

# The Evaluation of immunoadsorption method for anti-DFS70 antibodies by indirect immunofluorescence assay of antinuclear antibody

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 林, 伸英, 今西, 麻樹子, 生戸, 健一, 三枝, 淳, HAYASHI, Nobuhide, IMANISHI, Akiko, UTO, Kenichi, SAEGUSA, Jun メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.20608/00001143">https://doi.org/10.20608/00001143</a>

報告

## 免疫吸収処理を用いて抗DFS70抗体を除外する 間接蛍光抗体法による抗核抗体検査の評価

林 伸英<sup>1)</sup> 今西 麻樹子<sup>1)</sup> 生戸 健一<sup>2)</sup> 三枝 淳<sup>2) 3)</sup>

### The Evaluation of immunoadsorption method for anti-DFS70 antibodies by indirect immunofluorescence assay of antinuclear antibody

Nobuhide HAYASHI<sup>1)</sup>, Akiko IMANISHI<sup>1)</sup>, Kenichi UTO<sup>2)</sup>, and Jun SAEGUSA<sup>2) 3)</sup>

#### 要旨

抗 DFS70 抗体を DFS70 抗原で免疫吸収処理後に間接蛍光抗体法 (IF 法) を実施する検査を検討した。健康人 247 名を対象とし、抗核抗体陽性率を従来の IF 法と本法を比較し、従来の IF 法と本法による DFS 型判定と ELISA 法による抗 DFS70 抗体の有無を比較する。さらに、抗 DFS70 抗体を吸収処理後の健康人の抗核抗体陽性率を調べた。

抗核抗体の陽性率は従来の IF 法、本法で、それぞれ 15.0%、19.8% であった。本法での免疫吸収未処理の陽性例は 49 例、免疫吸収処理後の陽性例は 38 例と、抗核抗体陽性数が 11 例減少した。DFS 型出現頻度は従来の IF 法、本法で、それぞれ 9.7%、12.6% であった。しかし、免疫吸収処理後で DFS 型を示した例があった。

本法は、DFS 型の検出を抑制する点で IF 法の検査法として有用であるが、DFS70 抗原での吸収処理は不十分であるかもしれない。

キーワード：抗核抗体、間接蛍光抗体法、抗DFS70抗体、吸収処理、健康人

#### Abstract

We investigated a reagent kit for performing the indirect immunofluorescence assay (IF) on a sample after immunoabsorption of anti-DFS70 antibody with DFS70 antigen.

The positivity rate of antinuclear antibody (ANA) was compared between the conventional IF and this method in 247 healthy individuals(HI), and the DFS pattern by the conventional IF and this method was compared with the presence of anti-DFS70 antibody by enzyme-

---

1) 保健科学部医療検査学科 2) 神戸大学医学部附属病院検査部 3) 神戸大学大学院医学研究科臨床検査医学

linked immunosorbent assay (ELISA). Furthermore, the ANA positivity rate of HI after immunoabsorption with anti-DFS70 antibody was examined.

The ANA positivity rate by the conventional IF and this method were 15.0% and 19.8%, respectively. Forty-nine cases were positive without immunoabsorption, and 38 cases were positive after immunoabsorption, with the number of ANA positives decreasing by 11 cases.

The frequency of the DFS pattern was 9.7% and 12.6% in the conventional IF and this method, respectively. However, there were cases that showed DFS pattern after immunoabsorption.

Although this method is useful as an IF method that suppresses the detection of DFS pattern, immunoabsorption with the DFS70 antigen may not be sufficient.

Key words: antinuclear antibodies, immunofluorescence assay, DFS70, immunoabsorption, healthy individuals

## はじめに

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な検査で、現在 HEp-2 細胞（ヒト喉頭癌由来培養細胞）を核材とした間接蛍光抗体法（IF 法）が広く使用されている<sup>1)</sup>。

2014 年に IF 法による抗核抗体検査の染色型分類国際的コンセンサス（ICAP）が提示され、通常の染色型判定の Speckled 型分類において Dense fine speckled 型（DFS 型）を個別に判定することが強く推奨された<sup>2)</sup>。しかし、抗 DFS70 抗体の有無は 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<sup>3)</sup>、臨床検査室からの抗核抗体の染色型は、「DFS 型」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<sup>4,5)</sup>。

