

なかった。

3. 胎児心筋組織検討症例の染色結果を表2に示す。SS-A (52KD) 抗体は、16週から25週まで4例で陽性となった。16週と21週の症例では強い陽性所見を示した。29週から40週の4例は陰性であった。16、21、25週の心筋の染色結果を図5、6、7に示す。心筋全体に陽性であるが、局所的により強い陽性部分があり、SS-A (60KD) が瀰漫性に染色される傾向と異なっていた。心筋陰性症例(29週)を図8に示す。心筋以外に他の臓器でも陽性を示した。副次的に得られたもので、すべての週数での検討はできていないが、肺では肺胞上皮が30週症例で陽性であり、膵臓で腺組織が21週症例で陽性となった。

SS-A (60KD) 抗体では、16週の1例と21週の例で陽性となった。16週の他の1例と29週、30週の例は擬陽性〜弱陽性であった。症例4の染色結果を図9に示す。16週の症例1を図10に示す。心筋で陽性の症例では、SS-A (60KD) 抗体で他の臓器でも陽性を示した。肺では肺胞上皮、膵臓で腺組織、消化管では腺上皮が染色され(図11)、子宮内膜、卵巣で卵胞上皮なども陽性であった(図12)。25週症例では陰性で、29週、30週症例では、擬陽性〜弱陽性であった。満期の2例においては、全く染色されなかった。

SS-A (52KD) と SS-A (60KD) を比較すると、消化管では腺上皮が21週症例で染色され、この所見は昨年 SS-A (60KD) 抗体の結果と同じであったが、消化管の神経叢においては、21週症例

において、SS-A (52KD) 抗体は強陽性であったが、SS-A (60KD) 抗体は陰性であった(図13)。また、16週症例においては、SS-A (52KD) 抗体は腺上皮、神経叢ともに陽性であったが、SS-A (60KD) 抗体は陰性であった(図14)。

SS-A (52KD) 抗体優位の患者血清と、SS-A (60KD) 抗体優位の患者血清を用いた各週数の心筋組織の発現結果ではいずれも疑陽性のパターンであり、それぞれに有意な差異を認めなかった。

D. 考察

先天性房室ブロックは、SS-A、SS-B 抗体陽性者の2-5%に発生するといわれている。胎児及び小児の死亡例における心臓病理の解析ではまとまった報告が少ない。

当科において、SS-A 抗体にとりまされた先天性完全房室ブロックの剖検例で心臓病理の詳細な検索を行った。剖検例の5例については、心臓病理の詳細な検索を行った。妊娠中期においても同様の病変が房室結節に存在することが確認された。Piercecchi-Marti らも29週の胎児死亡例において同様の所見を報告している。房室結節の病変に加えて、線維弾性症の所見も全例に認められた。心筋障害の可能性も強く疑われる。これまで心筋障害は、ペースメーカーなどによる二次的な障害とも考えられてきたが、我々の症例は、胎児・新生児を多く含んでおり、心筋に対して一次性の障害もあることを疑わせる。心筋の免疫組織学的な検討でIgGの広汎な沈着が心筋に見られた。これも移行抗体が心筋に障害を起こ

している可能性を示唆する。IgG 以外に IgA の沈着も心筋に認められた。IgA は移行抗体とは考えられないので、別の機序も関与している可能性もあるが、不明である。

次いで、母体合併症のない胎児心筋において SS-A 抗体に反応する物質が胎児の心筋等に存在するかの検討を行い、保存パラフィン切片において胎児中期の心筋細胞は SSA (52KD) SSA (60KD) とともに発現が見られた。初期 (16 週未満) の症例で検討できなかったため、初期の心筋細胞において Ro/SSA 発現の有無は未定であるが、妊娠中期に反応する物質が発現しそれが後期になると消失していた。SSA (52KD) は SSA (60KD) よりも、心筋内においても局在性が強く、刺激伝導系の一部 (?) が染色されているような所見も見られた。また、抗体価の異なる患者血清でも検討したが、全体に非特異的な所見が強く、この方法では、有意な結果を見出せなかった。

中期では、肺・消化管・生殖器など多くの組織でも SSA (52KD) を発現していた。心筋以外でも特に腺組織に発現が強かった。他の臓器障害の可能性も示唆される。興味ある所見として、消化管の神経叢においては、SS-A (52KD) 抗体は強陽性であったが、SS-A (60KD) 抗体は陰性であった。神経組織に対しては、SS-A (52KD) の親和性があり、刺激伝導系においても異なる作用を示す可能性も考えられる。

今後の検討課題としては

1) 伝導系(房室結節)の細胞に関しては、prospective な検討が必要である。

2) 16 週未満の症例に関しては、症例の蓄積とともに検討が必要である。

3) Western blot や ISH など免疫染色以外の抗原検索。

E. 結論

死亡・死産の全例で、刺激伝導系の検索を行ったが、全ての例で、房室結節の組織は広汎な刺激伝導系組織の変性・壊死・線維性変化を来していた。心内膜では線維弾性症の所見が顕著であった。死産例においても胎生 28 週にもかかわらず、同様に広汎な変性・壊死が認められた。

胎盤の病理所見と SS-A(52KB, 60KB) との関連において、胎盤の血栓症と 60KD の値に有意な相関が認められた。

SS-A 抗体に反応する物質が胎児の心筋等に存在するかの検討を行った。結果は、SS-A (52KD) 抗体に反応する抗原が妊娠中期をピークとして発現していた。今回の検討で SS-A (52KD) 抗体が心筋と反応し、SS-A (60KD) 抗体とともにその後の心筋障害の基礎となるデータが確認できた。

F. 文献

1) Wahren-Herlenius M, Sonesson SE. Specificity and effector mechanisms of autoantibodies in congenital heart block. *Curr Opin Immunol* 2006;18:690-6

2) Boutjdir M, Chen L, Zhang Z-H et al Arrhythmogeneity of IgG and anti52-KD SSA/Ro affinity-purified antibodies from mothers of children with congenital heart block. *Circ Res* 1997;80:354-3623.

