総説

抗核抗体検査の自動化と国際ガイドラインの動向

今西　麻樹子[1)]　林　伸英[1)]

The automation and international guideline of the examination for antinuclear antibodies

Akiko IMANISHI[1)] and Nobuhide HAYASHI[1)]

要旨

抗核抗体検査は、自己免疫疾患の診断や病態の把握において重要である。HEp-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法は国際的に標準法と認められており、現在広く使用されているが、蛍光顕微鏡による鏡検が必要なため自動化が困難とされてきた。抗核抗体支援型自動判定システムが欧州を中心に開発されてはいるが、自動判定の確度は完全ではなく、最終的には判定者の確認が必要であるため、現時点では判定者を支援するシステムである。

ANA 染色型に関する国際的コンセンサス（ICAP）が公開されており、今後この新しい分類基準が採用されていくものと思われる。この中で Speckled 型判定において、Dense fine speckled 型を個別に判定することが示されたが、本邦では日常検査の中でこの分類はあまり浸透していない。しかし、Dense fine speckled 型の判定は抗 DFS70 抗体の存在を検出することにつながり、疾患特異的抗核抗体が共存しない抗 DFS70 抗体（単独）陽性症例ではかなりの確率で膠原病を否定できることがわかってきた。したがって、抗 DFS70 抗体を検出することは、これまで抗核抗体陽性という所見だけで必要以上に膠原病を疑われ、患者に不用意な警告を与えることを回避できる点で意義が高い。

キーワード：抗核抗体、間接蛍光抗体法、自動化、国際ガイドライン、抗DFS70抗体

Abstract

Antinuclear antibody (ANA) testing is indispensable for diagnosing and estimating clinical outocomes of autoimmune disease.

The indirect fluorescent antibody method using HEp-2 cells as a substrate has been accepted and is widely used internationally as the gold standard for ANA screening. However, it has been considered difficult to automate because it requires a visual interpretation using a fluorescence

1）保健科学部医療検査学科

microscope. Although the automatic judgment system for ANA testing has been developed mainly in Europe, is not accurate, and the examiner should confirm all decisions, currently rendering this tool as a system supporting laboratory staff. The international consensus on ANA patterns (ICAP) has been published and this new classification standard will likely be adopted in the future. The speckled pattern judgement section, is required to judge the dense fine speckled pattern individually, but in Japan, this classification is not generally used in routine examinations. However, the determination of the dense fine speckled pattern leads to the detection of the presence of the anti-DFS70 antibody, and it was found that the collagen disease can be denied with considerable probability in the positive case of the anti-DFS70 antibody (alone) not coexisting with the disease specific antinuclear antibody. Therefore identifying the anti-DFS70 antibody is important in diagnosis collagen disease,which is flasely suspected just by the ANA positive result, to avoid unnecessary distress for the patient.

Key words: antinuclear antibodies、indirect immunofluorescence assay、automation、international guideline、anti-DFS70 antibody

はじめに

抗核抗体とは、真核細胞の核内にある抗原（対応抗原は多種類）に対する抗体で、その検出は膠原病や自己免疫性肝炎などの自己免疫疾患の診断や病態の把握において重要である[1)]。抗核抗体検査はスクリーニングとしての検査と個々の疾患特異的抗核抗体検査に大別される。前者は国際的に標準法と認められているヒト喉頭癌由来培養細胞である HEp-2 細胞を基質（核材）とした間接蛍光抗体法（indirect immunofluorescence assay; IF 法）による抗核抗体検査が現在広く使用されているが、蛍光顕微鏡の鏡検による操作が必要で、自動化が困難とされてきた[2)]。後者はイムノアッセイ法が主流で自動化が進んでいる[3)]。

本稿では自動化の点でさまざまな問題点を抱えている IF 法による抗核抗体検査の自動化について[4)]、日常検査としての有用性および問題点について解説する。さらに自己抗体検査の国際ガイドラインの動向および最近注目されている抗 DFS70 抗体についても紹介する。

1．コンピュータ支援型自動判定システム

IF 法による抗核抗体検査は抗核抗体のスクリーニング検査として、現在広く使用されている。この方法は高感度で染色型から対応抗原が推定可能であり、抗細胞質抗体や抗核小体抗体も検出できる利点がある反面、健常人での陽性率が高い点、蛍光顕微鏡の性能や減光フィルターの使用の有無といったハード面に起因する施設間差の大きい点が問題となっている[5, 6)]。さらに､暗室を必要とする点、客観性に乏しい目視判定である点、鏡検に労力と熟練を必要するという欠点もある[7)]。