抗 DFS70 抗体は健常人での陽性頻度が高く、実際の臨床の場に混乱を招く一因になっている<sup>6,7)</sup>。また、抗 DFS70 抗体陽性かつ膠原病に関連する自己抗体が陰性であれば（抗 DFS70 抗体単一陽性）、膠原病の可能性が低いとするようなアルゴリズムを推奨している<sup>8)</sup>。抗 DFS70 抗体を検出し、除外して IF 法を判定することは、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い、患者に不必要な検査を強いることを回避できる点において重要である。

近年、DFS 型の確認検査として、ELISA 法、イムノドット法、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 DFS70 抗体の検出法が開発されている<sup>9,10)</sup>。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、IF 法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。

この度、抗 DFS70 抗体を DFS70 抗原で免疫吸収処理した後に IF 法を実施する検査を従来の IF 法と比較して、その有用性を評価するとともに、抗 DFS70 抗体を吸収処理した後の健常人の抗核抗体陽性率を調べた。

## 材料および方法

### 1. 対象

神戸大学病院職員健診で特に異常の認められなかった健常人 247 例（年齢中央値 24 歳；範囲 21-62 歳；男性 123 名，女性 124 名）の血清を健常人として使用した。試料は血清分離後、-40℃以下

で保存した。なお、本研究は本学倫理委員会（承認番号：神常大研倫第19-16号）および神戸大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認（承認番号：1467）を得て実施した。

## 2. 機器および試薬

抗DFS70抗体をDFS70抗原で吸収処理した後にIF法を実施する検査「INOVA Lite<sup>®</sup> HEp-2 Select<sup>®</sup> Kit with DAPI」（INOVA社、米国、以下本法）は、DFS型に影響されずに染色型を判定できるというコンセプトの元に開発されたキットである。本法での免疫吸収未処理の検査は別販売されている（「INOVA Lite<sup>®</sup> HEp-2 ANA kit」（INOVA社、米国）と同一で、通常のIF法にあたる。

抗DFS70抗体の確認検査は、昆虫細胞発現系蛋白を抗原としたELISA法による抗DFS70抗体検査「DFS70 ELISA Kit」（医学生物学研究所：MBL社、以下ELISA法）を使用した<sup>7,11)</sup>。従来のIF法による抗核抗体の測定には、コンピューター支援型顕微鏡システムEUROPattern（EUROIMMUN AG、ドイツ、以下EPA）を使用し、試薬としてPremune HEp20-10 FANA（EUROIMMUN AG、ドイツ、以下従来のIF法）を用いた<sup>12,13)</sup>。

## 3. 方法

健常人247名を対象とし、従来のIF法と本法で抗核抗体の陽性率を比較した。また、従来のIF法によるDFS型と本法およびELISA法による抗DFS70抗体の有無を比較検討した。

### A. 検討試薬

本法は免疫吸収処理した試料にIF法を実施する測定法であるが、今回は抗DFS70抗体の有無を評価するために、免疫吸収処理した試料と未処理の試料での最終的に得られた蛍光輝度を画像処理用プログラムで処理し、両者の輝度を比較した。

操作説明書に従って、①予め血清を免疫吸収処理液（DFS70抗原を含む検体希釈液）で1：80希

釈し、室温で30分間インキュベートしてDFS70抗体を吸収させた試料およびPBS緩衝液で1：80希釈した試料を用意した。②処理した試料を湿潤箱でHEp-2細胞基質スライドと室温30分間インキュベートし、PBS緩衝液で洗浄しB/F分離した。③FITC標識抗ヒトIgG抗体と室温30分間インキュベートした後に非結合FITC標識抗ヒトIgG抗体を洗い流した。④封入剤とともにカバーガラスで封入し、蛍光顕微鏡Eclipse 800（ニコン社、励起フィルター：B2-A）で鏡検した（図1）。目視判定は2人の検者で協力して同時に判定した。染色型にかかわらず核内に蛍光を認めない場合を陰性、認める場合を陽性と判定した。

添付文書の指示通りに、精度保証はアッセイ毎に次のように実施し確認した。①ANA陽性コントロール、陰性コントロール、DFS70陽性コントロール（免疫吸収処理液で処理した1：80希釈試料およびPBS緩衝液で1：80希釈した試料）を被検試料と同時にアッセイした。②陰性コントロールは、基質への反応が見られない。③ANA陽性コントロールは、homogeneous型で輝度3+以上を示す。④PBS緩衝液で1：80希釈したDFS70陽性コントロール試料は、DFS型で輝度1+～2+を示す。（間期核および分裂中期クロマチンの染色特徴の確認）⑤免疫吸収処理液で処理したDFS70陽性コントロールは、基質への反応が見られない（陰性）。