- 3) Piercecchi-Marti MD, Mohamed H, Chau C, et al Congenital atrio-ventricular block : histological aspect Forensic Sci Int 2003 ; 136 : 12-15
 - 4) Iida M, Inamura N, Takeuchi M. Newborn infant with maternal anti-SSA antibody-induced complete heart block accompanying cardiomyopathy. Circulation Journal 2006;70:147-149
 - 5) 中山雅弘、藤田富雄. 抗リン脂質症候群と胎盤病理所見. 産婦人科の実際 2005; 54: 593-599
 - 6) Reed JH, Neufing PJ, Jackson MW, et al Different temporal expression of immunodominant Ro60/60kDa-SSA and La/SSB apotopes. Clin Exp Immunol 2007 ; 148 : 153-160
- G. 研究発表
- 1) 論文発表
 1. Hosokawa S, Takahashi N, Kitajima H, Nakayama M, Kosaki K, Okamoto N. Brachmann-de Lange syndrome with congenital diaphragm hernia and NIPBL gene mutation Congenital Anomalies 2010; 50: 2 129～132
 2. Namba F, Hasegawa T, Nakayama M, Hamanaka T, Yamashita T, Nakahira K, Kimoto A, Nozaki M, Nishihara M, Mimura K, Yamada M, Kitajima H, Suehara N, Yanagihara I. Placental Features of Chorioamnionitis Colonized With Ureaplasma Species in Preterm Delivery. Pediatric Research 2010; 67:166～172
 3. Ito Y, Goldschmeding R, Kasuga H, Claessen N, Nakayama M, Yuzawa Y, Sawai A, Matsuo S, Weening J, Aten J. Expression patterns of connective tissue growth factor and of TGF- β isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis. Am J Physiol Renal Physiol 2010; 299: 545～558
 4. 中山雅弘. 乳幼児突然死症例・診断の手引き 周産期医学 2010; 40: 505～509
 5. 中山雅弘. 胎盤の組織学的所見 周産期医学 2010; 40: 1007～1013
 6. Baba S, Noda H, Nakayama M, Waguri M, Mitsuda N, Iso H. Risk factors of early spontaneous abortions among Japanese: a matched case-control study Human Reproduction 2011; 26: 466～472
 7. Kanayama N, Inori J, Ishibashi-Ueda H, Takeuchi M, Nakayama M, Kimura S, Matsuda Y, Yoshimatsu J. Maternal death analysis from the Japanese autopsy registry for recent 16years: significance of amniotic fluid embolism Obstetrics and Gynaecology Research 2011; 37: 58～63
 8. Ohata Y, Arahori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, Michigami T, Imura A, Nabeshima Y, Yamazaki Y, Ozono K. Circulating Levels of Soluble α -Klotho Are Markedly Elevated in Human Umbilical Cord Blood J Clin

- Endocrinol Metab 2001; 96: E943～E947
9. 中山雅弘、木本哲人、植田初江. 羊水塞栓症における肺・子宮での組織および免疫組織学的検討 産科と婦人科 2011; 78: 178～185
 10. 宮野章、中山雅弘. 妊婦における抗 SS-A60-kDa avidity 抗体に関する研究 臨床病理 2011; 59: 219～225
 11. 宮野章、江口政志、中山雅弘. EVOLIS による NIL-2R 測定試薬の検討 医学検査 2011; 60: 762～766
 12. 中山雅弘、桑江優子、松岡圭子. 胎盤病理からみた FGR, IUFD 産科と婦人科 2011; 78: 664～670
 13. Ishida H, Kogaki S, Ichimori H, Narita J, Nawa N, Ueno T, Takahashi K, Kayatani F, Kishimoto H, Nakayama M, Sawa Y, Beghetti M, Ozono K. Overexpression of endothelin-1 and endothelin receptors in the pulmonary arteries of failed Fontan patients International Journal of Cardiology 2012
 14. 宮野章、中山雅弘、新井次郎、山口晃史、村島温子. 酵素免疫測定法による抗 SS-A/B 抗体標準化の検討. 臨床リウマチ 2012 ; 24 : 247～259
 15. Shigeta N, Ozaki K, Hori K, Ito K, Nakayama M, Nakahira K, Yanagihara I. An Arthrobacter spp. Bacteremia Leading to Fetal Death and Maternal Disseminated Intravascular Coagulation. Fetal and Pediatric Pathology 2013 ; 32 : 25～31
- 2) 学会発表
1. 中山雅弘. 「SGA の胎児・胎盤病理」 nordiscience forum 2010 Program & Abstracts 2010.6.5 京都市 教育講演
 2. 味村和哉、藤田富雄、中山雅弘、光田信明、柳原格. 「当センターにおける原因不明不育症患者の 1st trimester 流産検体における病理学的所見の分類」 第 46 回日本周産期・新生児学会 総会および学術集会 2010.7.11～13 神戸市
 3. 藤田太輔、藤田富雄、中山雅弘、湯口裕子、荘園へキ子、榎原敬二郎、山下能毅、亀谷英樹、大道正英. 「初期絨毛病理所見で Massive Intervillous Fibrin Deposition を繰り返す原因不明不育症」 第 46 回日本周産期・新生児学会 総会および学術集会 2010.7.11～13 神戸市
 4. 馬場幸子、中山雅弘、藤田富雄、末原則幸. 「不育症リスク要因に関する疫学研究」 第 46 回日本周産期・新生児学会 総会および学術集会 2010.7.11～13 神戸市
 5. 大幡泰久、大藪恵一、山崎美和、岡田知子、中山雅弘、平井治彦、道上敏美. 「合胞体栄養膜層は Klotho と FGFR1 を共発現しており、FGF23 シグナルを受容する」 第 18 回日本胎盤学会学術集会・第 28 回日本絨毛性疾患研究会 2010.9.30～

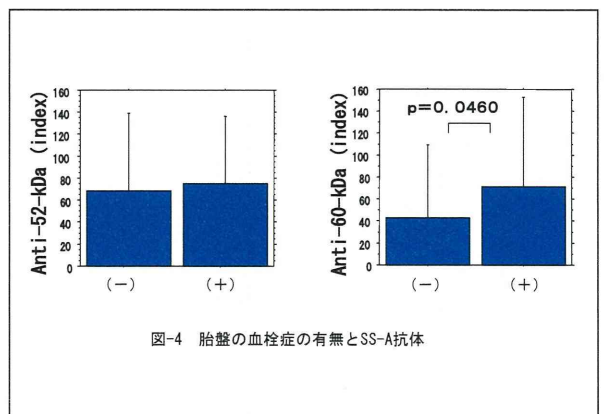
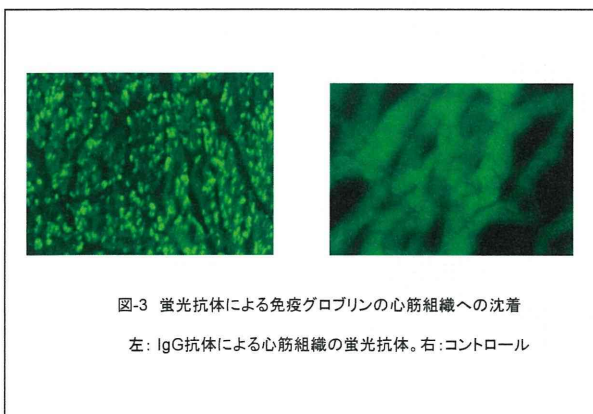
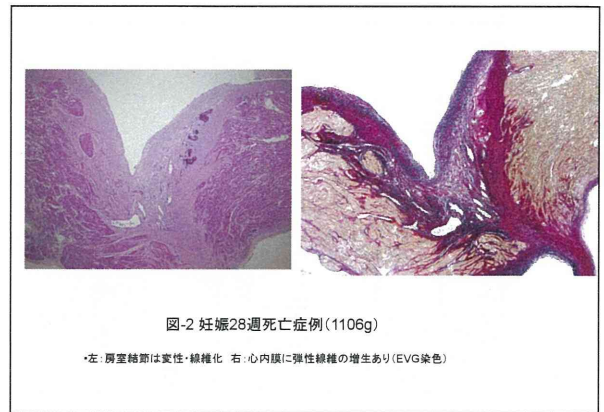
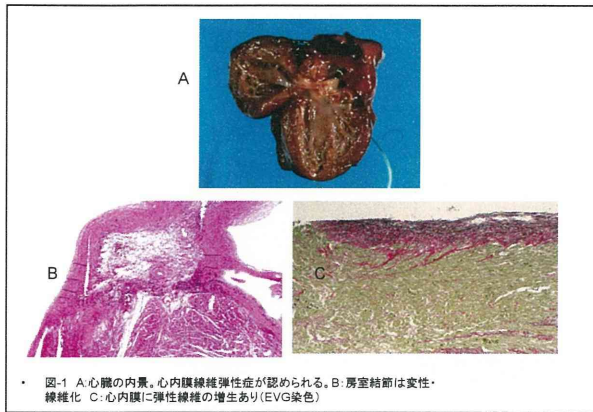
- 10.1 熊本市 一般演題
6. 河野通晴、三浦清徳、山崎健太郎、中山大介、吉浦孝一郎、中山雅弘、増崎秀明. 「Placental mesenchymal dysplasia の一例」 第 18 回日本胎盤学会学術集会・第 28 回日本絨毛性疾患研究会 2010.9.30～10.1 熊本市 ワークショップ
 7. 中山雅弘、桑江優子、松岡圭子、白石淳、北島博之. 「新生児慢性肺疾患と胎盤病理 —CLD 分類再評価のために—」 第 55 回日本未熟児新生児学会・学術集会 2010.11.5～7 神戸市 シンポジウム
 8. 若狭朋子、新宅雅幸、中山雅弘. 子宮型羊水塞栓症における胎児成分検出法の特異性についての検討 第 100 回日本病理学会 2011.4.28～30 横浜市
 9. 中山雅弘、橘真紀子、松岡圭子、桑江優子. IUGR と胎盤病理 第 11 回新生児栄養フォーラム 2011.6.25～26 千里市 シンポジウム
 10. 中山雅弘、松岡圭子. 染色体異常症の胎児死亡例の解析 —NT、hygroma の病理・発生— 第 51 回日本先天異常学会学術集会 2011.7.22～24 東京都 シンポジウム
 11. 宮野章、中山雅弘. 児に房室ブロックを伴った母親における 52-kDa SSA/Ro p200 peptide に対する免疫反応 第 58 回日本臨床検査学会学術集会 2001.11.17～20 岡山市
 12. Iwata M、Nakayama M、Waguri M、Mitsuda N、Yanagihara I、Fujita T、Nakanishi I. Massive intervillous fibrin deposition in women with recurrent pregnancy loss. IFPA 2012 Hiroshima Meeting (第 20 回日本胎盤学会学術集会合同開催) 2012.9.18～21 広島市
- H. 知的所有権の取得状況
なし

