

Introduction

Long QT syndrome (LQTS) is characterized by prolonged ventricular repolarization with a prolonged QT interval on the surface electrocardiogram (ECG) and the clinical presentation is the occurrence of syncope or cardiac arrest in children and young adults.^{1,2)} Patients with LQTS who experience aborted cardiac arrest during infancy are at very high risk for subsequent aborted cardiac arrest or death during their next 10 years,³⁾ indicating that these patients are an extremely high risk subset.

Sudden infant death syndrome (SIDS) is defined as sudden death of an infant that is unexpected by history and in which a thorough postmortem examination fails to demonstrate an adequate cause of death.⁴⁾ SIDS is one of the major causes of death in infancy with the highest prevalence at approximately 2 months of age.^{5,6)} SIDS is multi-factorial in origin; however, electrocardiographic and molecular studies have clarified an association between SIDS and LQTS.⁷⁻¹⁰⁾ Recent studies have shown that approximately 10% of cases diagnosed as SIDS carry functionally significant genetic mutations in LQTS genes.¹¹⁻¹³⁾

Electrocardiographic screening in infancy may permit the early detection of a substantial percentage of patients at risk for SIDS;⁷⁾ however, the change in the QT interval in the infantile period had been determined only in Italy.^{14,15)} In Japan, medical examinations during infancy are mandatory and medical examinations at one month of age are currently being performed for all infants. Therefore, the aims of the present study were to determine the QT intervals from birth to 1 year of age of infants and to determine an appropriate time for electrocardiographic screening to prevent sudden infant death due to LQTS.

Methods

Subjects

The study population included infants less than 12 months of age. A questionnaire was sent to the councilors of the Japanese Society of Pediatric Electrocardiology, and infant ECGs were obtained retrospectively. Information in the questionnaire included the following: date of birth, gestational age, birth weight, and Apgar scores of 1 and 5 minutes at birth, date, body weight, and body height at examination, aim of the ECG examination, and final diagnosis. Apgar scores are used in the obstetric and pediatric fields as a practical method of system-

atically assessing newborn infants immediately after birth to help identify those requiring resuscitation and predict survival in the neonatal period.¹⁶⁾ Inclusion criteria in the present study were infants whose findings of echocardiography were normal. Infants with underlying heart diseases were excluded with a few exceptions: physiological stenosis at the bifurcation of the main pulmonary artery in neonates and young infants, patent foramen ovale, and a hemodynamically insignificant muscular type of ventricular septal defect or patent ductus arteriosus. Infants with rare atrial or ventricular ectopy and those with prolonged QT intervals were also included. Infants with AV block were excluded. We obtained permission to use and analyze these data from the Ethics Committee of the National Hospital Organization Kagoshima Medical Center under the condition that the confidentiality of all personal data would be maintained.

Measurement and correction of QT intervals

All ECGs were recorded at a speed of 25 mm/s at each institution. The QT intervals of three consecutive beats were measured from the onset of the Q wave to the end of the T wave in lead V₅.¹⁷⁻¹⁹⁾ When the QT interval could not be measured because of instability of isoelectric levels in lead V₅, the QT intervals in lead II were measured. When the notch was present in more than 3 leads^{20,21)} and the notch appeared at the same timing,²²⁾ the T wave was defined as the bifid T wave. The QT/RR data were measured by one author (MY) in the present study. The QT/RR data for each of three consecutive beats were corrected using the formula in the present study and the mean values for the three consecutive QTc were used.

Formula for the correction of QT intervals

Published diagnostic criteria using the corrected QT interval (QTc) by Bazett's formula recommend additional diagnostic caution when scaling with tachycardic patients.²⁰⁾ Infants normally show a high heart rate. To determine the formula for the correction of the QT interval to minimize the effect of heart rate in infants, the following exponential model was used: $QTc = QT \text{ interval} / RR \text{ interval}^k$, where k is the parameter of the exponent. The value k was calculated by simple regression analysis using the log-transformed QT interval as the dependent variable and the log-transformed RR interval as the independent variable. All three QT/RR data of the subjects were used in the calculation.

Comparison of QTc by Bazett's formula with that by the formula in the present study

To assess the effectiveness of the present formula, association between the RR intervals and the uncorrected QT intervals, QTc by Bazett's formula, and that by the formula in the present study were determined using data of the present study.

Statistical analysis

Infants were arbitrarily grouped as 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8–11, 12–23, 24–39, and 40–52 weeks depending on the number of subjects. The QTc intervals increased during the first few months and decreased thereafter with a peak value between 6 to 11 weeks (refer to the text). The subjects were then divided into four groups as follows: 0–2, 3–5, 6–11, and 12–52 weeks. Tukey's multiple comparison was carried out for the difference in the mean QTc values between two successive groups. To determine the effect of confounders at birth and at ECG examination on the QTc intervals, multivariate regression analysis was performed using the QTc interval as the dependent variable and the confounders that were significant in simple regression analysis as the independent variables. The QTc intervals showed peak values at 6–11 weeks; therefore, the analysis was performed after dividing the groups into two groups to conform to the linear regression models so that both groups contained the subjects with the peak periods of 6–11 weeks; the group with the increase in QTc values (from 0 to 11 weeks) and the group with the decrease in the QTc values (from 6 to 52 weeks). Statistical analysis was performed with PASW[®] Statistics 18 software (SPSS Inc, Tokyo, Japan). A p value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Study population

A total of 1,138 ECGs from 1,082 infants (540 males and 542 females) were obtained retrospectively between 2000 and 2009 from eight institutions. Of these ECGs, 58 were excluded as they were duplicated in children with more than 1 ECG and only the initial ECG was used. Two ECGs were excluded because of the presence of underlying heart diseases. QT/RR data could not be determined because of the instability of isoelectric levels in both leads V₅ and II in 22 infants (7 males and 15 females; median, 2.1 weeks; range, 0 days to 7 weeks). A final total of 1,058 infants were included as subjects. Of these final subjects, QT/RR data were obtained from lead V₅ in 1,005 infants (93%).

The aim for performing the ECG was to determine the presence or absence of heart diseases because of the presence of heart murmur (76%), preoperative examination for non-cardiac diseases (12%), presence of arrhythmia (7%) and miscellaneous (5%). Characteristics of subjects are shown in **Table 1**.

Formula for the correction of QT intervals

Simple regression analysis using the log-transformed QT intervals as the dependent variable and the log-transformed RR intervals as the independent variable revealed that the k value of 0.43 was appropriate. Therefore, the formula of (QT interval)/(RR interval)^{0.43} was used to determine the QTc values.

Comparison of QTc by Bazett's formula with that by the present formula

Association between RR intervals and the uncorrected QT intervals, QTc by Bazett's and the present formulas were determined using the data of subjects in the present study. Because the QT intervals are affected by the RR intervals, namely by heart rates (**Figure 1a**), the QT intervals are corrected by the RR intervals to minimize the effect of heart rates usually by the Bazett's formula; however, the QTc intervals by Bazett's formula were still affected by the RR intervals ($r = -0.167$, $p < 0.0001$) (**Figure 1b**). On the other hand, the QTc intervals by the formula of the present study were not affected by the RR intervals (**Figure 1c**). Therefore, the QTc intervals by the formula of QT interval/RR interval^{0.43} was used in the present study; however, the QTc values by Bazett formula were also shown in the case of ECG presentation for a better understanding for researchers who usually use the QTc values by Bazett formula.