今回の検討では⑤処理後陽性コントロールにおいて、完全に陰性化していないアッセイもみられた。

1：80希釈試料において、陽性を示した検体については免疫吸収処理前後の試料の画像を次のように撮影し計測した。①顕微鏡に設置したデジタルCCDカメラC7780（浜松フォトニクス）で画像を撮影した。②画像を画像解析ソフトウェアWinROOF2018（三谷商事）に取り込んだ。③免疫吸収処理前と免疫吸収処理後の画像をRGB分離し、緑色画像の間期核（10個）の平均輝度（ピクセル）を計測した。④免疫吸収処理前後の平均輝度を比

較した。

## B. ELISA 法

操作説明書に従って、用手法によって操作し、吸光度は垂直透過型のマイクロプレート用分光光度計を用い、index 値 15 以上を抗 DFS70 抗体陽性とした<sup>11,13)</sup>。陽性例には ELISA 法測定系の抗原による抑制試験を実施した。

## C. 従来の IF 法

EPA は操作者に対する支援型顕微鏡システムで、その染色型判定の正確さは以前報告したように 55.3% であるため、判定能力のある技師によって自動判定画像を確認する必要がある<sup>13)</sup>。IF 法は、EPA の自動判定された画像を技師 2 人で陰陽性の判定 (1:40 希釈カットオフ)、染色型および抗体価を確認し、EPA の自動判定が間違えていると判断した場合は修正した<sup>13)</sup>。基本的な染色型に加えて、DFS 型判定も行った。DFS 型判定は、ICAP で示された AC-2 を参考とし、間期核全体的に観察される DFS 型に特徴的なモザイク状の斑点染色 (不均一な斑点サイズ、不均一な輝度および不均一な密度) を示し、有糸分裂核のクロマチン領域に同様

の染色 (濃密で不均一な斑点) が見られる典型的な染色像 (図 2, 3) を DFS 型とし (分類アルゴリズムと代表的な画像はこのサイトで利用可能である [www.ANApatterns.org](http://www.ANApatterns.org))、典型的でない染色像は判定不能とした。

## D. 統計解析

カイ 2 乗検定、比率の差の検定には StatFlex (アーテック, ver.7, 日本) を用い、有意水準は  $p < 0.05$  を有意とした。

## 結果

### 1. 従来の IF 法による抗核抗体

従来の IF 法による抗核抗体は 247 例中 37 例 (男性 8 例、女性 29 名) が陽性を示し、抗核抗体陽性率は 15.0% であった (表 1)。

### 2. 本法による抗核抗体

本法での免疫吸収未処理 (通常の IF 法にあたる) が陽性を示した例は、247 例中 49 例 (男性 15 例、女性 34 名) で、抗核抗体陽性率は 19.8% であった (表 1)。