表-1 当センターの先天性A-Vブロック症例

No.	GA of DX (week)	Hydrops	Treatment during fetus	anti SSA antibody(index)	anti 52kd-SSA antibody(index)	anti 60kd-SSA antibody(index)	Follow up	Speciemen	Prognosis
1	18	-	nd	58.5	180.3	11.6	24yr	nd	alive
2	35	-	nd	651.8	200	36.2	24yr	nd	alive
3	36	-	nd	256	200	200	22yr	nd	alive
4	25	-	nd	32	145.6	21.2	15yr	nd	alive
5	22	-	nd	8	74	3.6	11yr	nd	alive
6	31	-	nd	16	140.1	57.9	8yr	INVM	alive
7	23	+	steroid/ β	32	49.7	65.4	3yr	nd	alive
8	37	+	steroid	256	200	200	15yr	EFE	death(15 years old)
9	20	+	steroid	256	200	200	2yr	EFE	death(2 years old)
10	22	+	nd	256	200	200	5d	EFE	death(neonatal)
11	21	+	nd	8	166.6	20.1	1d	EFE	death(neonatal)
12	18	+	steroid/ β	64	152.8	130.1	-	EFE	IJFD

表2 SS-A 52KD、60KD結果

症例番号	週数(w)	体重(g)	診断	SSA-A(52) 心筋	SS-A(52) その他	SS-A(60) 心筋	SS-A(60) その他
A-07-29	16	76	無頭蓋症	未	肝(未) 脾(未)	+	肝(++) 脾(+)
A-09-06	16	121	中絶	++	腎(+) 副腎(+) 腸(-),神経叢(+) 卵巢(+)	±	腎(+) 副腎(±) 腸粘膜,神経叢(-) 卵巢(-)~(±)
A-09-02	19	310	単心室	+	未	+	未
A-09-45	21	338	骨奇形	++	肺(-) 脾(+) 消化管 上皮(+) 消化管 神経叢(+) 子宮(未) 卵巢(未)	++	肺(+) 脾(++) 消化管 上皮(+) 消化管 神経叢(-) 子宮(+++) 卵巢(++)
A-06-12	25	348	PIH 中絶	+	肺(未)	-	肺(-)
A-09-41	29	320	IUGR PIH	-	肺(-) 胸腺(-)	±	肺(+) 胸腺(+)
A-09-53	30	504	Potter IUGR	-	肺(+) 細気管支(++)	±	肺(+)
A-06-08	38	3108	IUFD	-	肺(-)	-	肺(-)
A-07-52	39	2386	肺動脈閉鎖	-	肺(-)	-	肺(-)