これらの問題を解決するために ELISA 法をはじめとする限定した核抗原を使用した検査が開発されてきたが、これらの代替検査は使用抗原の種類や量によって疾患特異的自己抗体への反応性に差がある[8)]。2013 年に欧州、米国の主要機関から抗核抗体を含めた自己抗体検査の国際ガイドライン（推奨される 25 事項）が提示された[9)]。この中で IF 法は抗核抗体のスクリーニングの標準法として位置づけられ、代替検査はスクリーニング検査と呼ぶべきではないと記されている。しかしながら、本邦で

はIF法を院内検査として実施している検査室は多くなく、それは煩雑な操作とコストパフォーマンスの低さ等が理由として挙げられる。このような背景から、IF法による抗核抗体検査の重要性が高まるとともに、用手法中心の本検査法の自動化への要求はさらに強くなり、欧州を中心に自動機器が開発された[10)]。

A. IF法による抗核抗体検査の原理と使用核材

IF法による抗核抗体検査の原理を図1に示す。1957年にFriouらが抗核抗体検査にIF法を応用して後、核材は臓器切片より変更され、現在ではより高感度なヒト喉頭癌由来培養細胞であるHEp-2細胞が使用されている。また、近年改良された細胞が現れている[4)]。例えば、抗SS-A/Ro抗体は対応抗原が核内外に存在し、HEp-2細胞を核材としたIF法では見落とすことがあるため、この欠点を補うためにヒト60kD SS-A/Ro抗原を形質移入して強

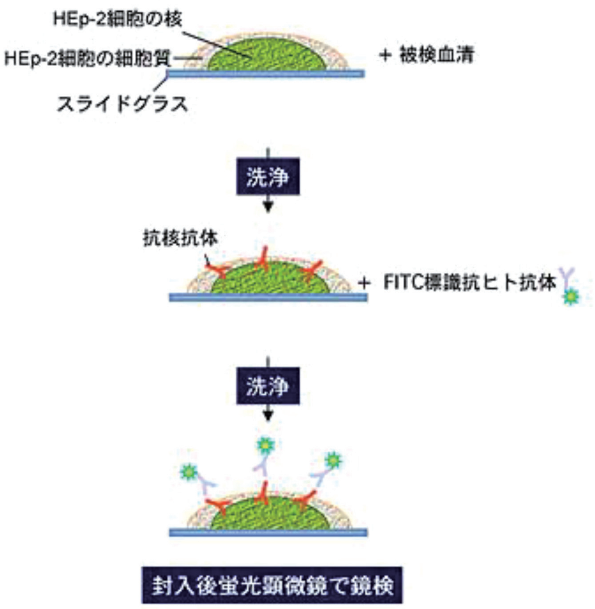


図1　間接蛍光抗体法の原理
1. 一次反応：スライドガラス上に固定、乾燥させたHEp-2細胞に希釈した被検血清（通常は40倍希釈から希釈系列を作成）を反応させる。
2. 二次反応：洗浄後、FITC標識抗ヒトIgG抗体を反応させる。
3. 鏡検：洗浄後、封入した標本を蛍光顕微鏡で観察し、陽性(核内に蛍光を認める)であれば、染色型と最終希釈抗体価を報告する。

発現させたHEp-2000®（Immuno Concepts, USA）が作られた。他にもHEp-20-10（Euroimmun AG, ドイツ）はHEp-2細胞と比較して染色型に大差はないものの、分裂期細胞が多いことが特徴である(HEp-2細胞と比較して約10倍の分裂期細胞)。これは、後述するEUROPattern（Euroimmun AG, ドイツ）に使用されている試薬で、自動で画像を撮影する時、一視野に分裂期細胞を複数個入らなければならないという必要性から作られた。

B. 自動判定システムの種類と性能

欧州で新たに開発されたコンピュータ支援型自動判定システムは、IF法で得られる標本画像を自動撮影し、撮影された画像から抗体価および染色型を自動で判定するシステムである（染色型自動判定のできない機種もある）。