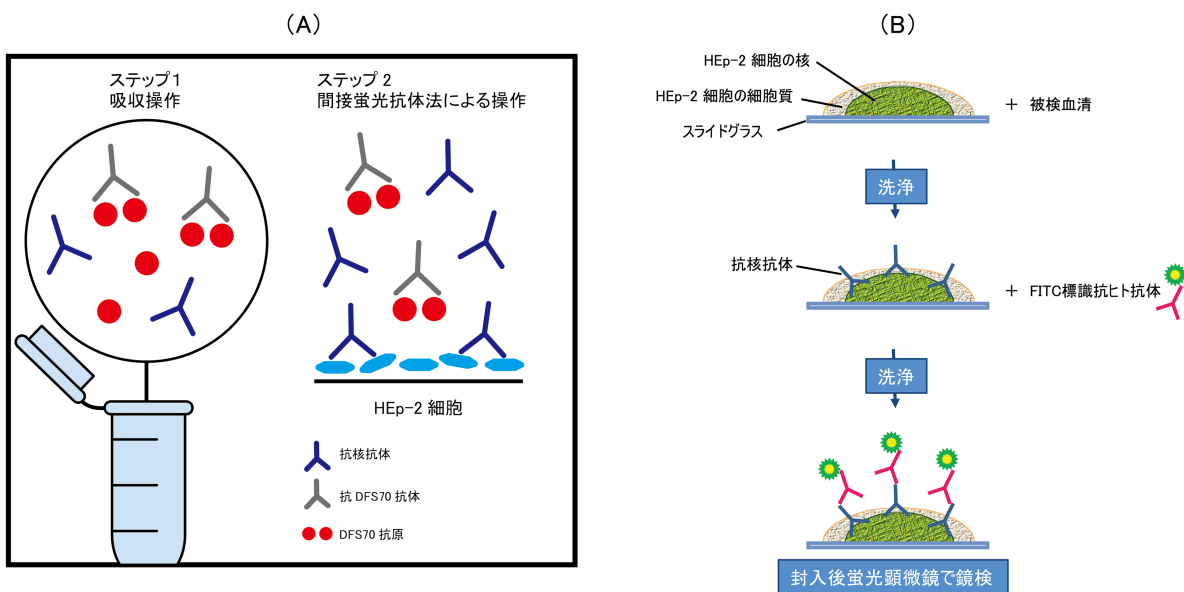


図 1 本法の操作手順を示す。  
免疫吸収処理の操作手順 (A)、通常の IF 法操作手順 (B)。

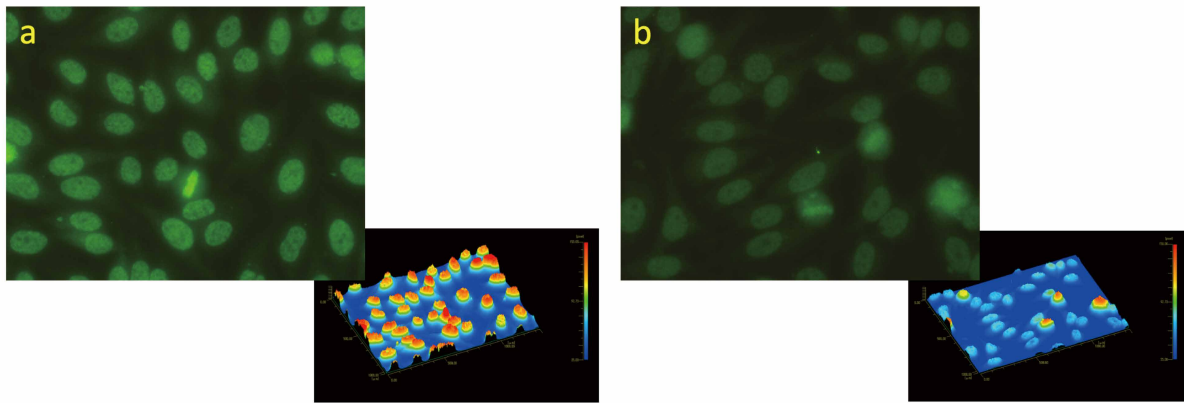


図2 健常人血清（抗 DFS-70 抗体単一陽性検体）による染色像の比較 吸収 IF 法（吸収前：a, 吸収後：b）  
 a では、間期核はモザイク状の染色、分裂核はクロマチン領域が染色される。  
 b では、間期核は染色されず、ほぼ陰性を示した。  
 ※緑色の輝度強度を色別に WinROOF による三次元解析で表示した。

