Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Detection of antinuclear antibodies by use of an enzyme immunoassay with nuclear HEp-2 cell extract and recombinant antigens: comparison with immunofluorescence assay in 307 patients

林, 伸英

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2004-05-12

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
乙2764

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002764

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【１９１】

氏　　名・（本　籍）	林　　伸英	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学　位　記　番　号	博ろ第１９２２号	
学位授与の　要　件	学位規則第４条第２項該当	
学位授与の　日　付	平成１６年５月１２日	

【 学位論文題目 】

Detection of Antinuclear Antibodies by Use of an Enzyme Immunoassay with Nuclear Hep-2 Cell Extract and Recombinant Antigens: Comparison with Immunofluorescence Assay in 307 Patients

(Hep-2 細胞核抽出抗原およびコンビナント抗原を用いた酵素免疫測定法による抗核抗体検出用試薬の有効性
－ 307例の膠原病患者における間接蛍光抗体法との比較 －)

審　査　委　員

主　査　教　授　南　　康博

教　授　千原　和夫

教　授　錦織　千佳

抗核抗体(ANA)の検出は、全身性エリトマトーデスをはじめとする膠原病の診断において重要な検査である。ANA の検出方法は、スクリーニング的に用いられる総合的抗核抗体の検出法と疾患特異的抗核抗体を個別に検出する方法がある。前者には現在、広範に行われている間接蛍光抗体法（IF 法）や近年開発された酵素免疫測定法(EIA 法)がある。IF 法は現在でも最も広く使用され、ヒト喉頭癌由来培養細胞である HEp-2 細胞が核材として用いられ、より高感度となりセントロメア抗体も検出できる利点が出てきた反面、特異度が低いこと、施設内および施設外変動の存在が指摘されている。近年、HEp-2 細胞抽出抗原や特異抗原（精製またはリコンビナント）をプレートに固相した EIA 法が数種開発されてきた。これらの測定法は、SLE の陽性率に 62-90%と相当な変動がみられ、SLE の検出において高感度な測定系は偽陽性率が高く、逆に偽陽性率の低い測定系は SLE の診断で何人かの患者を見落としていた。

【目的】

新しく開発された HEp-2 細胞抽出抗原と複数のリコンビナント抗原を混合し、ビーズに固相化した EIA 法と HEp-2 細胞を核材とした IF 法による ANA を患者検体および健常人コントロールにおいて比較し、本試薬の ANA 検出のスクリーニング検査としての有用性を評価する。

【方法】

コントロールとして厳選した健常人 492 例（女/男比=1.1)および確立された診断基準をすべて満たした全身性エリトマトーデス（SLE）111 例、シェーグレン症候群（SS）36 例、強皮症（SSc）39 例、多発筋炎/皮膚筋炎（DM/PM）39 例、混合性結合組織病（MCTD）33 例、関節リウマチ（RA）49 例の合計 307 例の膠原病患者(CTDs)血清を使用した。「Cobas® Core HEp2 ANA EIA」（以下 COBAS-ANA: Roche Diagnostics）は全自動酵素免疫測定装置 Cobas® Core II（Roche Diagnostics）の専用試薬で、測定原理はビーズ固相 EIA 法、固相化抗原は天然の蛋白抗原（HEp-2 細胞抽出抗原）および 7 種のリコンビナント抗原（60kSS-A, 52kSS-A, SS-B, Scl-70, CENP-B, Jo-1, dsDNA）である。

すべての血清を EIA 法および IF 法で測定し、健常人での COBAS-ANA の抗体価の性差、年齢差を解析し、陽性率を求めた。膠原病患者と健常人での COBAS-ANA の抗体価の分布を調べ、ROC 分析より疾患別に両法の診断精度を比較した。また、8 種の疾患特異的抗核抗体（RNP 抗体、Sm 抗体、SS-A 抗体、SS-B 抗体、Scl-70 抗体、CENP-B 抗体、Jo-1 抗体および dsDNA 抗体）陽性検体を陽性として捉える捕捉率を COBAS-ANA と IF-ANA とで比較した。

【結果】

健常人の COBAS-ANA の抗体価は、女は男に比べて有意に高値を示し(P=0.042)、層別化した女において年齢による差が認められた(P=0.016)。健常人における COBAS-ANA の陽性率は、女で 6.2%、男 3.8%、全体で 5.1%であった。膠原病群における COBAS-ANA の抗体価はいずれも健常人女性と比較して有意に高値であった(P<0.0001)。