Mean QTc values during infancy

The QTc intervals increased during the first few months and decreased thereafter with a peak value between 6 to 11 weeks (**Figure 2**). Subjects were then divided into four groups as follows: 0–2, 3–5, 6–11, and 12–52 weeks. The numbers of infants in each group were 302, 429, 217, and 110, respectively. The QTc intervals were longest in subjects who were 6–11 weeks of age, and Tukey's multiple comparison revealed that the QTc values were significantly different between two successive groups. (**Figure 3**)

Clinical status that may affect QTc intervals in infancy

The result of clinical status that may affect QTc intervals by simple regression analysis was shown in **Table 2**. Multivariate regression analysis showed that

Table 1 Characteristics of the subjects

Groups (weeks)	No of subjects	At birth				At examination			
		GA (weeks)	Weight (kg)	Apgar score 1 min	Apgar score 5 min	Age (weeks)	Height (cm)	Weight (kg)	BMI (kg/m ²)
0	30	(20) 39.6 ± 1.0	(26) 3.05 ± 0.34	(26) 8.9 ± 0.5	(26) 9.7 ± 0.5	(30) 0.7 ± 0.3	(24) 50 ± 1	(25) 3.07 ± 0.30	(24) 12.4 ± 1.0
1	155	(132) 39.2 ± 1.4	(135) 3.05 ± 0.40	(122) 8.8 ± 0.6	(122) 9.8 ± 0.5	(155) 1.4 ± 0.3	(134) 50 ± 2	(134) 3.15 ± 0.40	(134) 12.6 ± 1.1
2	117	(96) 39.3 ± 1.4	(97) 2.99 ± 0.43	(81) 8.8 ± 0.5	(81) 9.7 ± 0.5	(117) 2.4 ± 0.3	(94) 51 ± 2	(96) 3.42 ± 0.50	(94) 13.1 ± 1.1
3	70	(50) 38.6 ± 1.5	(50) 2.80 ± 0.54	(43) 8.8 ± 0.7	(43) 9.7 ± 0.5	(70) 3.4 ± 0.3	(52) 51 ± 3	(52) 3.46 ± 0.64	(52) 13.0 ± 1.4
4	141	(88) 39.0 ± 1.6	(94) 2.83 ± 0.52	(70) 8.7 ± 0.7	(70) 9.5 ± 0.5	(141) 4.6 ± 0.3	(99) 53 ± 3	(100) 3.98 ± 0.62	(99) 14.0 ± 1.2
5	218	(148) 39.1 ± 1.5	(153) 2.99 ± 0.42	(107) 8.8 ± 0.7	(107) 9.6 ± 0.6	(218) 5.4 ± 0.3	(161) 54 ± 2	(162) 4.29 ± 0.54	(161) 14.8 ± 1.5
6	94	(61) 38.7 ± 2.0	(64) 2.84 ± 0.52	(40) 8.5 ± 0.7	(40) 9.4 ± 0.6	(94) 6.3 ± 0.3	(67) 54 ± 3	(67) 4.31 ± 0.74	(67) 14.7 ± 1.7
7	43	(19) 38.5 ± 2.6	(20) 2.93 ± 0.61	(12) 8.0 ± 2.2	(12) 8.9 ± 1.4	(43) 7.4 ± 0.3	(20) 56 ± 4	(21) 4.97 ± 0.97	(20) 15.6 ± 1.5
8–11	80	(37) 38.2 ± 3.0	(51) 2.88 ± 0.66	(29) 8.6 ± 0.8	(29) 9.4 ± 0.7	(80) 9.1 ± 0.9	(41) 56 ± 4	(44) 4.94 ± 1.13	(41) 15.5 ± 1.8
12–23	33	(12) 37.7 ± 2.9	(15) 2.50 ± 0.61	(8) 8.6 ± 0.5	(8) 9.0 ± 0.5	(33) 16.6 ± 3.6	(18) 59 ± 5	(18) 5.71 ± 1.49	(18) 16.0 ± 2.1
24–39	34	(5) 39.7 ± 1.1	(7) 2.92 ± 0.28	(3) 8.9 ± 0.6	(3) 9.7 ± 0.5	(34) 31.7 ± 5.1	(7) 68 ± 3	(7) 7.73 ± 1.24	(7) 16.9 ± 1.3
40–52	43	(2) 40.6 ± 2.4	(7) 2.86 ± 0.52	(5) 8.8 ± 0.4	(5) 9.4 ± 0.5	(43) 46.4 ± 3.8	(8) 72 ± 4	(8) 8.48 ± 1.45	(8) 16.6 ± 2.4
Total	1,058	(669) 39.0 ± 1.7	(706) 2.94 ± 0.48	(545) 8.7 ± 0.7	(545) 9.6 ± 0.6	(1,058) 5.0 (0–52)	(708) 52 (43–78)	(717) 3.86 (2.12–11.1)	(708) 13.9 (9.5–22.7)

Data are expressed as the number of data obtained in parentheses and the mean ± standard deviation. Data for age, height, weight, and BMI at examination of the total cases were skewed; the data are expressed as the median value and the range in parentheses.

BMI, body mass index; GA, gestational age.

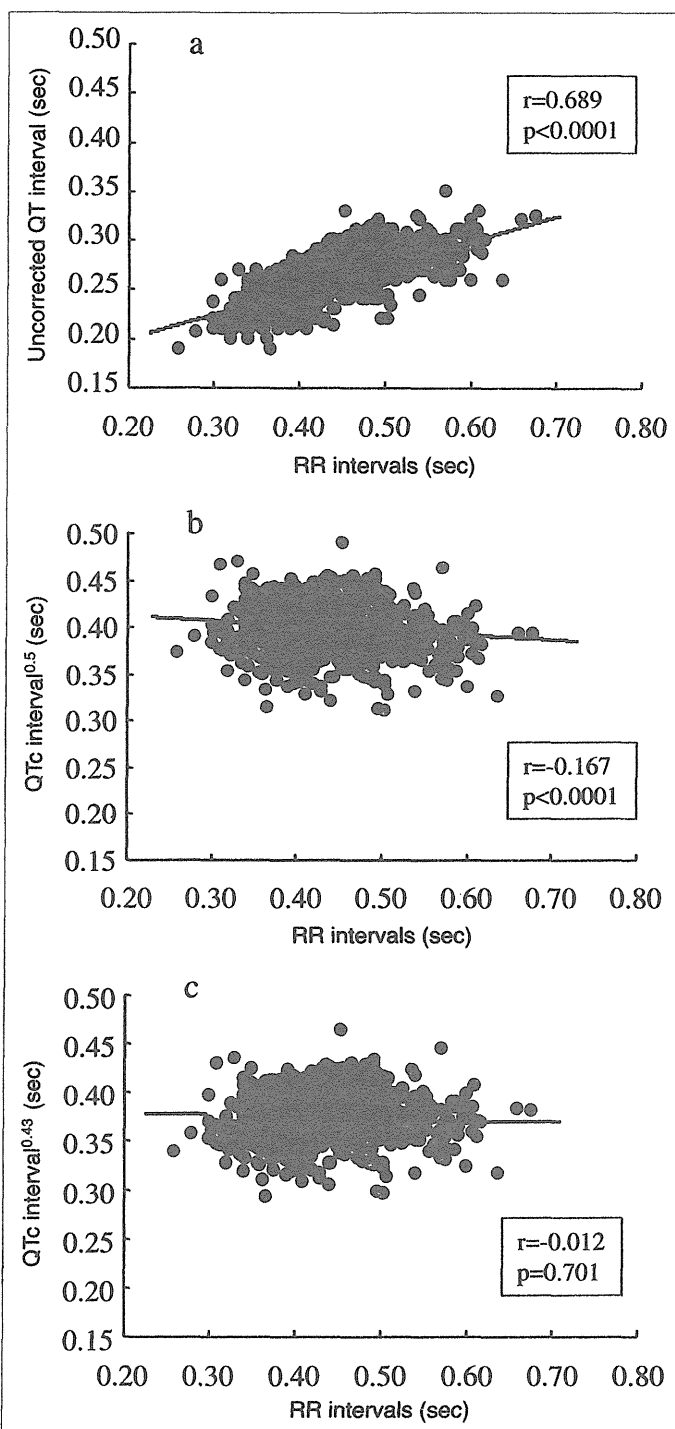


Figure 1 Association between RR intervals and the uncorrected QT intervals, QTc by Bazett's and the present formulas

The QT intervals are affected by the RR intervals, namely by heart rates (a). The QT intervals are corrected by the RR intervals to minimize the effect of heart rates usually by Bazett's formula; however, the QTc intervals by Bazett's formula were still affected by the RR intervals (b). The QTc intervals by the formula of the present study were not affected by the RR intervals (c).

age at examination was the sole strong significant predictor for QTc intervals in infants of both 0–11 weeks (t value; 7.60, $p < 0.0001$) and 6–52 weeks (t value; 5.52, $p < 0.0001$). In the analysis for infants of 6–52 weeks of age, sex and age at ECG examination were used as the independent variable among the significant parameters by single regres-

sion analysis, because the number of infants with all information for gestational age and birth weight was only 133 out of 326 subjects.