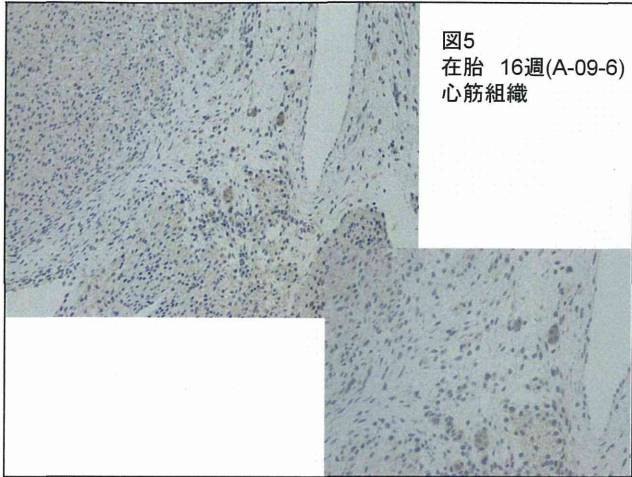


圖5
在胎 16週(A-09-6)
心筋組織

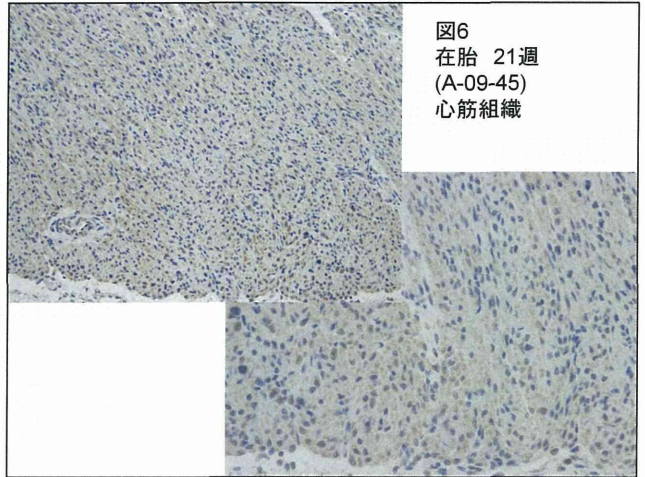


圖6
在胎 21週
(A-09-45)
心筋組織

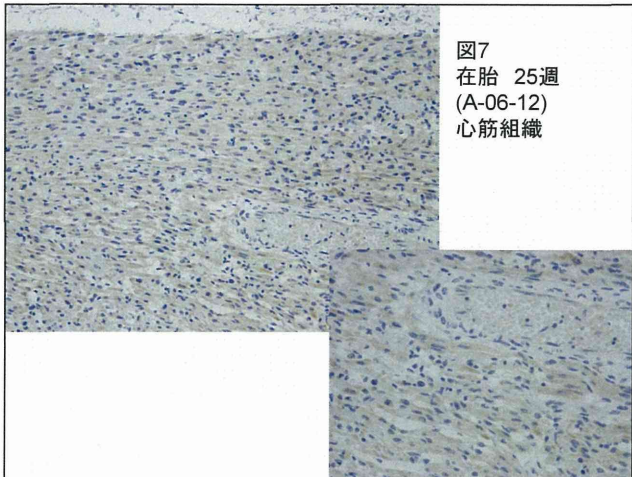


圖7
在胎 25週
(A-06-12)
心筋組織

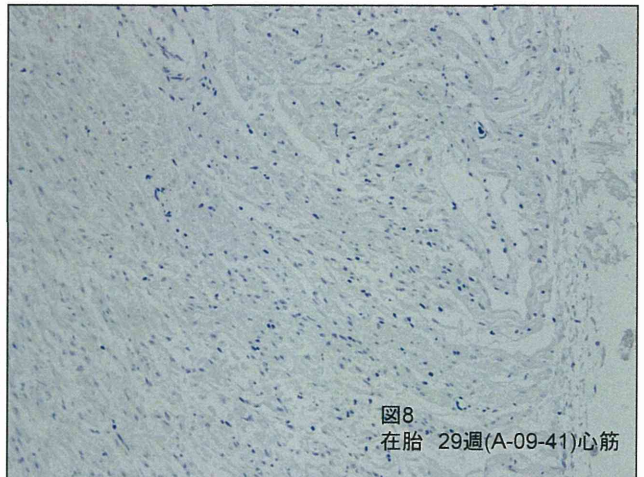
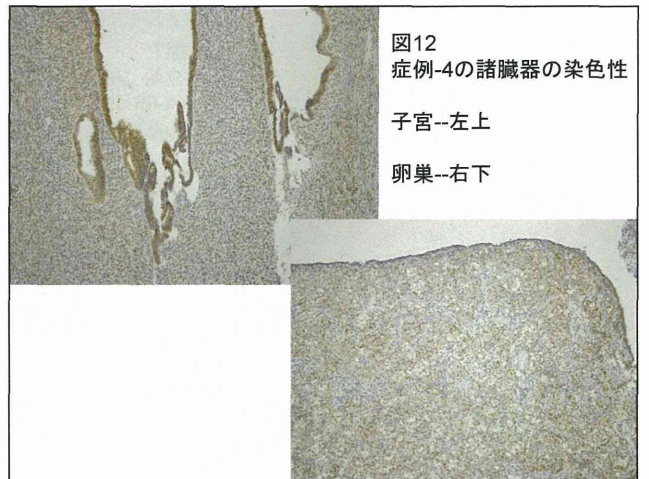
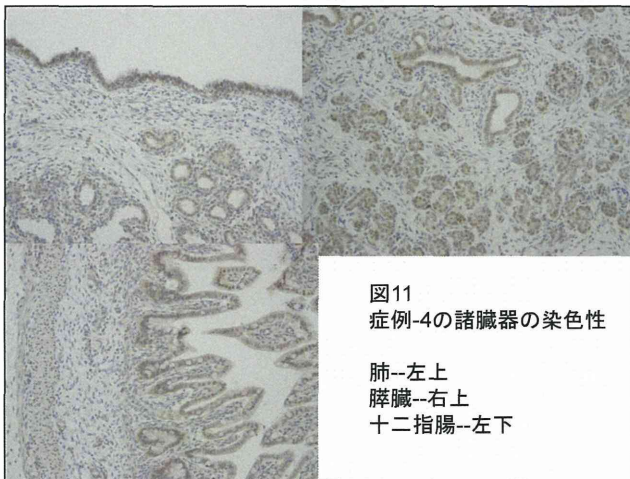
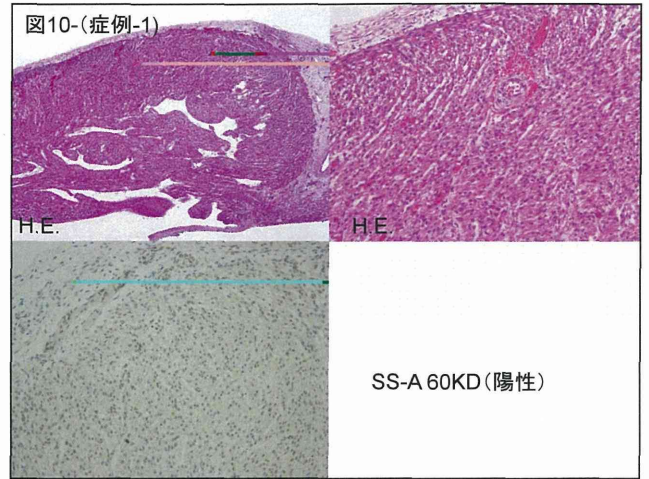
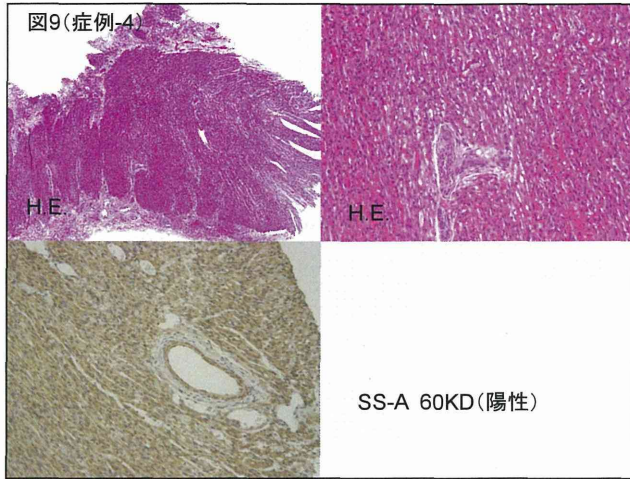