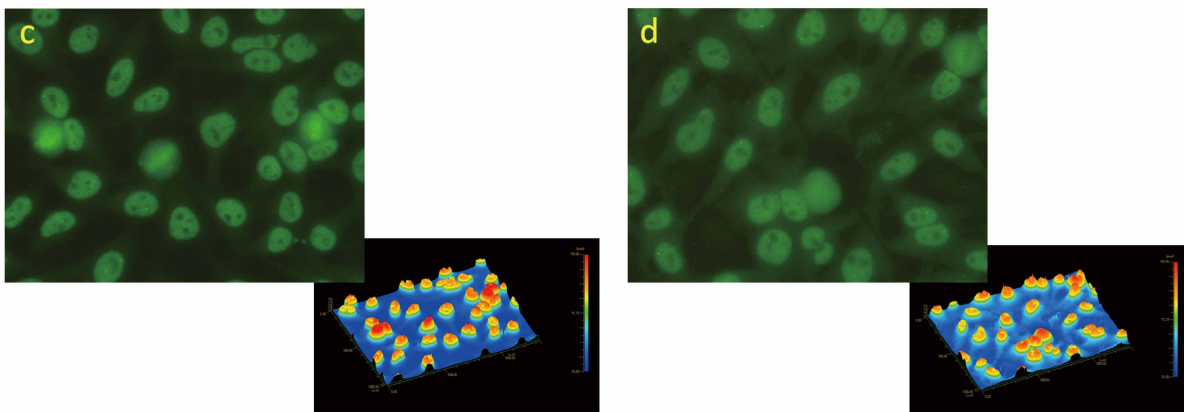


図3 健常人血清（抗 DFS-70 抗体と他の染色型混在）による染色像の比較 吸収 IF 法（吸収前：c 吸収後：d）  
 c では、間期核はモザイク状の染色、分裂核はクロマチン領域が染色される。  
 d では、DFS 型特有のモザイク状の染色が消え、Speckled 型染色像（クロマチン領域）が現れた。  
 ※緑色の輝度強度を色別に WinROOF による三次元解析で表示した。

表 1 抗核抗体および抗 DFS 抗体の陽性数と陽性率の比較

測定法	検体数	抗核抗体		抗DFS70抗体			
		陽性	陽性率(%)	陽性	陰性	判定不能	陽性率(%)
従来のIF法	247	37	15.0	24	11	2	9.7
本法	247	49	19.8	*32	17	0	13.0
ELISA法	247	—	—	38	209	0	15.4

抗DFS70抗体陽性：従来のIF法は染色型により判定し、本法は輝度に10%以上の減少がみられた例とした。

\* 試料の20倍希釈により免疫吸収処理後の輝度の減少がみられた1例を含む。

### 3. 従来のIF法によるDFS型出現頻度

従来のIF法による抗核抗体が陽性を示した37例のうち、染色型がDFS型を示した例は24例（男性5例、女性19名）であり、全体のDFS型出現頻度は9.7%（24/247）であった。なお、DFS型判定不能例が2例あり、2例ともELISA法による抗DFS70抗体は陽性であった（表1）。

### 4. 本法による抗DFS70抗体出現頻度

本法での免疫吸収未処理の陽性例は49例、免疫吸収処理後の陽性例は38例と、抗核抗体陽性数が11例減少した。吸収が認められ抗核抗体が陰性となった11例は、すべて免疫吸収処理後の輝度に10%以上の減少がみられ、ELISA法も陽性であった。免疫吸収処理後で抗核抗体陽性を示した38例のうち、処理後の輝度に10%以上の減少がみられたのは（他のANA陽性+DFS型）20例、輝度に10%以上の減少がみられなかったのは18例（他のANAのみ陽性）であった（図4）。処理後の輝度の減少がみられた20例のうち、ELISA法陽性が17例、陰性が3例であった。輝度に減少がみられなかった18例のうち、ELISA法陽性が3例あったが、そのうちの1例（ELISA法Index 109.0と高

抗体価）は試料を20倍希釈して免疫吸収処理後の輝度を測定すると、19.3%の輝度の減少がみられた（表1）。最終的に本法で吸収が認められた例（抗DFS70抗体陽性）は32例であったが、免疫吸収処理後で抗核抗体陽性を示した38例中、DFS型（染色型）を示した例が15例あった。

### 5. ELISA法による抗DFS70抗体出現頻度の比較

ELISA法による抗DFS70抗体では、247例中38例（男性15例、女性23名）が陽性を示し、出現頻度は15.4%であった（表1）。ELISA法陽性38例に抑制試験を実施したところ、全例で50%以上の阻害を示した。

従来のIF法DFS型判定および本法の免疫吸収処理前後で輝度に10%以上の減少があった例を抗DFS70抗体陽性とする、ELISA法陽性38例中、従来のIF法では24例、本法では32例を捉えられ（20倍希釈で10%以上の減少があった1例を含む）、その抗DFS70抗体捕捉率は、それぞれ63.2%（24/38）、84.2%（32/38）であった（ $p=0.04$ ）（表2）。

## 考察

本法は、用手法による間接蛍光抗体法の操作を実施した後に蛍光顕微鏡を使って目視で鏡検を実施する方法および専用の自動蛍光顕微鏡システムNOVA View<sup>®</sup>（Inova、米国）を使用して画像解析から判定する方法がある<sup>4,14</sup>。今回はNOVA View<sup>®</sup>を使用できなかったため、用手法を実施して得られた蛍光顕微鏡画像を画像解析ソフトウェアに取り込み、免疫吸収処理前と比較して免疫吸収処理後の輝度に10%以上の減少がみとめられた例を抗DFS70抗体陽性として判定した。