Frequency distribution of the QTc interval in infancy

Figure 4 shows the frequency distribution of the QTc interval of infancy. The infant with the longest

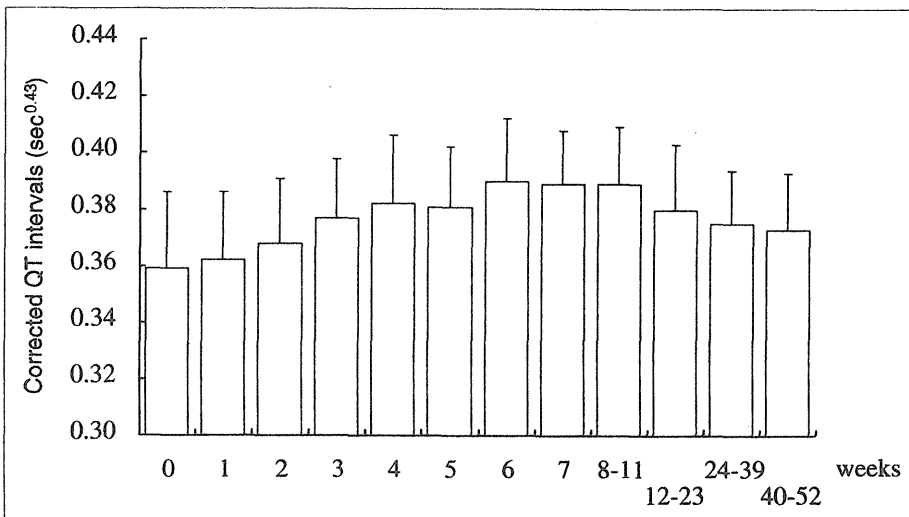


Figure 2 The QTc intervals from birth to 1 year of age. The QTc value showed a peak during 6 to 11 weeks of age. The Numbers of subjects in each group are shown in Table 1.

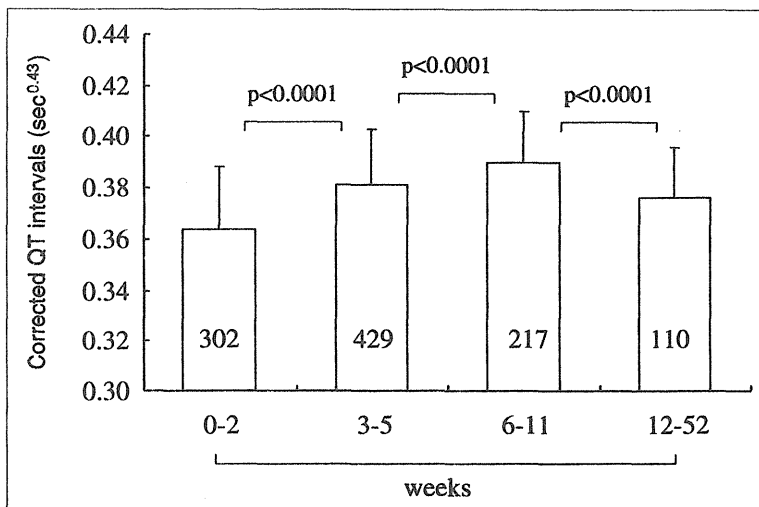


Figure 3 The QTc intervals at 0-2, 3-6, 6-11, and 12-52 weeks. Tukey's multiple comparison showed that the QTc intervals were significantly different between two successive groups with a peak value of 6-11 weeks. Numbers in the bars mean that of subjects in each group.

QTc value (mean QTc: $0.521 \text{ sec}^{0.43}$ by the present formula, $0.548 \text{ sec}^{0.5}$ by Bazett formula) was a baby of a LQTS mother (Figure 5a). He was diagnosed as LQTS on the basis of family history and the findings of ECG on the first day of life. Genetic diagnosis was not carried out in his family. His ECG recorded at 6 weeks still showed a prolonged QTc value (mean QTc: $0.503 \text{ sec}^{0.43}$, $0.527 \text{ sec}^{0.5}$ by Bazett formula) (Figure 5b), although this recoding was 4 weeks after the initiation of carteolol (0.2 mg/kg/day). Another two infants with prolonged mean QTc values of $0.464 \text{ sec}^{0.43}$ ($0.490 \text{ sec}^{0.5}$ by Bazett formula) (Figure 5c) and $0.446 \text{ sec}^{0.43}$ ($0.464 \text{ sec}^{0.5}$ by Bazett formula) (Figure not shown) visited a hospital because of heart murmur at 6 weeks and arrhythmia at 9 weeks, respectively. Their mean QTc values decreased to $0.391 \text{ sec}^{0.43}$ ($0.409 \text{ sec}^{0.5}$ by Bazett

formula) (Figure 5d) and $0.374 \text{ sec}^{0.43}$ ($0.387 \text{ sec}^{0.5}$ by Bazett formula) (Figure not shown) at age 3.

Discussion

The present study showed that the QTc interval maximally prolonged at 6-11 weeks of age in infancy.

Some of the SIDS victims were reported to have strong relations to LQTS by electrocardiographic and molecular studies.⁷⁻¹⁰ The change in the QT interval in the infantile period had been determined only in Italy.^{14,15} The present study showed that the peak QTc values during infancy appeared at 6-11 weeks of age with a mean value of $0.390 \pm 0.020 \text{ sec}^{0.43}$. Schwartz et al¹⁴ reported the QT intervals corrected by Bazett's formula of the same

Table 2 The result of clinical status that may affect QTc intervals by simple regression analysis

	All subjects (n = 1,058)			0–11 weeks (n = 948)			6–52 weeks (n = 327)		
	No.*	t value	p value	No.	t value	p value	No.	t value	p value
Sex	1,058	0.67	0.50	948	0.11	0.91	327	2.02	0.045
At birth									
Gestational age	669	-0.64	0.52	650	-1.09	0.28	136	2.00	0.048
Birth weight	706	1.63	0.10	677	1.53	0.13	151	2.70	0.008
Apgar score at 1 min	545	-1.01	0.31	529	-1.13	0.26	97	1.38	0.17
Apgar score at 5 min	545	-0.85	0.40	529	-1.14	0.26	97	3.39	0.001
At ECG examination									
Age	1,058	1.54	0.12	948	13.0	<0.0001	327	-5.77	<0.0001
Height	708	6.17	0.50	675	8.09	<0.0001	156	-0.54	0.59
Weight	717	7.10	<0.0001	684	9.38	<0.0001	160	-0.17	0.86
BMI	708	7.52	<0.0001	675	7.99	<0.0001	156	0.89	0.38
Heart rate	1,060	-0.99	0.32	950	-1.81	0.07	327	0.21	0.84

*Numbers of subjects who had information obtained.

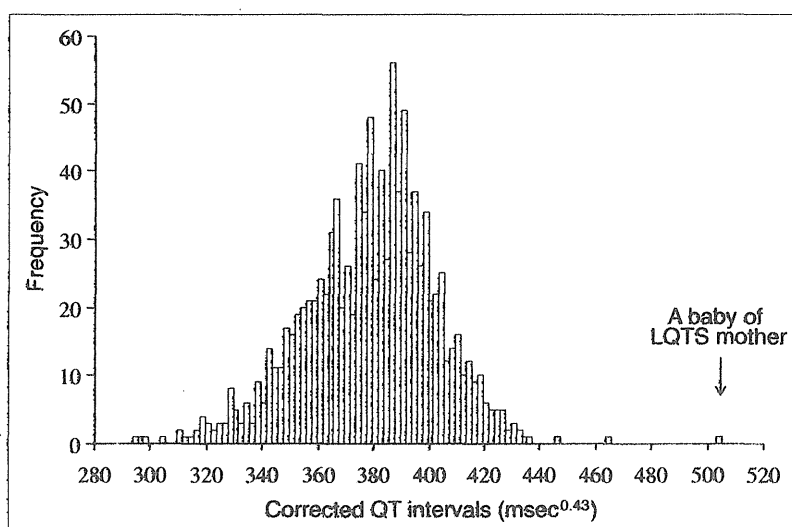


Figure 4 The frequency distribution of the QTc intervals
The frequency distribution showed a few cases with prominent QT intervals.

cohort of healthy infants in their fourth day of life and at 2, 4 and 6 months. They showed that healthy infants had the longest mean QTc values ($0.409 \pm 0.015 \text{ sec}^{0.50}$) at the second month ($n = 2,418$). The mean QT intervals of 2-month-old infants in the present study (61–90 days of age, $n = 54$) was $0.409 \pm 0.022 \text{ sec}^{0.5}$, if corrected by Bazett's formula, which was the same mean value as in the previous study.¹⁴ Recently Schwartz et al have reported that 44,596 infants with the age of 15 to 25 days old showed the mean QTc interval of $0.406 \pm 0.020 \text{ sec}^{0.5}$.¹⁵ The present study showed that the time of the maximal prolongation of the QTc intervals was not only at the second month, namely from 8 to 11 weeks, but it started as early as the 6th week of age (Figure 2).