圖8
在胎 29週(A-09-41)心筋



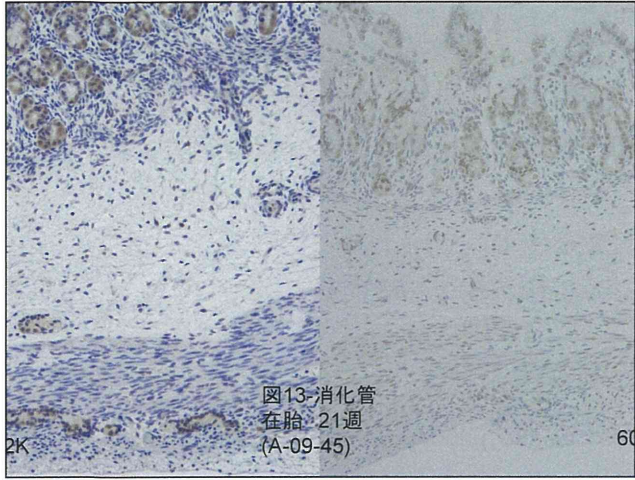
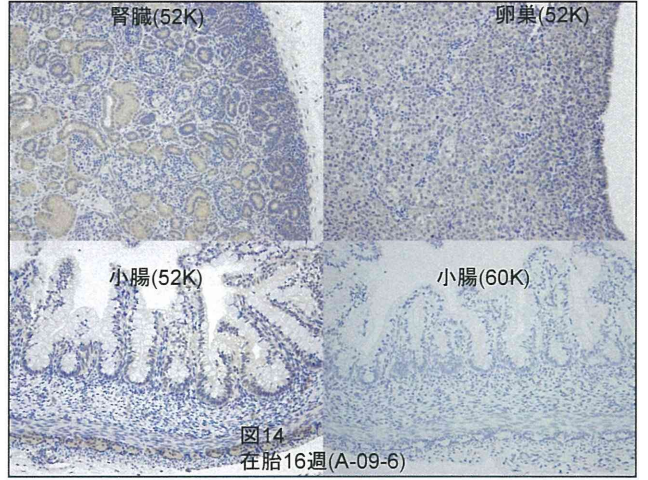


圖13-消化管
在胎 21週
(A-09-45)



児に房室ブロックを伴った母親における 52-kDa SSA/Ro p200 peptide に対する免疫反応に関する研究ならびに酵素免疫測定法による抗 SS-A/B 抗体標準化の検討

研究協力者 宮野 章 大阪府立母子保健総合医療センター検査科主査
研究分担者 中山 雅弘 同部長
山口 晃史 国立成育医療研究センター
母性医療診療部膠原病・一般内科 医長

研究要旨

児に房室ブロックを伴った母親における 52-kDa SSA/Ro p200 peptide に対する免疫反応に関する研究については、妊娠帰結の明らかな 77 例の女性について、抗 SS-A 52-kDa、抗 SS-A 52-kDa p200 peptide、抗 SS-A 60-kDa 抗体価ならびに 8M 尿素を用い avidity を測定した。その結果母親の抗 52-kDa p200 抗体を測定することにより児の房室ブロックを予測するマーカーとして利用できる可能性があることがわかった。

酵素免疫測定法による抗 SS-A/B 抗体標準化の検討については、現在日本国内での抗 SS-A 抗体及び抗 SS-B 抗体の測定は、ほとんどが酵素免疫測定法を原理とする検査試薬で行われており、数値データとして報告されている。しかし、その値は試薬メーカーごとに値付け方法が異なり、標準化されていない。抗 SS-A 抗体と関連する CHB (congenital heart block) のリスクをその抗体価から推測することを目的として、試薬メーカー 6 社 7 試薬の測定値の関係を明らかにし、一定の基準を設けることで各試薬の測定値を一致させることができるか検討した。Pool 血清、CDC 標準品、臨床検体を用いて酵素免疫測定法による抗 SS-A/B 抗体の標準化を試みたが現状では難しいことがわかった。多施設共同研究の症例データベースの解析から、抗 SS-A 抗体が DID (double immunodiffusion) 法で 32 倍以上であることが、CHB のリスクを推測する因子として抽出されているため、DID 法力価 32 倍に相当する各試薬の測定値を推定した。しかし、この推定値において陰性と判定される CHB 例が認められたこと、また、酵素免疫測定法は主な臨床での使用目的が「定性判定」であるため、各社試薬での測定値が本来の抗体力価として報告されていないことが多い（特に高力価例について）現状を考え、DID 法での確認が必要な基準案を作成した。その結果、Bio-Rad で 100 EU 以上、INOVA で 80 units 以上、Cosmic で Index 値 100 以上、TFB で 300 U/ml 以上、Phadia で 240 U/ml 以上、MBL MESACUP で Index 値 100 以上、MBL STACIA で 500 U/ml 以上を示した検体については DID 法での確認が必要であることがわかった。

I. 児に房室ブロックを伴った母親における 52-kDa SSA/Ro p200 peptide に対する免疫反応に関する研究

A. 研究目的

新生児エリテマトーデス (NLE) は、胎盤移行抗体により、新生児の皮膚に出現する紅斑、または先天性房室ブロックを主症状とする比較的まれな疾患であり、抗 SS-A/Ro 抗体が NLE の診断の血清学的マーカーとして重要視されている。近年このアイソフォームである、52-kDa と 60-kDa に対する抗体のみを測定する試薬が開発されその有用性が検討されている。しかし、これらの抗体を持つ母親から生まれた子供が必ずしも NLE になるわけではない。

52-kDa はタンパク質、またはこれをコードする遺伝子のシンボルである。p200 は 52-kDa を構成するサブユニットのひとつと考えられる。p200 のアミノ酸部位 200-239 (40a. a.) を抗原とする抗体についての論文があり、房室ブロックが重症なほどこの抗体価が高いという報告がある。そこで今回 52-kDa p200 抗体価の有用性を検討した。また、8M 尿素を用い抗体の質 (avidity) を調べた。

B. 研究方法

1. 患者血清

大阪府立母子保健総合医療センターに 52-kDa と 60-kDa に対する抗体の依頼のあった妊娠婦結の明らかな 77 例の女性を対象とした。

2. 52-kDa p200 peptide enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

52-kDa p200 peptide はヒト Ro52 の p200 のアミノ酸部位 200-239 (40a. a.) を Thermo Biosciences にてペプチドを合成した (日本代理店: グライナー・ジャパン)。

52-kDa p200 peptide が 0.1~0.2 μ g 含む炭酸 Buffer 100 μ l を各ウェルに分注し ELISA 法にて測定した。

3. 52-kDa と 60-kDa ELISA 測定法

組み替え蛋白を用いた ELISA キットである、「MESACUP 52K SS-A/Ro と 60K SS-A/Ro」(MBL) により血清を用い測定した。基準値は抗 52-kDa 抗体価が index 値 5.1 以下、抗 60-kDa 抗体価が index 値 5.9 以下である。

4. SSA 抗体価の測定

SSA 抗体価は double immunodiffusion (DID) 法「ENA スクリーニング テスト」(MBL) によった。

5. avidity index (AI) の測定

通常の抗 52-kDa 抗体価と抗 60-kDa 抗体価測定操作に avidity 試薬の反応ステップが加わる。すなわち、固相抗原と抗体の反応が終了した後、8M 尿素を含んだ洗浄液を反応させる。8M 尿素を含んだ洗浄液のかわりに洗浄液を用いた試薬を対照として AI を求めた。

検体の同時再現性は $n=7$, $mean=87.5\%$ の検体において、 $SD=13.5$, $CV=15.9\%$ であった。

6. 統計解析

Mann-Whitney' s U Test を用い、危険率 5% 以下を有意差ありとした。

C. 研究結果

図 1 に、52-kDa と 52-kDa p200 の抗体価の相関関係を示した。房室ブロック陽性群は陰性群に比べて、52-kDa p200 抗体価の傾きが高い (1.084 対 2.511)。両群とも正の相関関係を認めた ($r=0.695$ と $r=0.732$)。陽性群では 60-kDa は 50index 付近から房室ブロックを起こしているが、52-kDa p200 は 1.3index と比較的低い値から房室ブロックを起こしている。低値を示す 3 例の内訳は、1.3index が 2 例あり、残りの 1 例は 6.3index を示した。