ELISA法陽性例において抑制試験を実施したところ、すべての検体で50%以上の阻害が得られたことから、ELISA法をゴールドスタンダードとして従来のIF法で得られたDFS型と本法での抗

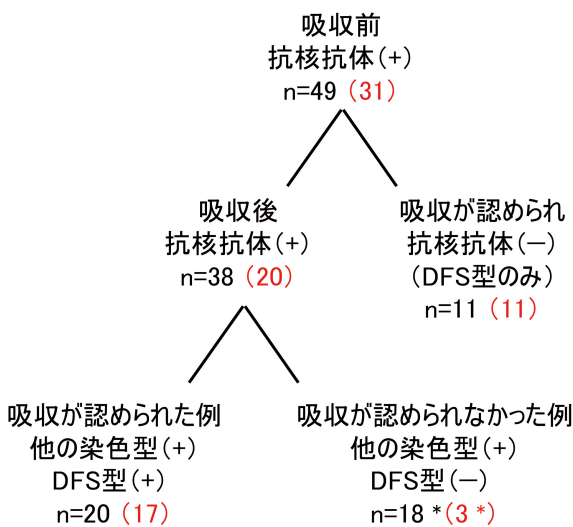


図4 本法における吸収処理前後の症例数  
赤字はELISA法陽性例を示す。  
\*試料の20倍希釈により免疫吸収処理後の輝度の減少がみられた1例を含む。

表2 本法、従来のIF法およびELISA法におけるデータの比較

No.	性別	年齢	従来のIF法				本法					ELISA法	
			抗核抗体判定	染色型DFS型	その他染色型	抗体価	吸収前	吸収後	抗DFS70抗体	その他染色型	輝度減少率	定性	
53	M	30										-	15.5
63	F	37	+	+	Ho	80						-	27.2
116	F	38										-	25.4
133	M	23										-	16.3
164	M	36										-	17.9
167	M	22										-	19.7
178	M	27										-	15.0
45	F	25	+	+	Ho+Sp	40	+		+			29.8	53.3
67	M	27					+		+			32.9	26.5
68	F	26	+	+	Ho+Sp	40	+		+			38.0	44.0
79	F	31	+	+	Ho+Sp	40	+		+			32.4	42.7
100	M	31	+	+	Ho+Sp	40	+		+			25.8	33.8
168	M	23					+		+			28.7	28.7
174	M	22					+		+			33.7	19.3
175	M	21	+	+	Ho	80	+		+			36.9	44.5
186	M	28					+		+			24.6	22.9
187	M	39					+		+			24.7	37.9
237	M	23	+	+	Ho	40	+		+			29.0	33.6
10	F	21					+	+	+	Ho+Sp		18.5	1.2
25	F	23	+	+	Ho+Sp	80	+	+	+	Ho+Sp		40.9	66.0
26	F	22	+	+	Ho+Sp	40	+	+	+	Ho+Sp		26.0	58.8
49	F	29	+	+	Ho+Sp	160	+	+	+	Ho+Sp		15.3	31.9
59	M	35	+	+	Ho+Sp	80	+	+	+	Ho+Sp		11.3	56.3
65	F	30	+	判定不能	Ho+Sp	80	+	+	+	Ho		21.7	26.0
77	F	50	+	+	Ho+Sp	80	+	+	+	Ho+Sp		41.2	69.7
89	F	34	+	+	Ho+Sp	320	+	+	+	Ho+Sp		16.1	101.4
92	F	58	+	+	Ho+Sp	40	+	+	+	Ho+Sp		37.0	56.2
109	F	22	+	+	Ho+Sp	40	+	+	+	Ho+Sp		18.6	57.6
119	M	27					+	+	+	Sp		19.6	1.0
120	F	23	+	判定不能	Ho+Sp	160	+	+	+	Ho+Sp+Gra		24.0	78.8
124	F	30	+	+	Ho+Sp	160	+	+	+	Ho+Sp		26.0	50.0
129	F	41	+	+	Ho+Sp	160	+	+	+	Ho+Sp		16.5	78.4
134	F	22	+	+	Ho+Sp	160	+	+	+	Ho+Sp		22.7	96.6
140	F	22	+	+	Ho+Sp	320	+	+	+	Ho+Sp+Gra		12.4	69.0
204	M	22	+	+	Gra+Ho	40	+	+	+	Ho+Sp+Gra		41.0	66.7
223	F	21					+	+	+	Ho+Sp		11.6	30.5
226	F	22	+	+	Ho+Sp	160	+	+	+	Ho+Sp		39.0	49.6
231	F	21					+	+	+	Ho		10.1	1.1
127	F	28	+	+	Ho+Sp	160	+	+	+	Ho+Sp		*6.5	109.7
2	F	24					+	+		Ho+Sp		3.7	1.4
3	F	46			Sp		+	+		Sp		0.0	1.4
11	M	22	+		Ho+Gra	160	+	+		Ho+Sp+Gra		0.0	8.3
15	M	40			Gra		+	+		Sp+Gra		9.2	0.2
18	F	23	+		Ho+Sp	80	+	+		Ho		8.3	1.7
40	F	24					+	+		Ho		0	0.0
41	F	35	+		Ho	160	+	+		Sp		0	5.8
86	F	25	+	+	Ho+Sp	320	+	+		Ho+Sp+Gra		0.3	89.9
99	F	50					+	+		Ho+Sp		9.4	2.7
161	F	23					+	+		Ho		0	0.2
182	M	22					+	+		Ho+Sp		3.6	0.4
199	M	22					+	+		Sp+Gra		2.0	2.6
201	F	23	+		Nu	320	+	+		Ho+Sp		0	6.8
206	F	22	+	+	Ho+Sp	160	+	+		Ho+Sp		4.7	63.7
224	F	21					+	+		Ho		0	0.7
228	F	22					+	+		Sp		9.4	1.1
230	F	22	+		Ho+Sp+Nu	160	+	+		Ho+Nu		7.2	0.6