RA を除くすべての疾患と健常人女性において ROC 分析を行った結果、COBAS-ANA の ROC 曲線は IF-ANA の曲線の左上に位置し、ROC 曲線下面積(AUCs)も、COBAS-ANA、IF-ANA でそれぞれ、0.94 、0.90 となり、診断精度において COBAS-ANA が優れていた(P=0.005)。IF-ANA で広く用いられているカットオフ値 1:40 希釈は感度 92%、特異度 65%と高感度であるが、特異度が低いことが示された。カットオフ値を 1:160 希釈としたとき、感度・特異度のバランスがよくなった(感度 81%、特異度 87%)。COBAS-ANA では、カットオフ値 0.9 は適切に設定され（感度 84%、特異度 94%)、RA を除く膠原病と健常人の鑑別診断に応用できると考えられた。また、カットオフ値を 0.6 とした時、感度 93%、特異度 79%となり、IF-ANA での 1:40 希釈をカットオフ値とした時の感度・特異度より共に高かった。

膠原病患者において COBAS-ANA および IF-ANA の抗体価は有意な相関を認めた(ρ=0.647, P<0.001 Spearman's correlation coefficient)。一致率を求めたところ(IF-ANA の 1:160 希釈、COBAS-ANA 0.9)、SLE、SS および SSc においては有意な一致率であった（P<0.05）が、κ 係数は SS を除いていずれも 0.4 以下を示し、良好な一致とは言えなかった。不一致検体(IF-ANA 1:160 希釈以上、COBAS-ANA 0.6 未満）は 11 例あり、その中の 1 例(RA)は SS-A 抗体と dsDNA 抗体共に陽性の例で、SS-A 抗体は 85.9(index)と高抗体価であった。不一致検体(IF-ANA 1:40 希釈未満、COBAS-ANA 0.9 以上）10 例には、Jo-1 抗体陽性で抗体価は 85.9(index)と高値の例(DM/PM)が含まれていた。

膠原病患者で 8 種の疾患特異的抗核抗体のうち、いずれかが陽性を示した検体 207 例における COBAS-ANA と IF-ANA 陽性率(個々の疾患特異的抗

核抗体を捉える感度)を比較した。カットオフ値を 1:40、1:160 希釈としたとき IF-ANA 陽性率は、それぞれ 97.6%、90.8%、 カットオフ値を 0.6、0.9 としたとき COBAS-ANA 陽性率は、それぞれ 97.1%、91.8%であった。

疾患特異的抗核抗体の種類による反応性を評価するために、膠原病患者で疾患特異的抗核抗体が単一で存在していた検体、RNP 抗体 15 例、SS-A 抗体 18 例、セントロメア抗体 14 例、Jo-1 抗体 5 例および dsDNA 抗体 19 例について調べたところ、カットオフ値を 1:40 希釈としたときの IF-ANA 陽性率はそれぞれ 100%、100%、100%、60%および 100%であった。一方、カットオフ値を 0.6 としたときの COBAS-ANA 陽性率はそれぞれ 100%、89%、86%、80%および 100%であった。さらに、IF-ANA の抗体価が 1:40 希釈以上の抗体価を示し、かつ染色型が単一であった検体、Homogeneous 型 36 例、Speckled 型 88 例、Nucleolar 型 6 例および Discete speckled 型 10 例の検体において、カットオフ値を 0.6 としたときの COBAS-ANA 陽性率はそれぞれ 78%、95% 、50%および 90%であった。

【まとめ】

COBAS-ANA は、IF-ANA より感度・特異度の点、すなわち診断精度において、IF-ANA より優れていた。また、IF-ANA は操作が煩雑で判定に熟練を要すが、COBAS-ANA は簡便に全自動測定ができ、約 60 分と迅速に結果が得られる。また、IF-ANA は通常、定性法の陽性を確認してから定量法に検査を進めて判定するが、COBAS-ANA は定量値で結果が報告されるため、すぐに判定できる。つまり、臨床医が値を読むことにより COBAS-ANA の 0.9 をカットオフ値とした時、RA を除く膠原病と健常人の鑑別診断に応用でき、COBAS-ANA の 0.6 をカットオフ値とした時、IF-ANA とほぼ同等の性能で疾患特異的抗核抗体の存在を除外することができる。

以上のことから、COBAS-ANA は ANA のスクリーニング検査として有用であり、この検査の導入により、今まで IF-ANA に費やしてきた大きな労力と試薬コストを軽減できるであろう。今回、反応性の確認がされていない PCNA などの ANA への反応性の確認などさらなる検討が必要である。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第1924号	氏　名	林　伸英
論文題目	Detection of antinuclear antibodies by use of an enzyme immunoassay with nuclear HEp-2 cell extract and recombinant antigens: comparison with immunofluorescence assay in 307 patients. HEp-2細胞核抽出抗原およびリコンビナント抗原を用いた酵素免疫測定法による抗核抗体検出用試薬の有用性 -307例の膠原病患者における間接蛍光抗体法との比較-		
審査委員	主　査　南　康博 副　査　千原和夫 副　査　錦織千佳子		
審査終了日	平成 16 年 4 月 26 日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