図 2 に、60-kDa と 52-kDa p200 の抗体価の相関関係を示した。先ほどと同じく房室ブロック陽性群は陰性群に比べて、52-kDa p200 抗体価の傾きが少しだけ高い (0.839 対 0.876)。両群とも正の相関関係を認めた ($r=0.574$ と $r=0.438$) が、陰性群では有意差が認められたが ($p<0.0001$)、陽性群では有意差が認められなかった ($p=0.0607$)。

房室ブロックを伴った児を出産した女性の各抗体価は伴わなかった例に比べて有意に高値であった (図 3)。その有意差は 60-kDa ($p=0.0334$)、52-kDa ($p=0.0010$)、52-kDa p200 ($p=0.0002$) の順に低く、52-kDa p200 が一番低い結果であった。

表 1 に各測定値の房室ブロックでの感度、特異度、陽性適中率と陰性適中率を示した。感度は 52-kDa、52-kDa p200 共に 100%であったが、60-kDa は 89.5%であった。特異度は 60-kDa (34.5%)、52-kDa (27.6%)、52-kDa p200 (22.4%) の順に低かった。

図 4 に、房室ブロックにおける Ro52, Ro60, Ro52 p200 抗体の ROC 曲線を示した。AUC (area under the ROC curve) はそれ

ぞれ 0.753, 0.663, 0.789 であり、Ro52 p200 抗体が一番高かった。

図 5 に、52-kDa p200 の抗体価と AI の関係を示した。AI は理論上 100%を超えることがないが房室ブロック陰性群で 200%位まで分布が広がっている。これは抗体価が低いところでは、本来対照の吸光度の方が高値を示すが 8M 尿素の吸光度の方が高値を示したものが含まれるためである。そのためもあり、房室ブロック陽性群は陰性群に比べて有意に低値であった ($p=0.0038$)。房室ブロック陽性群において 52-kDa p200 が低かった 3 例の AI は高値であったが、これら以外は低値を示した。

D. 考察

52-kDa p200 peptide で免疫されたネズミにおいて出てくる抗体は、IgG1 は少なく、IgG2 がほとんどであったと報告されている。avidity は主に IgG1 を捕らえると考えられるため、房室ブロック陽性群は陰性群に比べて有意に低値であった可能性がある。

52-kDa p200 peptide で免疫されたネズミにおいて生まれる子が房室ブロックを生じたという報告がある。したがって、この抗体価の臨床的意義は高い可能性がある。今回は 52-kDa p200 peptide ELISA プレートを作成しての測定であったが、「WIESLAB SS-A p200 kit」(Euro-Diagnostica USA) が市販されているようである。

52-kDa p200 peptide 抗体価が陰性でも房室ブロックが起こるとい報告がある。今回、3 例において房室ブロックを起こしているにもかかわらず抗体価が低値を示

した。房室ブロック陽性例においてこの3例以外のAIは低値であったことから、52-kDa p200 peptideに対する抗体力価はかなり少ないものと思われる。今後、症例が増えるに従い、房室ブロック陽性例であるにもかかわらず52-kDa p200 peptideに対する抗体が検出されない例が出てくる可能性がある。今後の検討が望まれる。

E. 結論

母親の抗52-kDa p200抗体を測定することにより児の房室ブロックを予測するマーカーとして利用できる可能性がある。

II. 酵素免疫測定法による抗SS-A/B抗体標準化の検討

A. 研究目的

抗SS-A抗体は全身性エリテマトーデス(SLE)やシェーグレン症候群(SJS)の患者が保有しているばかりでなく、無症候女性の1%が本抗体を保有する。抗SS-A抗体陽性母体から出生した児に皮疹や血球減少、心ブロック(CHB)がみられることがあり、これらを新生児ループスと呼んでいる。特に抗SS-A抗体陽性妊娠例の1%前後に出現すると考えられているCHBは生涯ペースメーカー装着となる場合が多く、死亡にいたる症例もある重篤な病態である。

このたび、母体の抗SS-A抗体が胎児へ移行して引き起こされる新生児ループス、特にCHBの実態を明らかにし、妊娠管理指針を作成することを目的に全国症例調査が行われた。その解析において抗SS-A抗体の抗体価がDID法で32倍以上であることが、CHBのリスクを推測する因子として

抽出された。しかし最近の臨床現場では、抗SS-A抗体及び抗SS-B抗体は酵素免疫測定法(ELISA)を原理とする検査試薬で測定される傾向にあり、本法による測定結果を用いてリスク評価をする必要があると考えた。ところが、ELISA測定用のキットは複数の試薬メーカーが製造しているため、多施設共同研究で各施設から報告された測定値はそのままでは集計・解析ができないことが判明した。そこで、試薬メーカー6社7試薬の測定値の関係を明らかにし、一定の基準を設けることで各試薬の測定値を一致させることができるか検討した。

この研究では、試薬メーカー6社(Bio-Rad、INOVA、Cosmic、TFB、Phadia、MBL)を含め標準化委員会を組織し、7試薬の測定値の関係を明らかにし、一定の基準を設けることで各試薬の測定値を一致させることができるか検討した。また、多施設共同研究の症例データベースの解析から、抗SS-A抗体がDID法で32倍以上であることが、CHB(congenital heart block)を推測する因子として抽出されているため、DID法力価32倍に相当する各試薬の測定値を算出することを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象

1) 標準化委員会

大阪府立母子保健総合医療センター、国立成育医療研究センター、バイオ・ラッドラボラトリーズ(Bio-Rad、東京)、アイ・エル・ジャパン(INOVA、東京)、コスミックコーポレーション(Cosmic、東京)、ティエフビー(TFB、東京)、ファディア(Phadia、東京)、医学生物学研究所(MBL、

名古屋)で標準化委員会を組織し研究を遂行した。

2) Pool 血清

各施設の倫理委員会承認のもとに国立成育医療研究センター及び順天堂大学からの -30°C 以下で保存された患者血清 49 例を、MBL の試薬を用いて抗 SS-A/B 抗体 (DID 法と ELISA 法)、抗 Ro52, 抗 Ro60 抗体 (ELISA 法) を測定後、その結果から以下の Pool 血清を分類・作製した。

① 抗 SS-A 抗体 (抗 Ro52, 抗 Ro60 抗体を含む)

SS-A No. 1 : 抗 SS-A 抗体陽性 (DID 法で 1~64 倍)、抗 SS-B 抗体陰性かつ、抗 Ro52 抗体陰性または弱陽性の 9 例。

SS-A No. 2 : 抗 SS-A 抗体陽性 (DID 法で 16~512 倍)、抗 SS-B 抗体陰性かつ、抗 Ro52 抗体陽性の 20 例。

SS-A No. 3 : 抗 SS-A 抗体陽性 (DID 法で 32~128 倍)、抗 SS-B 抗体陽性かつ、抗 Ro52 抗体陽性の 5 例。

SS-A No. 1 と 2 の血清は国立成育医療研究センターから、No. 3 は順天堂大学から分与された。

② 抗 SS-B 抗体

SS-B No. 1 : 抗 SS-A 抗体陽性、抗 SS-B 抗体陽性 (DID 法 32~256 倍) かつ、抗 Ro52 抗体陽性の 5 例。

SS-B No. 2 : 抗 SS-A 抗体陽性、抗 SS-B 抗体陽性 (DID 法 32~64 倍) かつ、抗 Ro52 抗体陽性の 5 例。

SS-B No. 3 : 抗 SS-A 抗体陽性、抗 SS-B 抗体陽性 (DID 法 64 倍) かつ、抗 Ro52 抗

体陽性の 5 例。

すべての血清は順天堂大学から分与された。

3) CDC (米国疾病予防管理センター) 標準抗体

CDC 標準抗体 :

