関連血管炎と診断された患者は 8.1%、炎症性腸疾患が 2.6%、ANCA の関連が疑われるが診断のつかない患者が 3.2%であった。ANCA 関連血管炎に対する感度では、IIF 法 67%、ELISA 法 55%、特異度では、IIF 法 93%、ELISA 法 99%である。Positive predictive value は IIF 法 45%に対し、ELISA

法 83%、陽性尤度比でも IIF 法 9.4 に対し、ELISA 法は 54.2 であり、IIF 法より ELISA 法の方が優れていた。さらに、IIF 法と ELISA 法を併用すると positive predictive value 88%、陽性尤度比 82.1 と極めて高値であった。IIF 法では、P-ANCA や C-ANCA に加え、atypical ANCA や atypical C-ANCA、さらには偽陽性などを含めて陽性と判定されるため、ELISA 法で PR-3 ANCA や MPO ANCA が陽性となるのは IIF 法陽性例の 1/2 以下である。この結果は、IIF 法によるスクリーニングとその陽性結果に基づいて行う ELISA 法による ANCA 検査が ANCA 関連血管炎の診断に極めて有用であることを示している。一方、ANCA の対応抗原には二次顆粒に含まれるエラスターゼやカテプシン G、ラクtofelin、アズロシディン、さらには h-lamp-2 や BPI, HMG 1/2 などがあり、これらに対する ANCA は IIF 法では P-ANCA や C-ANCA、あるいは atypical ANCA, atypical C-ANCA などの陽性判定となる。このような ANCA は炎症性腸疾患や薬剤誘発血管炎、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、感染症などの ANCA 関連血管炎以外の疾患において見出されている⁵⁾⁷⁾。したがって、ANCA 関連血管炎のみならず、ANCA に関連する非血管炎性の自己免疫疾患に対しても、IIF 法と ELISA 法による ANCA 検査の適切な使用と評価が重要であると言える⁸⁾。

膠原病における免疫学的検査の問題点としては、①検査法が統一されていない、②施設間格差が存在する、③各検査の臨床的意義とその限界に対する認識が不十分なために、検査結果に対する誤解が生じやすい、④検査の不適切な使用 (パネル検査、一括検査) がみられる、⑤日本人のための EBM に基づいた免疫学的検査の指針がないことなどが挙げられる。

膠原病を疑う患者に対して免疫学的検査の EBM とは無関係に、抗核抗体のみならず、リウマトイド因子、抗 DNA 抗体、複数の抗 ENA 抗体、ANCA、

Table 6 膠原病・リウマチ性疾患における自己抗体検査のアルゴリズム

| 診断名 (Tentative diagnosis) | ANA-IIF | anti-dsDNA | anti-Sm | anti-U1RNP | anti-SSA/SSB | anti-Scl-70 | anti-Jo-1 | anti-ribonRNP | ANCA-IIF | MPO-ANCA | PR3-ANCA | anti-Cardiolipin | anti-β ₂ GPI | IgM RF | anti-CCP |
|---------------------------|---------|------------|---------|------------|--------------|-------------|-----------|---------------|----------|----------|----------|------------------|-------------------------|--------|----------|
| 全身性エリテマトーデス | ■ | ▲ | ▲ | ● | ▲ | | | ▲ | | | | ▲ | ● | ● | |
| 原発性シェーグレン症候群 | ■ | ● | ● | | ▲ | | | ● | | | | ● | | ● | |
| 全身性硬化症 | ■ | | | ▲ | | ▲ | | | | | | ● | | | |
| 混合性結合組織病 | ■ | ▲ | ▲ | ▲ | | | | ▲ | | | | ● | | ● | |
| 多発性筋炎・皮膚筋炎 | ■ | | | ▲ | | | ▲ | | | | | ● | | | |
| 抗リン脂質抗体症候群 | ■ | | | | | | | | | | | ■ | ▲ | ● | |
| 関節リウマチ | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ |
| 全身性血管炎 | | | | | | | | | ■ | ▲ | ▲ | | | | |
| 結合組織病・リウマチ性疾患 | ■ | ● | ● | ● | ▲ | ● | ▲ | | ■ | ● | | ■ | ▲ | ● | |

■ Primary screen test ▲ Secondary test ● Additional test (optional) 文献9)より引用

補体などを取り合えず一括検査するようなことは避けねばならない。そのためには、多くの臨床医が膠原病の免疫学的検査の意義を理解することが必須である。膠原病が疑われる患者に対し適切なスクリーニング検査、あるいはそれに引き続く検査を実施し、検査結果の正しい評価に基づいて患者を専門医に引き継いで行くような地域医療システムの確立が望まれる。Table 6 にデンマークで普及している自己抗体検査のアルゴリズムを示す⁹⁾。膠原病・リウマチ性疾患が疑われる患者に対する適切な検査の確立と普及は、膠原病の適切な診断と治療、ひいては医療経費の節減にも繋がるものと考えられる。そのためには、日本人のためのEBMに基づいた検査指針の確立が求められている。