2014年Bizzaroらは126例を対象に用手法を対照としてEUROPattern、AKLIDES（Medipan，ドイツ）、NOVA View（Inova Diagnostics, USA)、Zenit G-Sight（A. Menarini Diagnostics, イタリア)、HELIOS®（Aesku Diagnostics, ドイツ)、Image Navigator（Immuno Concepts, USA）の6機種を比較検討した[11)]。陰陽性一致率は機種間による差異なく（93～96%)、全体で95%と高率であった。染色型の判定はHELIOS®とImage Navigatorが自動ではない（モニター画面で判定者が確認する；ただし、HELIOS®は最近自動判定機能が搭載された）ため、染色型自動判定機能を有する4機種の比較となるが、染色型判定の一致率はEUROPatternで79%、AKLIDES、NOVA Vie、Zenit G-Sightで52～63%と染色型判定（特に混合型）についてはあまり信頼性がない。現時点ではこれらの機種は判定支援型システムであり、自動判定の確度は完全ではなく、最終的には判定者がすべてを確認する必要がある。

この6機種のうち、EUROPattern（図2A）とHELIOS®（図2C）が本邦に導入されており、抗核抗体陽性例92例における感度、健常者34例

における特異度は、それぞれEUROPatternで96.7%、85.3%、HELIOS®では97.8%、94.1%と良好であった[11]。EUROPatternはオプションの全自動EIA分析装置Sprinter XL（図2B）を使用すれば、染色操作を自動化できる（スライドの封入とEUROPatternへの搭載は用手で）[12]。HELIOS®は検体を搭載すれば、標本作製から封入液分注、画像取込までの過程を自動で行える[13]。林らが行った検討（膠原病282例）では、EUROPatternの自動判定の確度は陰陽性一致率98.9%、抗体価一致率（±1管差含む）97.4%、染色型の判定一致率55.3%であった[14]。陰陽性判定と抗体価判定には満足できるものの、染色型については大半を修正する必要があるため、判定の確度の向上が望まれる。しかし、判定者による確認後のEUROPattern最終検査結果の抗体価は対照法（用手法）との陰陽性一致率は93.3%、対照法との抗体価一致率（±1管差含む）94.0%および染色型判定の一致率（主な染色型で89.3～100%）が高いことがわかった[14]。また、各種膠原病患者および健常人における陽性率も対照法とほぼ同等であった。一方、HELIOS®の検討（対象161例）では、陰陽性一致率91.9%、抗体価一致率（±1管差含む）98.8%であった。

これらのシステムは判定者による確認と補正が必要ではあるものの、撮影した画像で判定を確認するため判定者が実際に顕微鏡をみる必要はなく、暗室が不要で、画像の保存が可能であることから、抗核抗体検査の自動化法として日常検査に適用でき、判定者の労務軽減や検査の省力化の面での有用性は高く、今後多くの検査室で使用されていくものと考えられる。また、このような自動化システムの導入は本邦における抗核抗体検査の標準化を進めるうえでの一助になると思われる。