抗 SS-A 抗体 ; ANA HUMAN REFERENCE SERUM #7 (Catalogue #IS2105 Lot #83-0026)

抗 SS-B 抗体 ; ANA HUMAN REFERENCE SERUM #2 (Catalogue #IS2073 Lot #82-0008)

4) 臨床検体

各施設の倫理委員会承認のもとに国立成育医療研究センター及び順天堂大学からの 93 例の膠原病患者血清を用いた (一部 Pool 血清に使用した患者を含む)。性別は女性、平均年齢は 34 歳 (23 歳~47 歳) で、SjS 40 例、systemic lupus erythematosus (SLE) 20 例、SS-A 抗体陽性のみで臨床症状なし 14 例、rheumatoid arthritis (RA) 7 例、CHB 既往 7 例、mixed connective tissue disease (MCTD) 2 例、anti-phospholipid antibody syndrome (APS) 2 例、橋本病 1 例を含む。

これらの検体は、測定まで -30°C 以下で保存され、DID 法にて抗 SS-A 抗体陽性 93 例と、その中の抗 SS-B 抗体陽性 45 例を用いた。

2. 方法

1) 測定試薬

抗 SS-A 抗体測定用 7 キットにおける測定法において INOVA、MBL MESACUP、Cosmic、Bio-Rad は定量法ではなく、TFB、Phadia、MBL STACIA は定量法である。各キット名は、

AI シリーズ Anti-SS-A/Ro テスト Bio-Rad、Premmune 抗 SS-A 抗体 ELISA「コスミック」、クアンタライト SS-A、MESACUP-2 テスト SS-A、ステイシア MEBLux テスト SS-A、エリア SS-A/Ro、抗 SS-A/Ro 抗体(E) [S]である。

また、抗 Ro52 抗体と抗 Ro60 抗体は MBL と Phadia のキットを用い、それぞれ抗 Ro52 抗体のキット名は、MESACUP 52K SS-A/Ro、エリア Ro52 で、抗 Ro60 抗体のキット名は、MESACUP 60K SS-A/Ro、エリア Ro60 である。

抗 SS-B 抗体測定用各キット名は、AI シリーズ Anti-SS-B/La テスト Bio-Rad、Premmune 抗 SS-B 抗体 ELISA「コスミック」、クアンタライト SS-B、MESACUP-3 テスト SS-B、ステイシア MEBLux テスト SS-B、エリア SS-B/La、抗 SS-B/La 抗体(E) [S] である。

DID 法測定試薬には ENA-2 テスト (MBL、名古屋) または SRL (TFB、東京) を用いた。

2) Pool 血清測定

Pool 血清 6 種を各試薬の検体希釈液にて 10 倍、100 倍、300 倍、1,000 倍、3,000 倍、10,000 倍希釈して測定し、最終力価を求めた。各試薬の最終力価の総平均値を基準とし、各試薬の測定値との比率を換算係数として換算し、換算前後の各試薬の測定値の一致性を評価した。

3) CDC 標準抗体の測定

CDC 標準抗体を各試薬にて希釈測定し、最終力価を求めた。

CDC 標準抗体を 1000U/ml と仮定し、これを基準とし、各試薬での測定値との比率を

換算係数として換算、換算前後の各試薬の測定値の一致性を評価した。

4) 臨床検体の測定

各試薬を用いて希釈測定し、最終力価を求めた。CDC 標準抗体の測定も同時に行われた。

各試薬による測定値の総平均値を求め、さらにその平均値との比率を換算係数として各検体の測定値を換算し、換算前後の各試薬の測定値の一致性を評価した。

また、2 にて計算した換算係数を用いて各検体の測定値を換算し、換算前後の各試薬の測定値の一致性を評価した。

5) CHB との関連

臨床検体 93 例のうち、児の CHB 発症群 11 例と非発症群 82 例の 2 群について、各試薬の測定値を比較した。

6) DID 法との互換性の検討

各試薬の DID 法 32 倍に相当する測定値を臨床検体の測定結果から推定した。

7) 統計解析

Mann-Whitney U Test を用い、危険率 5% 以下を有意差ありとした。

C. 研究結果

1. CHB との関連

抗 SS-A 抗体における各試薬測定値と CHB との関係において、CHB の有無で有意差は認められなかった。抗 SS-A 抗体の酵素免疫測定法における CHB と各キットのカットオフとの関係において、抗 SS-A 抗体は CHB ですべて陽性であった。それに対して抗

SS-B抗体はCHBでカットオフ以下の陰性の例もあった。抗 Ro52 抗体は Phadia、MBL いずれのキットでも CHB は全例陽性であった。一方、抗 Ro60 抗体は Phadia のキットでは CHB が全例陽性であるが、MBL のキットでは 1 例陰性であった。

抗 SS-B 抗体、抗 Ro52 抗体、抗 Ro60 抗体における各キットでの測定値は CHB の有無で有意差は認められなかった。

2. Pool 血清の測定結果による補正

各社のキットによる測定結果から、各希釈倍数間における測定値が一定になる範囲の測定値に希釈倍数を乗じ、最終力価とした。

Pool No. 1, 2, 3 の最終力価の平均値を基準として各試薬の補正係数を計算し、それぞれの試薬の Pool No. 1, 2, 3 の測定値を補正し、補正前後の試薬間のばらつきを変動係数 (CV%) で比較した。

抗 SS-A 抗体において補正後の各試薬の測定値は、補正前に比べて変動係数 CV%、range とも小さくなり、試薬間差が改善された。また、抗 SS-A 抗体については、抗 Ro52 抗体を含む Pool No. 2, 3 では、試薬の使用抗原として Ro52 を含む試薬 (Phadia、INOVA) を除いた CV% は除く前の 6 割未満となり、試薬間差はより改善した。

抗 SS-B 抗体についても同様に比較したところ、最終力価の平均値からの補正係数を用いた補正にて試薬間差が改善されていた。

3. CDC 標準品による補正

CDC 標準抗体の値を 1000U/ml と仮定し、各試薬での CDC 標準抗体の測定値との比率

で補正係数を算出し、この補正值で Pool No. 1, 2, 3 の測定値を補正し、補正前後の試薬間のばらつきを変動係数 (CV%) で比較した。

抗 SS-A 抗体 Pool 血清の測定値は、補正前に比べて CV% が小さくなり、Pool 血清の測定値による補正同様、試薬間差は改善される傾向があった。また、Pool 血清の場合と同様に試薬の使用抗原として Ro52 を含む試薬 (Phadia、INOVA) を除いた CV% は改善が認められた。しかし、Pool 血清からの補正係数を用いた場合に比べ、改善効果は小さかった。