抗核抗体染色型 Ho : homogeneous 型, Sp : speckled 型, Gra : granular 型  
 従来のIF法は染色型(DFS型)により判定し、本法は輝度に10%以上の減少がみられた例を抗DFS70抗体陽性とした。

\* 試料の20倍希釈により免疫吸収処理後の輝度の減少がみられた1例



DFS70 抗体を比較した。

本邦における一般的な検査室で行われている IF 法による抗核抗体検査は、蛍光顕微鏡での検鏡時に減光フィルターを使用するなどして、従来から検査室毎に感度の調整が行われてきた<sup>4,13)</sup>。今回使用した EPA システムは、本邦導入時に ANA 標準血清 (66/233 NIBSC 英国) を使って、感度および陰陽性一致性の確認が行われ、一般的な検査室の感度に合わせられている<sup>13)</sup>。本法での蛍光顕微鏡への取り込みには、減光フィルターを使用せず、目視と同様の画像が取り込めるように設定した。今回の従来の IF 法と本法の比較検討において、この画像取り込みの感度差のバイアスがあることを考えなければならない。従来の IF 法による抗核抗体陽性率は 15.0% と比較して本法での抗核抗体陽性率の 19.8% と高率となった原因と考えられる。

IF 法による抗核抗体陽性率は、従来の IF 法 (1:40 希釈カットオフ) で抗体陽性率は 15.0% で、本法 (1:80 希釈カットオフ) での免疫吸収未処理 (通常の IF 法にあたる) での抗核抗体陽性率は 19.8% であった (表 1)。Tan らは、世界中の 15 の機関の健常人における IF 法による抗核抗体の基準範囲を調査し、ラボ内およびラボ間でばらつきがあったものの 31.7% (1:40 希釈カットオフ) を報告している<sup>15)</sup>。我々が報告した IF 法による日本人健常人での抗核抗体陽性率は 26.8% (132/492) であり<sup>16)</sup>、ラボ間、HEp-2 細胞の固定法など基質の違いおよび蛍光顕微鏡の設定の違いによって、抗核抗体陽性率は大きく異なる。

本法は、DFS70 抗原で吸収処理した後に IF 法を実施できる特徴があり、抗 DFS70 抗体の存在に影響されずに染色型を判定できるコンセプトの元で開発されたキットである。C Bentow らは本試薬の開発時に基本的染色型 4 種類を示す検体に抗 DFS70 抗体陽性検体を段階的に混合した試料を免疫吸収処理前後で比較し、混合前の染色型にもどること、他施設から集めた検体 (n=99) は吸収により輝度が低下すること (中央値の減少 87.0 vs. 14.0

LIU;  $p < 0.0001$ ) を確認している<sup>9)</sup>。ただし、健常人は 11 例しか使用していない。本検討は病院職員 247 名を健常人として使用し、吸収前後での抗核抗体の陽性率を示している点で評価できる。