A

B

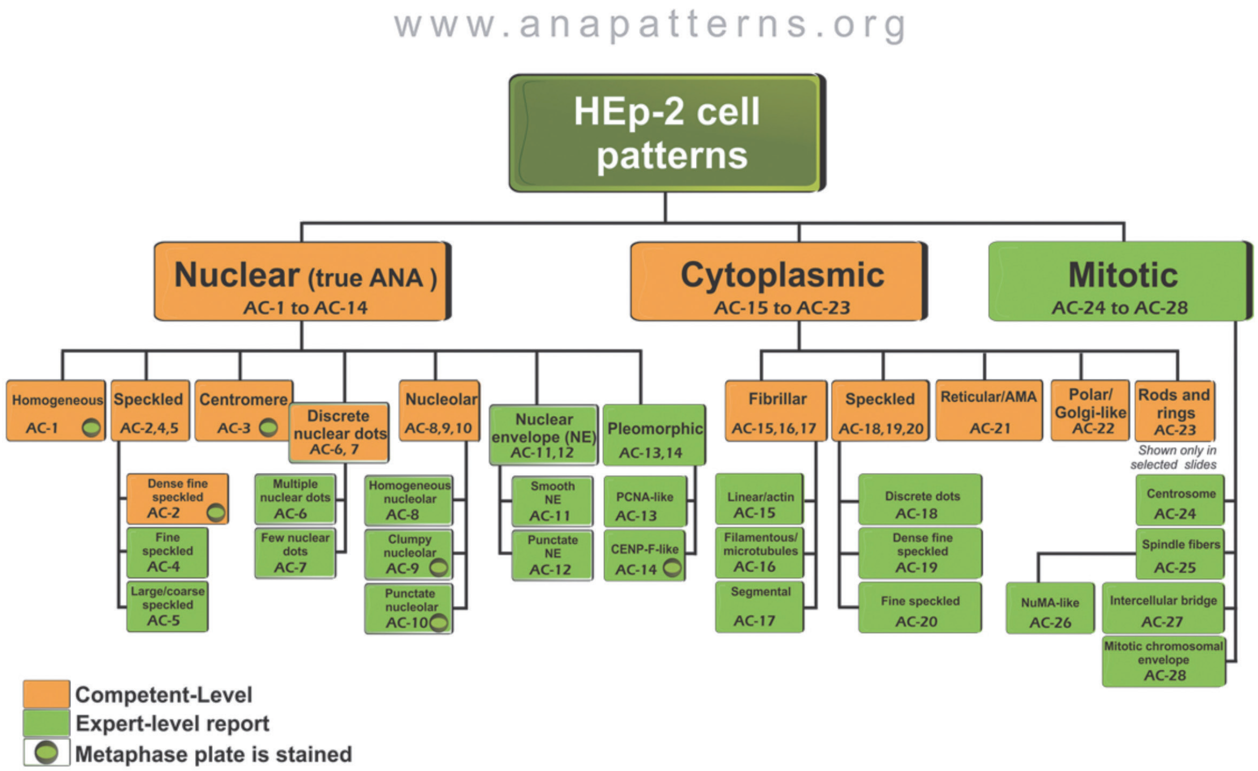
C

図2　コンピュータ支援型自動判定システム
　EUROPattern（A）、EUROPatternオプションの全自動EIA分析装置Sprinter XL（B）：共にEuroimmun AGより画像掲載許諾を得ている。
　HELIOS®（C）：医学生物学研究所（日本での販売元）より画像掲載許諾を得ている。

2．IWAA における国際的な ANA 染色型分類の動向

2016 年、第 13 回 IWAA（International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity）が京都で開催され、前回までの ANA 染色型に関する国際的コンセンサス（ICAP）の内容が支持された[15]。この染色型判定は ICAP のホームページ（https://www.anapatterns.org/nuclear_patterns.php）に公開されており、今後、日本語翻訳も追加される予定である。染色型別（AC-1 ～ AC-28）の写真が複数閲覧できるようになっており、染色型判定の際の助けとなる。今後、わが国においても、この新しい分類基準が採用されていくものと思われるが、この分類に習熟するには、判定能力のレベルアップを図る必要がある[16]。しかし、ICAP で抗核抗体に包括された抗細胞質抗体（Cytoplasmic）や分裂関連装置に対する抗体（Mitotic）は、本邦の薬事上の分類では抗核抗体に含まれない。今後の動向を注視する必要がある。

また、注目すべき染色型判定として、Speckled 型判定がある。ICAP の分類において、Speckled 型を coarse（きめの粗い）speckled と fine（きめの細かい）speckled および後述の Dense fine speckled 型（DFS 型）を個別に判定することが示されたが、本邦では日常検査の中でこの分類はあまり浸透していない[17]。



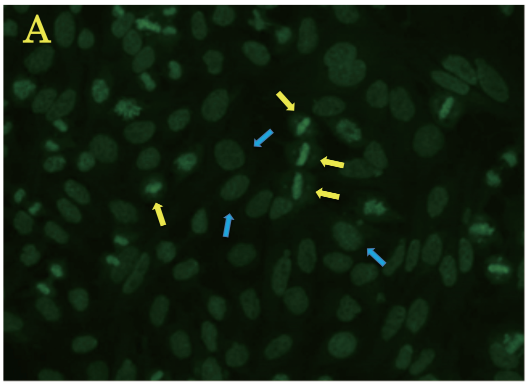
図ICAPツリー

図３　国際自己抗体と自己免疫に関するワークショップ（IWAA）における国際的な ANA 染色型分類ツリー（ICAP ツリー）http://www.anapatterns.org より引用
　オレンジ色カラムはルーチン検査レベルとして報告が必須とされ、緑色のカラムは専門家レベル（専門家のみが報告すべきレベル）として区別している。