抗 SS-B 抗体についても同様に CDC 標準抗体による補正効果は得られたが、Pool 血清による補正に比べてその効果が小さい傾向があった。

4. 臨床検体測定結果の補正効果

今回検討した各試薬による臨床検体測定値の総平均値で、各試薬の測定平均値を除いた値を各試薬の補正係数 (臨床検体平均値の補正係数) とした。この補正係数を各臨床検体に乗じて補正值とした。さらに各臨床検体の各試薬の測定平均値を期待値とし、各試薬の測定値、及び補正值と期待値の最小二乗法による x 係数を比較した。

また、上述 Pool 血清及び CDC 標準抗体の補正係数を用いて各試薬の臨床検体測定値を補正し、補正值の平均値に対する各試薬の補正值との最小二乗法による x 係数を比較した。補正効果は x 係数の変動係数 (CV%) で評価した。

臨床検体、Pool 血清あるいは CDC 標準抗体補正による補正值平均値と各試薬の最

小二乗法による x 係数は、各臨床検体の実測平均値の各試薬間の x 係数より変動 CV% が小さく、補正による効果が確認された。補正効果は、臨床検体平均値での補正が最も効果的だった。

5. DID 法との互換性の検討

各社試薬での測定値はおおむね DID 法の結果と相関した。DID 法 32 倍以上であることが、CHB を推測する因子として抽出されている。そこで DID 法の力価ごとに各試薬の平均測定値を求め、DID 法力価 1 倍に相当する測定値を求め、これを 32 倍して相当値とした (表 2)。すべての DID 法力価 (1~512 倍すべて)、32 倍±2 管 (8~128 倍) からの相当値はほぼ一致しており、おおむね目安になる値と思われた。しかし、各 DID 法力価における試薬ごとの測定値は大きく変動しており、評価法を検討する必要があると思われた。測定時必要な希釈倍数を示したが、すべての試薬で希釈が必要である。また、DID 法 16 倍相当値でも各社 2 例から 3 例陰性と判定された。さらに、酵素免疫測定法は主な臨床での使用目的が「定性判定」であるため、各社試薬での測定値が本来の抗体力価として報告されていないことが多い (特に高力価例について) 現状を考え、DID 法での確認が必要な基準案を作成した (表 3)。Bio-Rad で 100 EU 以上、INOVA で 80 units 以上、Cosmic で Index 値 100 以上、TFB で 300 U/ml 以上、Phadia で 240 U/ml 以上、MBL MESACUP で Index 値 100 以上、MBL STACIA で 500 U/ml 以上を示した検体については DID 法での確認が必要である。

D. 考察

我々は今回、Pool 血清、CDC 標準品、臨床検体を用いて酵素免疫測定法による抗 SS-A/B 抗体の標準化を試みた。

今回の検討では CDC 標準抗体を用いた補正効果が Pool 血清を用いた補正に劣っていた。CDC 標準抗体は Single Donor から作成されており、抗原特異性の多様な自己抗体検出における標準化を行うにあたっては、多数の特異陽性検体を Pool することで特性を平均化することの必要性を示唆する結果と考えられる。また、Phadia、INOVA など Ro52 を抗原に含む試薬と含まない試薬との差が認められたことから、標準化には試薬側の要素も統一することが必要であると考えられた。抗 Ro60 抗体において Phadia のキットでの測定では CHB 発症例の母親では全例陽性であったにも関わらず、MBL のキットでの測定では 1 例陰性がみられたことから抗 Ro52 抗体単独陽性例と診断されても Phadia の試薬では抗 Ro60 抗体も陽性になる可能性が示唆された。この試薬間差は MBL がリコンビナントに大腸菌を用いているのに対して、Phadia はバキュロウィルス・昆虫細胞発現系を用いていることに起因する可能性が考えられる。

Pool 血清と臨床検体での補正係数の差については、今回の検討だけで原因を特定できない。Pool 血清の作製条件、臨床検体の抗体力価分布などの検討が必要であると考えられた。

CHB 発症例の母親の血清において抗 SS-A 抗体はすべて陽性であったが、抗 SS-B 抗体は陰性の例もみられ、CHB の指標としては適していないと考えられた。

今回の研究において、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体、抗 Ro52 抗体、抗 Ro60 抗体における各試薬測定値と CHB 発症の有無で有意な差は認められなかった。この原因のひとつに、血清が国立成育医療研究センター及び順天堂大学からのものであり、高度で適切な治療が施されていれば高力価の抗 SS-A 抗体価でも CHB が生じにくいのか、あるいは何らかの別の要因により低力価の抗 SS-A 抗体価でも CHB が生じる可能性があることを示唆するものと思われる。我々は以前、DID 法の結果が 8 倍であるにもかかわらず、CHB を生じた妊婦の 1 例を報告している。したがって今回、表 3 で示した DID 法での確認が必要な基準値以下であっても CHB が生じる可能性がある。

DID 法が 32 倍付近の検体を酵素免疫測定法のみで正確な値を求める場合は表 2 の希釈倍数を用いて希釈値で報告することが望ましい。

一般的には、自己抗体検査のスクリーニングは抗核抗体であり、各個別の ENA (extractable nuclear antigens) 抗体 (抗 SS-A/B 抗体を含む) の検査は同定検査としての位置づけと思われる。抗 SS-A/B 抗体以外の自己抗体の標準化に関して、抗 CCP 抗体 (抗シトルリン化ペプチド抗体) は抗原の供給元がひとつであるため日本国内では換算により標準化された。しかし、SS-A/Ro 抗原は 80-110 ヌクレオチドの RNA と Ro52 及び Ro60 の蛋白との複合体であり抗原性は両蛋白部分が担っているとされている。そのため、症例ごとに出現する抗体の多様性があることが予想され、標準化には①標準品の条件として陽性検体を Pool することによる多様性の平均化、②抗

体検出系の条件として使用抗原の統一が必要であると考えられる。

抗核抗体は日本国内標準物質ができた 1。リウマトイド因子 (RF) に関しては、カットオフ値を 15IU/ml とし、実測値に係数を加減して補正值とするガイドラインができた。抗 SS-A 抗体では日本国内標準物質はまだ存在しないが、今後このようなガイドラインができることが望まれる。

E. 結論

自己抗体陽性女性の妊娠指針において新生児ループス、特に CHB の発症リスクを予測する目的で抗 SS-A 抗体を調べる場合、酵素免疫測定法をスクリーニング検査、DID 法による抗体力価を確認検査と考え、酵素免疫測定法において、Bio-Rad で 100 EU 以上、INOVA で 80 units 以上、Cosmic で Index 値 100 以上、TFB で 300 U/ml 以上、Phadia で 240 U/ml 以上、MBL MESACUP で Index 値 100 以上、MBL STACIA で 500 U/ml 以上を示した検体については DID 法での確認が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 宮野章, 中山雅弘: 妊婦における抗 SS-A 52-kDa と抗 SS-A 60-kDa avidity 抗体に関する研究, 臨床病理. 2011 ; 59 : 219-229.
- 2) 宮野章, 中山雅弘, 新井次郎, 山口晃史, 村島温子: 酵素免疫測定法による抗 SS-A/B 抗体標準化の検討, 臨床リウマチ. 2012 ; 24 : 247-259

2. 学会発表