Reasons of prolongation of the QT interval during early infancy have not been fully clarified. Schwartz et al suggested that abnormal development of cardiac sympathetic innervation could occur with a difference in the timing of maturation between left and right cardiac sympathetic innervation during the first months of life.²³ Neonatal rats treated with nerve growth factor show abnormal innervation patterns and abnormally prolonged QT intervals.²⁴ Another study showed that cardiac repolarization instability is present during normal postnatal development.²⁵ These electrophysiological characteristics during early infancy may be exaggerated when infants have genetic abnormalities. Franco et al reported that 18 future SIDS infants with a mean age of 8 weeks had significantly longer QTc values than those of 18

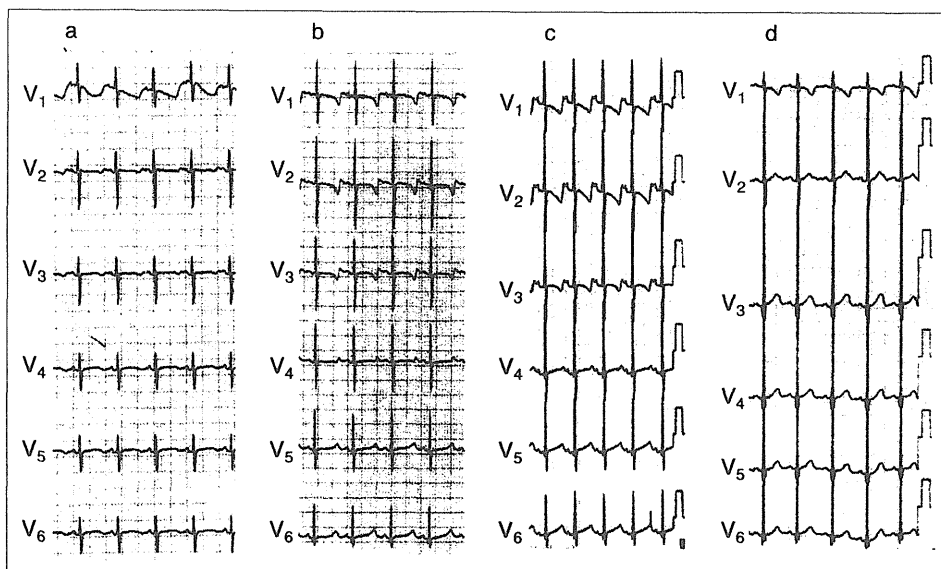


Figure 5 ECGs of infants with a high mean QTc value
 The ECG (Figure 5a) on the first day of life before treatment showed biphasic T waves in leads V₁ to V₃, and the mean QTc interval in lead V₂ was 0.521 sec^{0.43}. He was diagnosed as having LQTS on the basis of family history and the findings of ECG, although the mean QTc interval in lead V₅ was 0.419 sec^{0.43}. His ECG recorded at 6 weeks still showed a prolonged QTc value (Figure 5b; mean QTc: 0.503 sec^{0.43} in lead V₅), although this recoding was 4 weeks after the initiation of carteolol (0.2 mg/kg/day). A high mean QTc value of 0.464 sec^{0.43} at 6 weeks of age in an infant (Figure 5c) decreased to that of 0.391 sec^{0.43} (Figure 5d) at age 3. Refer to the text for the QTc values by Bazett formula.

control infants, and that median and maximal QTc values were associated with decreased parasympathetic activity and increased sympathovagal imbalance.²⁶⁾ Prolongation of the QT interval favors the occurrence of lethal arrhythmias and is associated with an increased risk of sudden death.⁷⁾ These clinical and experimental studies including the present study suggest that both healthy and LQTS infants in around their 2nd month are more susceptible to increased QT intervals and arrhythmogenic properties.

Appropriate time of electrocardiographic screening for LQTS to prevent sudden death in infancy is not clarified. The highest prevalence of SIDS was at approximately 2 months of age.^{5,6)} In more detail, the first, second, the third peaks of occurrence were around the 75th, 44th, and 105th days of age, respectively.⁴⁾ In the current study, multivariate regression analysis showed that age at examination was the sole strong significant predictor for QTc interval in the subjects 0 to 11 weeks of age. Weight, gestational age, and Apgar scores at birth, and height and weight at examination did not affect the QTc interval. These data suggest that QTc values are applicable for all infants between 0 to 11 weeks of age, irrespective of birth weight, gestational age, and body status at examination from the data of the

present study. On the other hand, Jedeikin et al reported the serial ECG findings from 5 to 96 hours after birth in 17 stressed neonates who had birth asphyxia or respiratory distress, and in 44 healthy term neonates.²⁷⁾ They found that the changes in T-wave amplitude and ECG findings of myocardial ischemia were present until 96 hours after birth in both stressed and normal neonates, suggesting the ECG recording during very early neonatal periods after birth is not an appropriate time for screening. Considering the maximal prolongation of QT interval in normal infants at 6–11 weeks of age, the presence of ECG changes during very early neonatal periods, the presence of the second SIDS peak of 44th days of age, and finally infantile medical check-up was usually carried out at 1-month-old (around 30th day of age) in Japan, we suggest the appropriate timing of electrocardiographic screening for QT prolongation may be at the 1 month infantile medical check-up.

There are several limitations in the present study. First, the numbers of infants, especially those in the late infantile periods, were small when compared with a previous study.^{14,15)} Information of infants at birth and at examination in late infantile periods was extremely limited. Because the present study was retrospective, we were unable to perform

appropriate analysis for the association between the QTc intervals and confounders for the late infantile periods. Second, no genetic background was identified in the present study. These limitations should be investigated in the near future.

Conclusion

The QTc interval showed the highest peak at 6–11 weeks of age in infancy. The period was identical to the peak period of occurrence of SIDS. If the ECG screening for QT prolongation is set in the future, an appropriate time will be the medical examinations at one month of age. Examination of ECGs at that time and follow-up studies are needed.

Funding Sources

This work was supported by a Health and Labour Sciences Research Grant (Research on Intractable Diseases [H22-032]).