3．抗 DFS70 抗体検出の重要性

抗 DFS70 抗体は、米国人の間質性膀胱炎患者血清中に含まれる新規の抗核抗体として初めて発見された。HEp-2 細胞を基質とした IF 法において、間期の細胞は核質が密に（dense)、細かく（fine)、斑紋状（speckled）に染色され、同様に分裂期染色体も染色されること、そして SDS-PAGE 上、対応抗原が 70kDa のタンパク質であったことから、抗 DFS70 抗体と命名された[18]。抗 DFS70 抗体は多くの膠原病での陽性率が低く、免疫遺伝学的に調べられた HLA クラスⅡハプロタイプは、膠原病関連自己抗体のものと抗 DFS70 抗体のものとは異なり、膠原病の関連性が否定されることを示唆している[19]。したがって、疾患特異的抗核抗体が共存しない症例では抗 DFS70 抗体（単独）陽性の場合はかなりの確率で膠原病を否定できる。このことは、抗 DFS70 抗体の検出がこれまで抗核抗体陽性という所見だけで必要以上に膠原病を疑われ、患者に不用意な警告を与え、不必要な検査を強いられることを回避できる点で意義が高い。しかし、抗 DFS70 抗体の検出は IF 法の染色型で分類するのが一般的であるものの、DFS 型は典型的な染色型を除いて、他の抗核抗体との共存により判定が難解な場合が多く（図 4)、検査室からの抗核抗体の染色型の報告として、「抗 DFS70 抗体」と判定せず、「Homogeneous ＆ speckled」として曖昧なまま報告されることが多い[19]。

近年、DFS 型の確認検査として、ELISA 法、イムノブロット法、DFS70 抗原をノックアウトした HEp-2 細胞による IF 法および DFS70 抗原吸収後の IF 法などの抗 DFS-70 抗体の検出法が開発されている[20),21]。前者 2 法は抗 DFS70 抗体の確認法であるのに対し、後者 2 法は抗 DFS70 抗体の有無と同時に、本来の抗核抗体の検査の特徴である染色型や抗体価が検査できる点において有用である。今後、日常検査として使用できる抗 DFS70 抗体検出法が淘汰されていくものと考えられる。



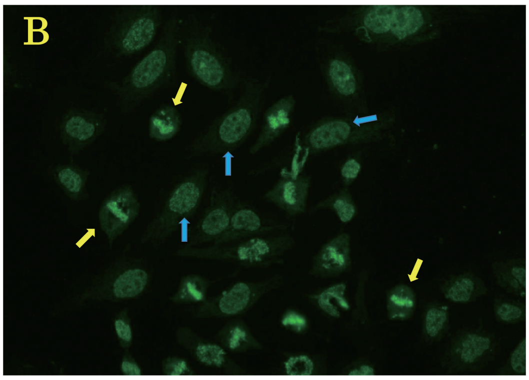


図４　IF 法による抗 DFS70 抗体の染色型（EUROPattern)
A：典型的な抗 DFS70 抗体の染色像
　間期核はモザイク状の染色（青矢印)、分裂核はクロマチン領域が染色される（黄色矢印)。
B：他の抗核抗体との共存による抗 DFS70 抗体の染色像
　間期核（青矢印）は粗い顆粒や細かい顆粒が認められ Speckled 型の特徴を認めるが、分裂核（黄色矢印）はクロマチン領域が染色されると同時に核質にも染色が認められることから、Homogeneous ＆ speckled 型と判定されることが多い。

4．最 後 に

抗核抗体検査の自動化および染色型判定の国際的コンセンサスについて述べた。本邦への国際的コンセンサスの導入は明確になっておらず、注視して動向を見守りたい。IF 法のコンピュータ支援型自動判定システムは、検査室の労務軽減やコストの削減に貢献し，多くの検査室で使用されてきている。検査室はこのような検査技術の進歩や改変を適宜取り入れて運用し、品質の高い検査を迅速に提供できるように努めなければならない。

文献

1）熊谷 俊一 , 林 伸英 , 河野 誠司 . 広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査：その数値をどう読むか . 第 7 版 , 日本臨床 . 2010, 68, 502-505.

2）林 伸英 , 熊谷俊一 . 抗核抗体検査の EIA の自動化法 . 検査と技術 . 2001, 29, 1412-1415.

3）新井次郎 .【自己抗体研究の新しい展開】自己抗体検査とその自動化の発展 .
臨床化学 . 2012, 41, 133-138.

4）林 伸英 .【The SLE】5.SLE 関連検査技術の現状 . 臨床検査 . 2016, 60, 722-728.

5）Hayashi N; Koshiba M; Nishimura K; Sugiyama D; Nakamura T; Morinobu S; Kawano S; Kumagai S. Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. Mod Rheumatol. 2008, 18, 153-160.

6）熊谷俊一 , 林 伸英 , 大田俊行 , 赤星 透 , 今福祐司 , 小柴賢洋 . 自己抗体検査の全国サーベイとそれに基づく標準化の検討 . 臨床病理 . 2009, 57, 31-41.