II. SLE と Mannose-Binding Lectin

SLE 患者における動脈硬化症の発症は、対照に比べて有意に高率であることが知られている¹⁰⁾。頸動脈エコー検査で認められる SLE 患者のプラーク形成には、年齢や血清コレステロール値、ステロイド剤の投与量などの通常の risk factor とは別に、SLE 自体の関与が指摘されていた。しかも、SLE における動脈硬化性病変の形成には抗リン脂質抗体の関与は否定的であり、病態形成に直接関与する因子は不明であった。最近、Mannose-Binding Lectin (MBL) の遺伝子多型が SLE の動脈硬化症の進展に関連することが報告された¹¹⁾。MBL は肝由来の血清蛋白で、細菌が発現する mannose や N-acetyl glucosamine

oligosaccharides と結合し、MBL-associated serine proteases (MASP) の作用を介して補体を活性化させることが知られている (補体のレクチン経路)¹²⁾。ヒト第 10 染色体上にある MBL 遺伝子の第 1 exon には 3 ヶ所の遺伝子変異があり、その多型により血清 MBL 濃度に個体差が生じる。しかも、血清 MBL 濃度の低下は易感染性のみならず、動脈硬化症の進展にも関連することが指摘されていた¹²⁾。Øhlenschläger らは、91 名のデンマーク人の SLE 患者を対象として、MBL の遺伝子多型と血管病変の有無を検討し、MBL 遺伝子変異の homozygous グループでは、動脈血栓、特に心筋梗塞の発症率が対照や heterozygous グループに比べて有意に高いことを報告した (Table 7)。一方、MBL の遺伝子多型と静脈血栓症との関連性は認められていない。このような MBL の遺伝子多型を示す症例では、血清 MBL の oligomerization が低下するため、MBL が低分子化し、血清 MBL 濃度が低下することが知られている。血清 MBL 濃度低下例に動脈硬化症の発現が多いことは、MBL が抗動脈硬化作用を持つことを示唆している。MBL が apoptosis や necrosis に陥った細胞にも結合し、補体を介してマクロファージによる傷害細胞の食食を誘導することが報告されている¹³⁾。MBL の抗動脈硬化作用の詳細は不明であるが、MBL のマクロファージを介した作用に何らかの関連性があるのかもしれない。

MBL は補体活性化作用を有し、感染抵抗性に関与することから、SLE における MBL の役割が注目さ

Table 7 91名のSLE患者におけるMBL遺伝子多型と血管病変との関連性

| Event | A/A Genotype (N=54) | A/O genotype (N=30) | O/O Genotype (N=7) | Hazard Ratio (95% CI) | p Value |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|---------|
| Arterial thrombosis | 13 (24%) | 5 (17%) | 6 (86%) | 5.8 (2.2-15.2) | <0.001 |
| Acute myocardial infarction | 5 (9%) | 3 (10%) | 4 (57%) | 9.4 (2.6-33.7) | 0.001 |
| Cerebral infarction | 7 (13%) | 2 (7%) | 2 (29%) | 3.7 (0.8-17.9) | 0.1 |
| Leg embolus | 1 (2%) | 0 | 0 | — | — |
| Venus thrombosis | 9 (17%) | 4 (13%) | 1 (14%) | 1.1 (0.1-8.8) | 0.91 |
| Death | 7 (13%) | 1 (3%) | 2 (29%) | 2.9 (0.6-13.8) | 0.18 |

文献 11) より引用

れる。SLE患者においてMBLのプロモーター領域やexon 1における遺伝子多型が高頻度に認められることが以前より報告されていた¹⁴⁾。また、SeelenらはMBLに対する自己抗体がSLE患者血清中に存在することを報告している¹⁵⁾。抗MBL抗体はSLEの疾患活動性や腎症の有無などとの関連性はみられておらず、抗MBL自己抗体が血清MBL機能やSLEの病態形成に如何なる作用を及ぼしているかは不明である。このように、SLEとMBLに関する報告が集積してきており、SLEにおける補体機能や感染抵抗性のみならず、動脈硬化症との関連性などについてもMBLの役割が注目される。