References

- 1) Goldenberg I, Moss AJ, Peterson DR, et al: Risk factors for aborted cardiac arrest and sudden cardiac death in children with the congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2008; 117: 2184–2191
- 2) Shimizu W: Clinical Impact of Genetic Studies in Lethal Inherited Cardiac Arrhythmias. *Circ J* 2008; 72: 1926–1936
- 3) Spazzolini C, Mullally J, Moss AJ, et al: Clinical implications for patients with long QT syndrome who experience a cardiac event during infancy. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 832–837
- 4) Guntheroth WG, Spiers PS: The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 2002; 110: e64
- 5) Malloy MH, Freeman DH: Age at death, season, and day of death as indicators of the effect of the back to sleep program on sudden infant death syndrome in the United States, 1992–1999. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2004; 158: 359–365
- 6) Shapiro-Mendoza CK, Tomashek KM, Anderson RN, et al: Recent national trends in sudden, unexpected infant deaths: more evidence supporting a change in classification or reporting. *Am J Epidemiol* 2006; 163: 762–769
- 7) Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Segantini A, et al: Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338: 1709–1714
- 8) Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, et al: A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2000; 343: 262–267
- 9) Tester DJ, Ackerman MJ: Sudden infant death syndrome: how significant are the cardiac channelopathies? *Cardiovasc Res* 2005; 67: 388–396
- 10) Cronk LB, Ye B, Kaku T, Tester DJ, et al: Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm* 2007; 4: 161–166
- 11) Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, et al: Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* 2007; 115: 361–367
- 12) Otagiri T, Kijima K, Osawa M, et al: Cardiac ion channel gene mutations in sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 2008; 64: 482–487
- 13) Van Norstrand DW, Ackerman MJ: Sudden infant death syndrome: do ion channels play a role? *Heart Rhythm* 2009; 6: 272–278
- 14) Schwartz PJ, Montemerlo M, Facchini M, et al: The QT interval throughout the first 6 months of life: a prospective study. *Circulation* 1982; 66: 496–501
- 15) Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L, et al: Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2009; 120: 1761–1767
- 16) Stoll BJ: The newborn infants. In Kliegman RM, Behman RE, Jenson HB, Stanton BF eds: *Nelson Textbook of Pediatrics*, 18th edn. Saunders, Philadelphia, 2007, p. 675–683
- 17) Goldenberg I, Moss AJ: Long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 2291–2300
- 18) Hazeki D, Yoshinaga M, Takahashi H, et al: Cutoff values for screening prolonged QT intervals by Fridericia's formula in children and adolescents. *Circ J* 2010; 74: 1663–1669
- 19) Sumitomo N: Correction of the QT interval in children. *Circ J* 2010; 74: 1534–1535
- 20) Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS: Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 1993; 88: 782–784
- 21) Goldenberg I, Moss AJ, Zareba W: QT interval: How to measure it and what is "normal". *J Cardiovasc Electro-physiol* 2006; 17: 333–336
- 22) Lepeschkin E, Surawicz B: The measurement of the Q-T interval of the electrocardiogram. *Circulation* 1952; 6: 378–388
- 23) Schwartz PJ: Cardiac sympathetic innervation and the sudden infant death syndrome. A possible pathogenetic link. *Am J Med* 1976; 60: 167–172
- 24) Malfatto G, Rosen TS, Steinberg SF, et al: Sympathetic neural modulation of cardiac impulse initiation and repolarization in the newborn rat. *Circ Res* 1990; 66: 427–437
- 25) Idriss SF, Bell JA: Cardiac repolarization instability during normal postnatal development. *J Electrocardiol* 2008; 41: 474–479
- 26) Franco P, Groswasser J, Scaillet S, et al: QT interval prolongation in future SIDS victims: a polysomnographic study. *Sleep* 2008; 31: 1691–1699
- 27) Jedeikin R, Primhak A, Shennan AT, et al: Serial electrocardiographic changes in healthy and stressed neonates. *Arch Dis Child* 1983; 58: 605–611

特集

リウマチ性疾患における自己抗体に関する新たな知見

抗SS-A抗体・抗SS-B抗体
陽性者の妊娠リスク*

村島温子**

Key Words : anti-SS-A/B antibodies, pregnancy, neonatal lupus erythematosus, congenital heart block

はじめに

抗SS-A抗体はシェーグレン症候群(SS)や全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患で高頻度に出現する自己抗体であるが、健常者でも約1%で本抗体を持つとされる。抗SS-B抗体は抗SS-A抗体と併存し、単独で陽性となることは稀であり、抗SS-A抗体の陽性例の約3割で陽性となる。抗SS-B抗体は抗SS-A抗体に比較してシェーグレン症候群に特異性が高いという特徴を持つ。

新生児ループスは母体血中の自己抗体が胎児に移行し、SLE様の症状を呈することからついた名前である。主な症状は皮疹、血球減少、肝機能障害、心ブロック(CHB)であり、抗SS-A抗体が深くかかわっていると考えられていて、この抗体を持つ患者から出生した児の約10%に出現するとされている¹⁾。皮疹、血球減少は母親からの移行抗体の消失とともに軽快するが、CHBは不可逆的な場合が多い。膠原病と診断されていて本抗体を持っていることがわかっている場合と、無症候の女性が新生児ループス児を出産したあとこの抗体の存在が明らかになる場合があ

る。CHBについては本抗体陽性妊娠例の約1~2%にみられるといわれている。その多くは妊娠18週から24週までに出現するといわれ、重症例では心不全などにより子宮内ないしは新生児死亡となる。無事出産したとしても約3分の2は成人するまでにペースメーカーの植え込みが必要となる重症の病態であり²⁾、その予測ならびに予防方法が検討されてきているが、まだ確立していない。抗SS-B抗体の併存、抗SS-A/52kDa抗体の存在などがリスク因子として提案されてきたが、現時点で明らかになっているのはCHB児出産(死産も含めて)の既往があると約10倍の発生率になるだろうということだけである³⁾。

抗SS-A抗体陽性女性の妊娠に際し、われわれはどのように考えてどのように対応すべきか、この疑問を明らかにするため、文献ならびに筆者が代表者を務める研究班の途中経過を用いて、現時点でわかっていること、これからの課題について述べる。

CHBの病態

抗SS-A抗体の対応抗原は分子量で52kDa、60kDaに分けられる。そのうち、52kDa蛋白のleucine zipper amino acid(aa200-239)が抗原決定基(P200)となっている⁴⁾と考えられている。この抗原は核や細胞質内に存在するため、なんらかの機序が働いて細胞表面に表出されるのか、あ

* Anti-SS-A/B antibodies and pregnancy.

** Atsuko MURASHIMA, M.D., Ph.D.: 独立行政法人国立成育医療研究センター母性医療診療部(母性内科) [〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1]; Department of Women's Health, National Center for Child Health and Development, Tokyo 157-8535, JAPAN

表1 全国症例調査

実施施設
2008～2009年：研究者所属施設
2010～2011年：全国の膠原病関連，周産期専門施設
収集した情報
母体の情報
・分娩年齢，妊娠歴(新生児ループス児出産の既往を含む)，膠原病様症状(既往)，診断名
・抗SS-A抗体(DID, ELISA)，抗SS-B抗体
・抗52kDa抗体，抗60kDa抗体(WB and/or ELISA)
・他の自己抗体
・妊娠前・妊娠中の治療内容
・心ブロック診断時の治療介入の有無・内容
児の情報
・出生の妊娠週数，性別，生下時体重，アプガースコア
・新生児ループス発症の有無

るいはこの抗原と交差反応性のある物質が心筋細胞表面にあって，抗体と反応しているのかもしれない。CHBの発症に母体の抗体の存在は必要ではあるが，そのほかに環境因子や胎児側の因子もなんらかの形でかかわっているはずである。その候補の1つに胎児の遺伝的要因があるが，一卵性双生児で必ずしも一致しない⁵⁾ということから子宮内の環境も1つの要因になっている可能性が示唆される。

発生学的には房室結節とヒス束は独立して発生し，胎生8週から16週(妊娠10週から18週)で刺激伝導系として完成すると考えられている。胎盤を介して胎児に移行した抗SS-A抗体が胎児の心筋(刺激伝導系)細胞のカルシウムチャンネルに直接結合し，カルシウムの流入の障害ないしはカルシウムの過負荷により第一段階のブロックが生ずるとというのが現在のところ最も有力な仮説である⁶⁾。伝導系障害がここで回復すれば一過性の不完全心ブロックということになるが，伝導障害に終わらず炎症や線維化といった第二段階に進むと不可逆性となる。CHBの病理組織所見では刺激伝導路にIgG, TNFやTGF mRNAを発現したアポトーシス細胞，大量のコラーゲンの沈着を認めることから以下の仮説が考えられている⁷⁾。アポトーシスを起こしている心筋細胞には胎生15週前後をピークとして52kDa, 60kDa蛋白質が表出される。母体が抗SS-A抗体を持っていると，経胎盤的に胎児に移行した本抗体がこ

れらに結合することによって生理的なアポトーシスが障害され，Fcレセプターを介してマクロファージに貪食される。そして，炎症や線維化に関係するサイトカインが放出され，心筋線維芽細胞の増殖やコラーゲンの過剰産生をひき起こし，結果的に癒痕化を強めることになると考えられている⁸⁾。

抗SS-A抗体陽性女性の妊娠管理に関する班研究について

新生児ループスは内科(膠原病)，産科，小児科(循環器)と，複数の科がかかわっている病態であるが，それだけにその実態を把握することは難しかった。その実態を明らかにすることにより，CHB発症のリスク因子，予防方法を探るとともに，CHB発症の早期診断ならびに診断時の治療方法を呈示することを目標に本研究を開始した。当該症例の集積施設を中心に症例調査(表1)をお願いしたところ，多くの先生方のご協力により約750例にも及ぶ症例データベースが構築でき，現在解析中である。解析途中であり，不十分な記述になると思うが，この研究からみてきたことを文献考察も含めながら述べてみたい。