7）宮脇昌二 . 間接蛍光抗体法による抗核抗体検査の現状と問題点 . 日本臨床免疫学会会誌 . 1998, 21, 1-10.

8）Hayashi N; Kawamoto T; Mukai M; Morinobu A; Koshiba M; Kondo S; Maekawa S; Kumagai S. 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. Clinical chemistry. 2001, 47, 1649-1659.

9）Agmon-Levin N; Damoiseaux J; Kallenberg; C Sack U; Witte T; Herold M; Bossuyt X; Musset L; Cervera R; Plaza-Lopez A; Dias C; Sousa MJ; Radice A; Eriksson C; Hultgren O; Viander M; Khamashta M; Regenass S; Andrade LE; Wiik A; Tincani A; Rönnelid J; Bloch DB; Fritzler MJ; Chan EK; Garcia-De La Torre I; Konstantinov KN; Lahita R; Wilson M; Vainio O; Fabien N; Sinico RA; Meroni P; Shoenfeld Y. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. Ann Rheum Dis. 2014, 73, 17-23.

10）林 伸英 . 自己抗体検査の自動化について . 臨床病理 . 2016, 64（6）, 701-708.

11）Bizzaro N; Antico A; Platzgummer S; Tonutti E; Bassetti D; Pesente F; Tozzoli R; Tampoia M; Villalta D. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: a comparative study of six computer-aided diagnostic systems. Autoimmun Rev. 2014, 13（3）, 292-298.

12）Krause C; Ens K; Fechner K; Voigt J; Fraune J; Rohwäder E; Hahn M; Danckwardt M; Feirer C; Barth E; Martinetz T; Stöcker W. EUROPattern Suite technology for computer-aided immunofluorescence microscopy in autoantibody diagnostics. Lupus. 2015, 24, 516-529.

13）Shovman O; Agmon-Levin N; Gilburd B; Martins T; Petzold A; Matthias T; Shoenfeld Y. A fully automated IIF system for the detection of antinuclear antibodies and antineutrophil cytoplasmic antibodies.Immunol Res. 2015, 61, 135-140.

14）林 伸英 , 三枝 淳 , 生戸健一 , 大籔智奈美 , 齋藤敏晴 , 佐藤伊都子 , 河野誠司 , 熊谷俊一 . . 間接蛍光抗体法による抗核抗体検査コンピューター支援型顕微鏡システムの評価 . 臨床病理 . 2016, 64, 142-151.

15）Chan EK; Damoiseaux J; de Melo Cruvinel W; Carballo OG; Conrad K; Francescantonio PL;

Fritzler MJ; Garcia-De La Torre I; Herold M; Mimori T; Satoh M; von Mühlen CA; Andrade LE. Report on the second International Consensus on ANA Pattern（ICAP）workshop in Dresden 2015. Lupus. 2016, 25（8）, 797-804.

16）Damoiseaux J; von Mühlen CA; Garcia-De La Torre I; Carballo OG; de Melo Cruvinel W; Francescantonio PL; Fritzler MJ; Herold M; Mimori T; Satoh M; Andrade LE; Chan EK; Conrad K. International consensus on ANA patterns（ICAP）: the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. Auto Immun Highlights. 2016, Dec;7（1）:1. doi: 10.1007/s13317-016-0075-0. Epub 2016 Jan 30.

17）林伸英 , 三枝淳 . 一般社団法人日本臨床衛生検査技師会監修 .“免疫と疾患”自己免疫疾患 . 丸善出版 , 2017, 93-110.

18）Ochs RL; Muro Y; Si Y; Ge H; Chan EK; Tan EM. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other coditions. J.Allerty Cli. Immunol. 2000, 105, 1211 -1220.

19）室 慶直 , 村上昭弘 , 瀬戸美苗 , 喜多祥一 . 抗DFS70 抗体の臨床的意義と新たに開発された測定系 . 医学と薬学 . 2008, 59（2）, 257-262.

20）Bentow C; Rosenblum R; Correia P; Karayev E; Karayev D; Williams D; Kulczycka J; Fritzler MJ; Mahler M. Development and multi-center evaluation of a novel immunoadsorption method for anti-DFS70 antibodies. Lupus. 2016, 25, 897-904.

21）Malyavantham K; Suresh L. Analysis of DFS70 pattern and impact on ANA screening using a novel HEp-2 ELITE/DFS70 knockout substrate. Autoimmunity Highlights. 2017, 8:3. Doi: 10.1007/s13317-017-0091-8.