今後、臨床検査領域においても、MBLは感染抵抗性のみならず抗動脈硬化作用に関わる分子としても注目を集めるものと思われる。

文 献

- American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines, Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: An introduction. *Arthritis Rheum* 2002; 47: 429-33.
- Solomon DH, Kavanaugh AF, Schur PH, et al. Evidence-based guidelines for the use of immunologic test: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002; 47: 434-44.
- Kavanaugh AF, Solomon DH. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines, Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum* 2002; 47: 546-55.
- Reumaux D, Duthilleul P, Roos D. Pathogenesis of diseases associated with antineutrophil cytoplasm autoantibodies. *Human Immunol* 2004; 65: 1-12.
- Seo P, Stone JH. The antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. *Am J Med* 2004; 117: 39-50.
- Stone JH, Talor M, Stebbing J, et al. Test characteristics of immunofluorescence and ELISA tests in 856 consecutive patients with possible ANCA-associated conditions. *Arthritis Care Research* 2000; 13: 424-34.
- Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H, et al. High mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut* 1999; 44: 867-73.
- Savigny J, Dimech W, Fritzler M, et al. Addendum to the international consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 312-8.
- Wiik AS, Gordon TP, Kavanaugh AF, et al. Cutting edge diagnostics in rheumatology: the role of patients, clinicians, and laboratory scientists in optimizing the use of autoimmune serology. *Arthritis Rheum* 2004; 51: 291-8.
- Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 299-308.
- Øhlenschläger T, Garred P, Madsen HO, et al. Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2004; 351: 260-7.
- Garred P, Larsen F, Madsen HO, et al. Mannose-binding lectin deficiency - revisited. *Mol Immunol* 2003; 40: 73-84.
- Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, et al. Mannose-

- binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2853-63.
- 14) Ip WK, Chan SY, Lau CS, et al. Association of systemic lupus erythematosus with promoter polymorphisms of the mannose-binding lectin gene. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1663-8.
- 15) Seelen MA, Trouw LA, Van Der Hoorn JWA, et al. Autoantibodies against mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2003; 134: 335-43.

Analysis of the Oligosaccharide Chain of Human Serum Immunoglobulin G in Patients with Localized or Metastatic Cancer

Yuhsaku Kanoh^a Takaomi Mashiko^a Mikio Danbara^a
Yoshinaga Takayama^a Shinichi Ohtani^a Takao Imasaki^b Tadashi Abe^b
Tohru Akahoshi^a

Departments of ^aLaboratory Medicine and ^bInternal Medicine, Kitasato University School of Medicine, Sagamihara, Kanagawa, Japan

Key Words

IgG oligosaccharide chains · Agalactosyl IgG oligosaccharide · Cancers, lung and gastric

Abstract

A quantitative imbalance between matrix metalloproteinases produced by cancer cells and tissue inhibitors of metalloproteinases produced by fibroblasts and other types of cells has been demonstrated to be a causative factor in invasion and metastasis of cancer cells. On the other hand, it is reported that sugar chains of adhesion molecules such as integrins and CD44 also influence the metastasis of cancer cells. Here, alterations of serum IgG oligosaccharide chain structure were investigated during tumor progression using the new method of fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). The structure of serum IgG oligosaccharide chains from 22 cancer patients (11 localized cancer, 11 metastatic cancer) and 10 healthy controls was evaluated by FACE. It was clearly demonstrated that serum IgG oligosaccharide chains without galactose (agalactosyl IgG oligosaccharide) significantly increased with tumor progression of lung and gastric cancers. It is concluded that a marked

increase of agalactosyl IgG oligosaccharide in these cancer patients is associated with carcinogenesis and metastasis. Therefore, the analysis of serum IgG oligosaccharide chain structure by FACE may be useful for evaluating diagnosis and prognosis in patients with these carcinomas.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

Introduction

N-Linked oligosaccharide chains are present on one heavy chain of human immunoglobulin G (IgG) at the site of ²⁹⁷Asn in the Fc region [1]. It is documented that changes of the serum IgG oligosaccharide chain structure affect the whole molecular structure of IgG and its ability to bind to macrophage surface Fc receptors [2, 3]. Using high-performance liquid chromatography (HPLC), Parekh et al. [4] showed that serum IgG oligosaccharide chains lacking galactose (G1a) (agalactosyl IgG oligosaccharide) are frequently found in the serum of rheumatoid arthritis (RA) patients. It is hypothesized that agalactosyl IgG oligosaccharide activates the complement system via mannose-binding protein, contributing to the pathogene-

sis of RA [5]. Earlier studies indicated that the increase of agalactosyl IgG oligosaccharide was a change peculiar to RA, but it has now also been found in Crohn's disease, tuberculosis and ankylosing spondylitis [6, 7]. Furthermore, it was reported that agalactosyl IgG oligosaccharide also increases in monoclonal IgG of advanced multiple myeloma (stage II, III) or polyclonal-IgG of Castleman's disease [8, 9].