内科の立場からの驚きは，児のCHB発症をきっかけに抗SS-A抗体陽性が判明するケースが多いことである。それらの多くは無症候女性である。これらの女性を拾いあげていくためには肝炎ウイルスなどと同様に妊娠初期検査に組み込むということも案としてはあがるが，全妊娠女性の本抗体の保有率は約1%，そのうちのCHB発症率は約1～2%であることから現実的なものにはならないだろう。したがって，本研究では，抗SS-A抗体陽性とわかっている女性が妊娠する場合の，CHB発症リスクの予測方法，CHBの発症予防方法，CHB発症時の治療方法を呈示し，最終的には自己抗体陽性女性の妊娠管理指針を作成することを目標としている。

抗SS-A抗体が陽性とわかって妊娠管理されている症例でのCHB発症が少ない印象を持っていたので，妊娠前の治療とCHB発症が関係しているのかを評価したが，両者の間に関連は認めなかった。では，妊娠してからの治療がCHBに影

響しているかどうか、すなわちCHB発症を抑止しているのかどうかの解析を行ったところ、ステロイド剤が抑止できる可能性が伺えた。このデータベースで使われているステロイド剤のほとんどが胎盤移行性の低いプレドニゾロンないしは、中等度の移行性を持つベタメサゾンであった。胎児への影響を考えるとプレドニゾロンで予防できるにこしたことはないが、症例が増えるに従って、プレドニゾロンを投与していた症例の中でのCHB発症例が複数認められるようになった一方で、ベタメサゾン投与していた症例では1例もCHBを発症していない状況を見ると維持量のプレドニゾロンでのCHB予防は難しいのかもしれない。結論は今後の統計的解析結果が出るまで待つしかないだろう。

これまでも抗SS-A抗体のプロフィールからCHBのリスクを予測する試みはいろいろと行われてきた。まず、抗体価との関連について気になるところだが、それについて明らかにした報告はほとんどない。抗SS-A抗体は二重免疫拡散法(DID)と酵素抗体法(ELISA)で測定されているが、検査の利便性から近年はELISA法が主流になりつつある。しかし、ELISA法のキットは複数のメーカーが発売しているため、まとめて解析することは不可能である。今回の症例データベースを十分な症例数を対象としたままで解析するためには抗SS-A/B抗体(ELISA法)の標準化が必要であると考えて試みた。結果的には単純な標準化は難しいと判断されたが、ELISA法を「定性判定」と捉えて、DID法での確認が必要な基準案を作成した(現在、投稿中)。

抗SS-A抗体の力価の解釈にはこのような問題点があるものの、研究班で集積した症例データベースではDID, ELISAともに、その力価が高いほどCHBの発症率が高くなる傾向は確認できた。しかし、力価が高くてもCHBを発症しない例も多い一方で、力価が低いにもかかわらずCHBを発症した例があるのも事実であり、カットオフ値を設定することの難しさを実感している。

従来、抗SS-A抗体の対応抗原である52kDa, 60kDaに対する抗体がimmunoblotting法, ELISA法で測定され、その結果がCHBの予測に利用できないかと検討されてきた。そのなかで、52kDa

に対する抗体が陽性あるいは60kDaに対する抗体も含めてある一定以上の値だとCHBのリスクが高まることを示す研究報告が多かった⁹⁾¹⁰⁾。われわれの症例データベースをもとにした解析でもその傾向は認めたが、優れた感度、特異度を持つカットオフ値を示すことは不可能そうである。また、抗SS-B抗体の併存でCHBのリスクが高まるという結果は得られそうにない。

さらに最近では前述した52kDaの抗原決定基と考えられているleucine zipper amino acid(aa200-239)(P200)に対する抗体がCHBのリスク予測に有用である¹¹⁾という報告があるが、これを否定する報告もあり、その評価は確立していない。

このように、抗SS-A抗体のプロフィールのみでCHBのリスクを予測することは不可能であり、他の臨床データと合わせて解析していく必要がある。

CHBの治療

CHBが成立するまでの時間は短いと考えられ、完全房室ブロックの状態で見られることが多い。完全房室ブロックになってから母体に胎盤移行率の高いデキサメサゾン、ベタメサゾンなどフッ化ステロイド剤を投与しても戻る可能性はほとんどない。また、ステロイド剤を投与してもペースメーカー装着率や死亡率に差がなかったという報告がある¹²⁾。一方で、CHB発症後であってもステロイド剤を投与することにより死亡率を下げることはできないかという報告がある¹³⁾。その理由として心ブロックだけでなく心筋障害の進展を抑制する効果があるからではないかと推測されている。また、心嚢水、胸水、腹水、胎児水腫の改善が期待できるともいわれており、完全房室ブロックへの効果は期待できなくてもCHB出現時には、母体に胎盤移行性の高いステロイド剤を投与することは容認されると考える。Buyonは、その適応として不完全心ブロックないしは心不全徴候が認められたときと提案している²⁾。

フッ化ステロイド剤を母体に投与することにより、胎児には子宮内発育遅延、羊水過少、副腎抑制などのリスクが、母体には糖尿病、高血圧、感染症などのリスクがあることを考慮して判断しなければならない。デキサメサゾンとベ

タメサゾンの胎盤移行性を比較した場合、前者は母体の血中濃度と胎児のそれがほぼ等しいが、後者では3分の1程度になるというデータもあり前者ほど移行率は高くないと考える。

CHBの予防

これまでもステロイド剤、血漿交換療法、大量ガンマグロブリン療法など、いくつかの候補があがってきた。このうち、ステロイド剤、血漿交換療法についてわれわれのデータベースから私見を述べる。CHB児出産の既往のあるハイリスク群17例にベタメサゾンが投与されたが、そのなかからは1例もCHBを発症しなかったことよりベタメサゾンがCHBを予防できる可能性が示唆された。しかし、効果ありと判断するには例数が少ないこと、プレドニゾロンに比べて胎盤移行性が高く胎児へのリスクが否定できない現状では、CHB児出産の既往のあるハイリスク群においてリスクとベネフィットに関する情報が不十分であることを理解して、それでも望む場合にのみ容認できるのではないかと考えている。血漿交換療法を施行した17例中2例でCHBを発症しており、本療法単独でCHBを予防することは難しいと考える。

Kaaja¹⁴⁾らはCHBの既往のあるハイリスク群を対象に大量ガンマグロブリンを妊娠12週から24週まで3週間おきに投与するというプロトコルで臨床試験を行った。対象となった54例のうち、6例にCHBを発症したという結果から本療法がCHBの予防に有効ではないという判断がなされた。最近、Buyonらは、クロロキンがCHB予防に効果があることを報告した¹⁵⁾。本邦で使用できる状況になれば1つの候補にあげても良いかもしれない。

現時点ではCHB児出産歴のある場合を除いて予防の対象にはならないと考えて良いだろう。しかし、今後われわれの症例データベースの解析が進み、ほかにハイリスク群の抽出が可能になれば、それらに対しても予防を拡大していくことになるだろう。その場合にも備え、われわれにとって最も身近な予防方法と思われるベタメサゾンの児への安全性に関する検証も同時に行っていくべきと考え現在取り組んでいるところである。

抗SS-A抗体陽性妊娠例では、たとえハイリスク群と認定できなくてもCHBのリスクについて説明し、産科医など胎児心エコーの熟達した医師に慎重な観察を求める必要がある。特にCHBの好発する妊娠18週から24週の期間は、通常なら1回/4週の通院で十分な、胎児エコーも頻回に施行しない期間であり、産科医への周知は必須である。

抗SS-A抗体と新生児ループス、特にCHBとの関係が取り上げられるようになって30年あまりがたった。この間、免疫学の進歩は著しく、新生児ループスをはじめさまざまな病態が明らかになってきたが、抗SS-A抗体を持つ女性の妊娠管理をどうしていけばよいのかという臨床的核心がつかめていないのが現状である。基礎的なアプローチもさることながら症例からみえてくることも少なくないはずだという確信を持って、この研究を進めてきた。本研究の進行にあたっては全国の内科、産科、小児科の先生方に、多大なご協力を賜った。この紙面を借りて感謝申しあげるとともに、ご尽力に報いるような結果を出していくことをお約束したい。