本法での免疫吸収処理後に DFS 型 (染色型) を示したものが 15 例あったこと (データは示していない)、吸収されなかった試料 1 例 (ELISA 法高抗体価) をさらに希釈した試料で吸収が確認されたことから、本法の DFS70 抗原での吸収処理は、不十分であるかもしれない。また、ELISA 法高抗体価で、吸収されなかった試料 2 例 (No.86 と No.206) は、さらに希釈した試料で再検すれば、吸収した可能性がある。一方、本法陽性で ELISA 法陰性の 3 例 (No.10 と No.119 と No.231) は、輝度減少率が 10 ~ 20% と低率であったが、本法の偽陽性である可能性が高い。

しかし、吸収処理が完全でないとしても、吸収処理後で抗核抗体陽性が 11 例減少し、抗核抗体陽性が 38 例になり、抗核抗体陽性率 15.4% と低率に抑えられている点は有用であると考えられる。これは本法の操作説明書に書かれている本法 (用手法) での抗核抗体陽性率 15.7% (13/83) とほぼ一致していた<sup>17)</sup>。

さらに、ELISA 法の感度が IF 法より高く、ELISA 法による抗 DFS70 抗体陽性の 38 例のうち、従来の IF 法で捕捉できなかった例が 12 例、判定不能 2 例、本法で捕捉できなかった例は 7 例であったが、従来の IF 法 63.2% (24/38) と比較して、本法が、84.2% (32/38) と抗 DFS70 抗体捕捉率が高率の結果であった。

膠原病患者では多数の疾患特異的抗体が存在し、高抗体価の検体が存在することから、その存在下で本法の吸収処理が影響を受けるのかは興味深い。今後、本法での免疫吸収処理後で吸収が得られなかった試料の希釈再検および他の疾患特異的抗体が高抗体価の膠原病患者検体でのさらなる検討を行いたい。

COI について：本研究において開示すべき利益相反状態はない。

## 謝辞

本研究は、平成 30 年度神戸常盤大学テーマ別研究「抗 DFS70 抗体を除外した間接蛍光抗体法の評価」として研究助成を受けました。

## 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 (第 7 版) その数値をどう読むか. 日本臨床. 2010, 68, 502-505.
- 2) Damoiseaux J.; von Mühlén 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.
- 3) 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.
- 4) 今西麻樹子, 林伸英. 抗核抗体検査の自動化と国際ガイドラインの動向. 神戸常盤大学紀要. 2019, 12, 1-8.
- 5) 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.
- 6) Mariz, HA.; Sato, EI.; Barbosa, SH.; Rodrigues, SH.; Dellavance, A.; Andrade, LE. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2011, 63(1),191-200.
- 7) Mahler, M.; Parker, T.; Peebles, CL.; Andrade, LE.; Swart, A.; Carbone, Y.; Ferguson, DJ.; Villalta, D.; Bizzaro, N.; Hanly, J.G.; Fritzler, M.J. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol*. 2012, 39(11), 2104-2110.
- 8) Conrad, K.; Röber, N.; Andrade, LE.; Mahler, M. The Clinical Relevance of Anti-DFS70 Autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017, 52, 202-216.
- 9) Bentow, C.; Rosenblum, R.L.; Correia, P.; Karayev, E.; Karayev, D.; Williams, D.; Kulczycka, J.; Fritzler, M.J.; Mahler, M. Development and multi-center evaluation of a novel immunoadsorption method for anti-DFS70 antibodies. *Lupus*. 2016, 25(8), 897-904.
- 10) 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(1):3. Doi: 10.1007/s13317-017-0091-8.
- 11) 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.
- 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) 林伸英, 三枝淳, 生戸健一, 大藪智奈美, 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.
- 14) 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.
- 15) Tan, EM.; Feltkamp, TEW.; Smolen, JS.; Butcher, B.; Dawkins, R.; Fritzler, MJ.; Gordon T.; Hardin, JA.; Kalden, JR.; Lahita, RG.; Mainirn, J.; Mcdougal, S.; Rothfield, NF.; Smeenk, RJ.; Takasaki, Y.; Wiik, A.; Wilson, MR.; Koziol, JA.. Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis Rheum.* 1997, 40, 1601-1611.
- 16) Hayashi, N.; Kawamoto, T.; Mukai, M.; Morinobu, A.; Koshiha, 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(9), 1649-1659.
- 17) NOVA Lite<sup>®</sup> HEP-2 Select<sup>®</sup> Kit with DAPI 操作説明書.