HPLC was used as a conventional analytical method for assessing protein-binding sugar chains, but the simple novel fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) method was recently employed for analyzing IgA-binding oligosaccharide chains [10]. However, there are no reports on the relationship between tumor progression and changes of serum IgG oligosaccharide chain structure as assessed by FACE in cancer patients. Therefore, in the present study, we analyzed the serum IgG oligosaccharide chain structure of lung and gastric cancer patients, and evaluated the relationship between progression of these cancers and changes of such structures.

Materials and Methods

Patient Characteristics

Untreated serum samples were obtained from 22 cancer patients diagnosed at the Kitasato University Hospital. Ten patients had lung cancer (6 adenocarcinomas and 4 squamous cell carcinomas; localized: 5 cases, metastatic: 5 cases) and 12 patients had gastric cancer (localized: 6, metastatic: 6; mean age 66.8 years, range 56–78). Ten healthy men were enrolled as controls (mean age 62.6 years, range 52–70). We obtained informed consent from all subjects for this study. The methods are as outlined in one of our previous reports [11].

Purification of Serum IgG

Serum (300–500 μ l) was diluted 4-fold with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) and applied to a Protein G column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). After washing the column with 5 ml of 0.01 M phosphate buffer, protein was eluted with 3 ml of 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 3.0) and 0.5 ml of 1 M Tris-HCl (pH 9.0) was applied. The protein was dialyzed against distilled water for 48 h using a dialysis membrane (Sanko Junyaku, Tokyo, Japan) and lyophilized. The purity of IgG was confirmed by immunoelectrophoresis using anti-human whole serum antibody and anti-human serum IgG antibody.

Release of N-Linked Oligosaccharide Chains from Serum IgG

Purified IgG (250 μ g) was dissolved in 25 μ l of distilled water, and 25 μ l of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), 1 μ l of 5% SDS and 1.5 μ l of 1.44 M 2-mercaptoethanol were added. The mixture was heated at 100°C for 5 min, and then treated with 2.5 ml of 7.5% Nonidet P-40 and 2 μ l of recombinant peptide N-glycosidase F (PNGase F, EC 3.5.1.52, Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan) at 37°C for 2 h. Subsequently, anhydrous ethanol (171 μ l) was added and

cooled for 10 min. After centrifugation of the mixture at 15,000 rpm for 5 min at 4°C, the supernatant containing the released oligosaccharides was evaporated to dryness and recovered.

Fluorescence Labelling of N-Linked Oligosaccharide Chains from Serum IgG

Five microliters of 0.15 M 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonate (ANTS) in 15% acetic acid and 5 μ l of 1.0 M sodium cyanoborohydride in 1.0 M dimethyl sulfoxide were added to the oligosaccharides in the residue, and the mixture was incubated at 37°C for 16 h.

Electrophoresis and Imaging Analysis

The ANTS-labelled oligosaccharides were separated by electrophoresis (SDS-PAGE) on a FACE-N-linked-oligosaccharide gel (Glyko, Novato, Calif., USA) at a constant current of 15 mA for 90 min. After the termination of electrophoresis, the gel was imaged with a FACE Imager scanner (Glyko), and the fluorescent fraction (Fr) patterns were analyzed in five fractions by FACE Imaging Software version 2.47 (Glyko). Oligo Ladder standard (Glyko), containing ANTS-labeled glucose polymers composed of 1–20 glucose residues, was applied to the gel as the marker. The determination of each Fr band was calculated compared with a standard degree of polymerization of G4, composed of 4 glucose residues, and is shown as a percentage.

Statistical Analysis

The gel images were extracted from the FACE imaging software into Adobe PhotoShop version 5.5 after converting them to PICT files. The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Serum IgG Oligosaccharide Chains of Healthy Controls

Serum IgG oligosaccharide chains of healthy controls were separated into five fractions, designated Fr 1–5 from the cathode side (fig. 1). The most abundant fraction according to the degree of polymerization value was Fr 2 (34.9%) followed by Fr 1 (23.2%), Fr 3 (22.7%), Fr 4 (11.6%) and finally Fr 5 (7.8%).

Sugar Chain Structures of the Respective Fractions

Figure 2 shows the sugar chain structures of the respective fractions.

Serum IgG Oligosaccharide Chains of Lung and Gastric Cancer Patients

Serum IgG oligosaccharide chains of lung and gastric cancer patients were separated into these five fractions as in the healthy controls. In lung cancer patients, Fr 1, 2 and 3 had a tendency to be decreased and Fr 4 significantly increased ($p < 0.01$ – 0.05) with lung cancer tumor progression. Fr 5 increased in localized lung cancer compared to