論文題目

Detection of Antinuclear Antibodies by Use of an Enzyme Immunoassay

with Nuclear HEp-2 Cell Extract and Recombinant Antigens:

Comparison with Immunofluorescence Assay in 307 Patients

HEp-2 細胞核抽出抗原およびリコンビナント抗原を用いた
酵素免疫測定法による抗核抗体検出用試薬の有用性
—307 例の膠原病患者における間接蛍光抗体法との比較—

抗核抗体(ANA)は全身性エリトマトーデスをはじめとする膠原病の診断において最も重要な検査である。現在最も広範に行われている ANA スクリーニング検査は、ヒト喉頭癌由来培養細胞である HEp-2 細胞を核材として用いた間接蛍光抗体法（IF 法）である。IF 法は高感度で、その染色型からセントロメア抗体なども検出できる利点がある反面、特異度が低いこと、施設内および施設外変動が大きいこと、操作が煩雑で目視による判定に熟練を要することなどの問題点が指摘されている。そのような点から、簡便で再現性が良い酵素免疫測定法(EIA 法)による抗核抗体検査の開発が望まれてきた。そこで、申請者はロシュ社との共同研究で、新しく開発された HEp-2 細胞抽出抗原と複数のリコンビナント抗原をビーズ固相化したものを抗原とする EIA 法「Cobas® Core HEp2 ANA EIA」について、IF 法との感度・特異度を ROC 解析を用いて比較検討し、本検査法のスクリーニング検査としての意義および膠原病診断における有用性を評価した。

それぞれの診断基準を満たした全身性エリトマトーデス 111 例、シェーグレン症候群 36 例、強皮症 39 例、多発筋炎/皮膚筋炎 39 例、混合性結合組織病 33 例、関節リウマチ 49 例の合計 307 例の膠原病患者を対象とし、対照として厳選した健常人 492 例の血清を用いた。

まず健常人における陽性率を調べた。本法による ANA 陽性率は、女で 6.2%、男 3.8%、全体で 5.1%と、女性で有意に高値であった(P=0.042)。年齢との関係では女性で高齢になるに従って陽性率は上昇した(P=0.016)。また IF 法との比較では、1：40 の 26.8%よりは低く、1：160 の 8.1%とほぼ同程度であった。

次に各々の膠原病患者について、健常人を対照として ROC 解析を行った結果、感度・特異度の点で本法は IF 法と同等かそれ以上の性能であり、RA を除くすべての疾患での ROC 分析では本法の ROC 曲線は IF の曲線の左上に位置し、ROC 曲線下面積(AUC)の比較でも本法 0.94、IF 法 0.90 と診断精度において本法は IF 法より優れていた(P=0.005)。また、RA を除く膠原病と健常人を鑑別診断するためには、本法のカットオフ値は 0.9 が適切であることを ROC 曲線の解析から明らかにした。そのときの感度は 84%、特異度は 94%で、IF 法のカットオフ値 1:160 希釈としたときの感度 81%、特異度 87%と同等以上の性能があることが確認された。

疾患特異的抗核抗体は各種膠原病の診断に有用であり、その存在を的確に知ることは大変重要である。そこで本法が各種疾患特異的抗核抗体の存在をスクリーニングするため有用であるかどうかを検討する目的で、以下の検討を行った。8 種の特異的抗核抗体のいずれかが陽性を示した膠原病患者 207 例を対象として ROC 解析を行ったところ、本法ではカットオフ値を 0.6 に設定することにより、97.1%の感度でその存在を捉えることが可能であった。これは IF 法で 1:40 希釈としたときの感度 97.6%に匹敵するものであり、十分臨床応用できることを明らかにした。さらに、IF 法での染色型の異なる検体についての感度の検討を行った。染色型が単一で IF 法陽性検体、Homogeneous 型 36 例、Speckled 型 88 例、Nucleolar 型 6 例および Discrete speckled 型 10 例の検体を用いた検討では、カットオフ値を 0.6 と設定したときの感度はそれぞれ 78%、95% 、50%および 90%となり、本法は核小体に対する ANA への反応性が低率であることを明らかにし、本法の改良点について指摘した。

以上、本研究は新しく開発された EIA による抗核抗体検査法が、従来用いられている IF 法より感度・特異度の点、すなわち診断精度において優れていたことを ROC 解析を用いて客観的に証明したこと、また二つのカットオフ値を用いることにより臨床での応用性をより高めることができることを示した初めての論文であり、膠原病の診断について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。