文 献

- 1) Reed BR, Lee LA, Harmon C, et al. Autoantibodies to SS-A/Ro in infants with congenital heart block. *J Pediatr* 1983 ; 103 : 889.
- 2) Buyon JP, Clancy RM, Friedman DM. Cardiac manifestations of neonatal lupus erythematosus : guidelines to management, integrating clues from the bench and bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2009 ; 5 : 139.
- 3) Solomon DG, Rupel A, Buyon JP. Birth order, gender and recurrence rate in autoantibody-associated congenital heart block : implications for pathogenesis and family counseling. *Lupus* 2003 ; 12 : 646.
- 4) Buyon JP, Slade SG, Reveille JD, et al. Autoantibody responses to the "native" 52-kDa SS-A/Ro protein in neonatal lupus syndrome, systemic lupus erythematosus, and Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1994 ; 152 : 3675.
- 5) Cooley HM, Keech CL, Melny BJ, et al. Monozygotic twins discordant for congenital complete heart

- block. *Arthritis Rheum* 1997 ; 40 : 381.
- 6) Xiao GQ, Hu K, Boutjdir M. Direct inhibition of expressed cardiac l- and t-type calcium channels by igg from mothers whose children have congenital heart block. *Circulation* 2001 ; 103 : 1599.
 - 7) Miranda-Carús ME, Askanase AD, Clancy RM, et al. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La autoantibodies bind the surface of apoptotic fetal cardiocytes and promote secretion of TNF-alpha by macrophages. *J Immunol* 2000 ; 165 : 5345.
 - 8) Clancy RM, Neufing PJ, Zheng P, et al. Impaired clearance of apoptotic cardiocytes is linked to anti-SSA/Ro and- SSB/La antibodies in the pathogenesis of congenital heart block. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 2413.
 - 9) Hashimoto H, Takasaki Y, Hirokawa K. Systemic lupus erythematosus and congenital anomalies, focusing on neonatal lupus erythematosus and anti-SSA/SS-B antibodies. *Cong Anom* 1992 ; 32 : 301.
 - 10) Jaeggi E, Laskin C, Hamilton R, et al. The importance of the level of maternal anti-Ro/SSA antibodies as a prognostic marker of the development of cardiac neonatal lupus erythematosus a prospective study of 186 antibody-exposed fetuses and infants. *J Am Coll Cardiol* 2010 ; 55 : 2778.
 - 11) Strandberg L, Winqvist O, Sonesson SE, et al. Antibodies to amino acid 200-239 (p200) of Ro52 as serological markers for the risk of developing congenital heart block. *Clin Exp Immunol* 2008 ; 154 : 30.
 - 12) Friedman DM, Kim MY, Copel JA, et al. Prospective evaluation of fetuses with autoimmune-associated congenital heart block followed in the PR Interval and Dexamethasone Evaluation (PRIDE) Study. *Am J Cardiol* 2009 ; 103 : 1102.
 - 13) Hayashi T, Kaneko M, Kim KS, et al. Outcome of prenatally diagnosed isolated congenital complete atrioventricular block treated with transplacental betamethasone or ritodrine therapy. *Pediatr Cardiol* 2009 ; 30 : 35.
 - 14) Kaaja R, Julkunen H. Prevention of recurrence of congenital heart block with intravenous immunoglobulin and corticosteroid therapy : comment on the editorial by Buyon et al. *Arthritis Rheum* 2003 ; 48 : 280.
 - 15) Izmirly PM, Saxena A, Kim MY, et al. Maternal and fetal factors associated with mortality and morbidity in a multi-racial/ethnic registry of anti-SSA/Ro-associated cardiac neonatal lupus. *Circulation* 2011 ; 124 : 1927.

* * *

酵素免疫測定法による抗 SS-A/B 抗体標準化の検討

Key words: Congenital heart block,
anti-SS-A/B antibody,
double immunodiffusion,
enzyme immunoassay,
standardization

大阪府立母子保健総合医療センター検査科
宮野 章 中山 雅 弘
医学生物学研究所診断薬事業部
新井 次 郎
国立成育医療研究センター母性医療診療部
山口 晃 史 村島 温 子

要 旨

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¹⁾¹⁸⁾, 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。

はじめに

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¹⁶⁾, 無症候女性の 1

%が本抗体を保有する⁵⁾。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

Investigation of anti-SS-A/B antibody standardization using enzyme immunoassay.

Akira Miyano, Masahiro Nakayama, Jiro Arai*, Koushi Yamaguchi**, Atsuko Murashima**.

Department of Laboratory Medicine, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health,

*Department of In Vitro Diagnostic Division, Medical & Biological Laboratories, **Department of Women's Health, National Center for Health and Development.

(2012. 4. 23 受付, 2012. 10. 18 受理)

いる CHB は²⁾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。CHB は第 1 子に発症した場合、第 2 子の発症率が高くなると報告されており、前児が CHB であった場合は特に注意が必要である¹⁰⁾。

近年、SS-A 抗原のアイソフォームである 52-kDa (Ro52) と 60-kDa (Ro60) に対する抗体を測定する試薬が開発され、CHB 発症の可能性を示唆する点でその有用性が検討されている¹⁴⁾²⁰⁾。CHB が重症なほど母親の抗 Ro52 抗体価が高いという報告がある⁸⁾¹³⁾¹⁷⁾。さらに、Ro52 を構成するサブユニットのひとつである Ro52 p200 peptide で免疫されたラットにおいて生まれる仔が CHB を生じたという報告¹⁵⁾がある。

我々は、尿素誘導体 (European patent EP0875761, Japanese patent application No. 10-121896) を用いた抗体の質 (avidity)¹¹⁾の研究で、抗 Ro52 抗体はその児の CHB を、抗 Ro60 抗体は CHB を予想できる可能性を示した。その後の一般試薬である 8M 尿素を用いた検討¹²⁾では、妊婦における Ro52 と Ro60 の抗体価及び Ro60 AI (avidity index) は CHB 群において有意に高値であったこと、また、Ro52 AI と Ro60 AI の和のデータを比較したところ CHB 群において有意に高値であったことを示した。しかし、2 項ロジスティック回帰分析において Ro60 AI にのみに有意差が認められる回帰式が得られた。また、妊婦の抗 Ro52 抗体単独陽性 (抗 Ro60 抗体陰性) や低い Ro52 AI でも CHB が生じたことなどから Ro52 と Ro60 に対する抗体価のみで CHB を予測することは難しいのが現状である。

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⁷⁾。その解析において抗 SS-A 抗体の抗体価が 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た¹¹⁾⁸⁾。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 (double immunodiffusion) 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¹¹⁾⁸⁾、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。

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)、テイエフビー (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⁴⁾

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。

方 法

1. 測定試薬

表 1 に抗 SS-A 抗体測定用 7 キットにおける測定法の特徴を示した。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, 表 1 上段より, AI シリーズ Anti-SS-A/Ro テスト Bio-Rad, Premune 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。

表 2 に抗 SS-B 抗体測定用キットにおける測定法の特徴を示した。各キット名は, 表 2 上段より, AI シリーズ Anti-SS-B/La テスト Bio-Rad, Premune 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 種を表 1, 2 の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

表1 抗SS-A抗体測定用7キットにおける測定法の特徴

製造会社	SS-A 抗原 52 kD	60 kD	標識抗体	基質	反応 時間 (分)	検体 希釈 倍数	標準物質	
							本数 (単位)	測定範囲 (単位)
Bio-Rad	—	ネイティブ	HRP ^a -ヤギポリクローナル 抗ヒトIgG	TMB ^b	90	41	EU ^c	
Cosmic	—	ネイティブ	HRP-ウサギポリクローナル 抗ヒトIgG	TMB	80	201	index	
INOVA	リコンビ ナント	ネイティブ	HRP-ヤギポリクローナル 抗ヒトIgG	TMB	90	101	units	
MBL (MESACUP)	—	ネイティブ	HRP-ヤギポリクローナル 抗ヒト免疫グロブリン	TMB	150	100	index	
MBL (STACIA)	—	ネイティブ	ALP ^d -ヤギポリクローナル 抗ヒト免疫グロブリン	CDP-Star ^e	19 ^f	1	5	1-1200 U/mL
Phadia	リコンビ ナント	リコンビ ナント	β -Gal ^g -マウスモノクローナル 抗ヒトIgG	^h MUG	97 ⁱ	100	6	0.5-240 U/mL
TFB	—	ネイティブ	HRP-ウサギポリクローナル 抗ヒトIgG	^j OPD	150	1000	7	6.3-800 U/mL

^aHRP, Horseradish peroxidase; ^bTMB, 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine; ^cEU, Enzyme unit; ^dALP, alkaline phosphatase; ^eCDP-Star, disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate•disodium; ^fSTACIA による自動測定; ^g β -Gal, β -galactosidase; ^hMUG, 4-methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside; ⁱPhadia 250 による自動測定; ^jOPD, o-phenyldiamine.2HCl.

表2 抗SS-B抗体測定用7キットにおける測定法の特徴

製造会社	SS-B 抗原	標識抗体	基質	反応 時間 (分)	検体 希釈 倍数	標準物質	
						本数 (単位)	測定範囲 (単位)
Bio-Rad	ネイティブ	HRP ^a -ヤギポリクローナル 抗ヒトIgG	TMB ^b	90	41	EU ^c	
Cosmic	ネイティブ	HRP-ウサギポリクローナル 抗ヒトIgG	TMB	80	201	index	
INOVA	ネイティブ	HRP-ヤギポリクローナル 抗ヒトIgG	TMB	90	101	units	
MBL (MESACUP)	ネイティブ+ リコンビナント	HRP-ヤギポリクローナル 抗ヒト免疫グロブリン	TMB	150	100	index	
MBL (STACIA)	ネイティブ	ALP ^d -ヤギポリクローナル 抗ヒト免疫グロブリン	CDP-Star ^e	19 ^f	1	5	1-1200 U/mL
Phadia	リコンビナント	β -Gal ^g -マウスモノクローナル 抗ヒトIgG	^h MUG	97 ⁱ	100	6	0.5-320 U/mL
TFB	ネイティブ	HRP-ウサギポリクローナル 抗ヒトIgG	^j OPD	150	1000	7	6.3-800 U/mL

^aHRP, Horseradish peroxidase; ^bTMB, 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine; ^cEU, Enzyme unit; ^dALP, alkaline phosphatase; ^eCDP-Star, disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate•disodium; ^fSTACIA による自動測定; ^g β -Gal, β -galactosidase; ^hMUG, 4-methyl-umbelliferyl- β -D-galactoside; ⁱPhadia 250 による自動測定; ^jOPD, o-phenyldiamine.2HCl.

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1000 U/ml と仮定し、これを基準とし、表1, 2の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

表1, 2の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

表1, 2の各試薬の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。

結 果

1. CHB との関連

図1に抗SS-A抗体における各試薬測定値

とCHBとの関係を示した。CHBの有無で有意差は認められなかった。表3では抗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を示した。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(表4)。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(表5)。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(表6)。

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(表7-1)。

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

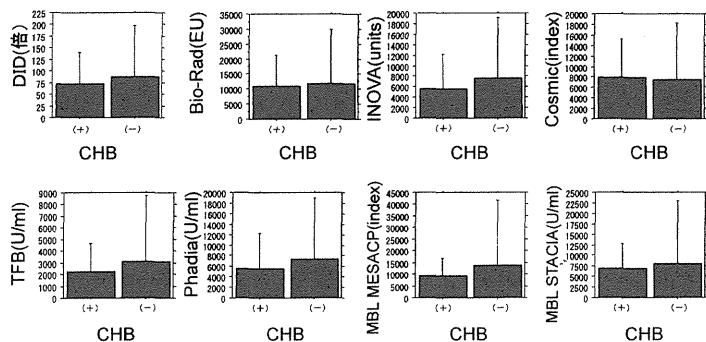


図1 抗SS-A抗体における各試薬測定値とCHBとの関係

(+ : congenital heart block 発症例, - : congenital heart block 非発症例)

表3 抗SS-A抗体の特異免疫測定法におけるCHBとカットオフとの関係 (INOVA 10例検体不足のため測定不可)
Bio-Rad(25 EU<) INOVA(20 units) Cosmic(30 index \leq)

test results	CHB		
	+	-	total
+	11	79	90
-	0	3	3
total	11	82	93

test results	CHB		
	+	-	total
+	9	73	82
-	0	1	1
total	9	74	83

test results	CHB		
	+	-	total
+	11	80	91
-	0	2	2
total	11	82	93

TFB(10 U/ml<)

test results	CHB		
	+	-	total
+	11	79	90
-	0	3	3
total	11	82	93

Phadia(10 U/ml<)

test results	CHB		
	+	-	total
+	11	79	90
-	0	3	3
total	11	82	93

MBL MESACUP(30 index \leq)

test results	CHB		
	+	-	total
+	11	79	90
-	0	3	3
total	11	82	93

MBL STACIA(10 U/ml \leq)

test results	CHB		
	+	-	total
+	11	79	90
-	0	3	3
total	11	82	93

表4 抗SS-B抗体の特異免疫測定法におけるCHBとカットオフとの関係 (INOVA 4例検体不足のため測定不可)
Bio-Rad(25 EU<) INOVA(20 units \leq) Cosmic(25 index \leq)

test results	CHB		
	+	-	total
+	3	21	24
-	5	16	21
total	8	37	45

test results	CHB		
	+	-	total
+	7	22	29
-	1	11	12
total	8	33	41

test results	CHB		
	+	-	total
+	3	22	25
-	5	15	20
total	8	37	45

TFB(10 U/ml<)

test results	CHB		
	+	-	total
+	2	18	20
-	6	19	25
total	8	37	45

Phadia(10 U/ml<)

test results	CHB		
	+	-	total
+	5	23	28
-	3	14	17
total	8	37	45

MBL MESACUP(25 index \leq)

test results	CHB		
	+	-	total
+	4	17	21
-	4	20	24
total	8	37	45

MBL STACIA(10 U/ml \leq)

test results	CHB		
	+	-	total
+	3	22	25
-	5	15	20
total	8	37	45

表 5 抗 SS-A 52k/Ro 抗体酵素免疫測定法における CHB とカットオフとの関係

Phadia (10 U/ml<)				MBL MESACUP (5.1 index<)			
test	CHB			test	CHB		
results	+	-	total	results	+	-	total
+	11	61	72	+	11	64	75
-	0	21	21	-	0	18	18
total	11	82	93	total	11	82	93
sensitivity	100.0%			sensitivity	100.0%		
specificity	25.6%			specificity	22.0%		
positive predictive value	15.3%			positive predictive value	14.7%		
negative predictive value	100.0%			negative predictive value	100.0%		

表 6 抗 SS-A 60k/Ro 抗体酵素免疫測定法における CHB とカットオフとの関係

Phadia (10 U/ml<)				MBL MESACUP (5.9 index<)			
test	CHB			test	CHB		
results	+	-	total	results	+	-	total
+	11	79	90	+	10	59	69
-	0	3	3	-	1	23	24
total	11	82	93	total	11	82	93
sensitivity	100.0%			sensitivity	90.9%		
specificity	3.7%			specificity	28.0%		
positive predictive value	12.2%			positive predictive value	14.5%		
negative predictive value	100.0%			negative predictive value	95.8%		

た補正にて試薬間差が改善されていた (データ非提示)。

3. CDC 標準品による補正

CDC 標準抗体の値を1000 U/ml と仮定し, 表 1, 2 の各試薬での 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(表 7-1)。

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 (データ非提示)。

4. 臨床検体測定結果の補正効果

今回検討した表 1, 2 の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。更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

表 7-1 抗 SS-A 抗体におけるプール血清および CDC 標準品による補正効果の検証

	SS-A No. 1			SS-A No. 2			SS-A No. 3		
	補正前	Pool 補正	CDC 補正	補正前	Pool 補正	CDC 補正	補正前	Pool 補正	CDC 補正
mean	2091	2245	3492	13561	14114	21600	16265	16529	28429
SD	870	439	1273	5767	1875	5431	8674	5031	20151
CV (%)	41.6%	19.6%	36.5%	42.5%	13.3%	25.1%	53.3%	30.4%	70.9%
mean*	2220	2433	3150	13474	14679	18761	12892	13652	17486
SD*	1026	300	743	5836	1117	2833	6599	1320	3298
CV (%)*	46.2%	12.3%	23.6%	43.3%	7.6%	15.1%	51.2%	9.7%	18.9%

Pool 補正: 各試薬の最適直線性範囲からの最終力価からの集計
 CDC 補正: CDC 標準血清を1000 U/ml として補正

*: INOVA および Phadia を除外し算出