

関節リウマチにおけるリウマチ因子と他の血清マーカーの有用性の検討

樋浦一哉,^{a,b} 江川(岩城)祥子,^{*,b} 松野博明,^{c,d} 渡辺泰裕^b

The Examination of Rheumatoid Factor and Other Serum Markers in Rheumatoid Arthritis

Kazuya HIURA,^{a,b} Sachiko IWAKI-EGAWA,^{*,b} Hiroaki MATSUNO,^{c,d} and Yasuhiro WATANABE^b
*Obihiro Kosei Hospital,^a West 6, South 8, Obihiro 080-0016, Japan, Hokkaido Pharmaceutical University
School of Pharmacy,^b 7-1 Katsuraoka-cho, Otaru 047-0264, Japan, Department of Biomedical
Engineering, Toin University of Yokohama,^c and Yokohama General Hospital,^d 1614
Kurogane-cho, Aoba-ku, Yokohama 225-8502, Japan*

(Received June 28, 2005; Accepted August 1, 2005; Published online August, 4, 2005)

Rheumatoid factor (IgM-RF) has been widely used to diagnose rheumatoid arthritis (RA) in clinical practice. We investigated the RA diagnostic performances of anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), anti-agalactosyl IgG antibody (CA · RF), and anti-calpastatin antibody (ACA) in comparison with IgM-RF. Among 68 RA patients, IgM-RF was positive in 31 (45.6%) and negative in 37 (54.4%). In the IgM-RF-positive group, positivity in anti-CCP, CA · RF, and ACA was 97%, 100%, and 97%, respectively, although that in MMP-3 (74%) was inferior to the others. On the other hand, in the IgM-RF-negative group, positivity in anti-CCP, MMP-3, and ACA was 73%, 81%, and 86%, respectively, although that in CA · RF was only 59%. We conclude that the combination of IgM-RF and anti-CCP/ACA will provide an accurate diagnosis of RA in clinical practice.

Key words—rheumatoid arthritis; rheumatoid factor; cyclic citrullinated peptide; anti-calpastatin antibody

緒 言

関節リウマチ (RA) は一般的にアメリカリウマチ学会 (ACR) による RA 改定分類診断基準 (1987) により診断される。¹⁾ しかし、臨床的症状及びレントゲン検査が診断基準の7項目中6項目を占め、臨床症状がまだ顕著に現れていない早期の RA を十分に診断することができないという問題点が指摘されている。ACR 診断基準の中の1項目であるリウマチ因子 (IgM-RF) は、RA 患者の約60—80%が陽性を示す血清学的検査であり、現在でも RA 診断において中心的な存在である。しかし、RF の疾患特異性は低く、全身性エリテマトーデス (SLE)、シェーグレン症候群 (Sjögren) などの膠原病でも20—50%の患者が陽性を示し、変形性関節症 (OA) でも約10%の患者が陽性となる。²⁾ また健常者でも5%が陽性を示し、高齢者になると陽

性の比率はさらに高くなることが知られており、RA の診断を行う上で問題となっている。²⁾

RA は、各種酵素の働きにより軟骨が変性破壊されることにより関節が変形する自己免疫疾患である。軟骨破壊に関与する酵素はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、³⁾ セリンプロテアーゼ、⁴⁾ システインプロテアーゼ^{5,6)} の3種に大別できるが、カルパインはこの中のシステインプロテアーゼに相当する。カルパインは RA で炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF- α) や IL-1 の刺激により、滑膜線維芽細胞などから産生され、軟骨プロテオグリカンの分解を促している。⁷⁾

一方カルパインの活性は、内因性の特異的阻害タンパク質であるカルパスタチンによって制御されている。近年 RA において、このカルパスタチンに対する自己抗体 (抗カルパスタチン自己抗体, ACA) の存在が明らかとなり、⁸⁾ RA 血清中の ACA の定量はカルパスタチンの C 末アミノ酸残基を抗原とした ELISA 法により行われてきたが、感度、特異度ともに低いものであった。^{9,10)} そこで筆者らはより感度が高く、RA の診断的価値の高い測定法の開発

^aJA 北海道厚生連帯広厚生病院, ^b北海道薬科大学医療薬学科病態科学分野, ^c桐蔭横浜大学先端医用工学センター, ^d横浜総合病院
e-mail: sachiko@hokuyakudai.ac.jp

に取り組み、赤血球カルパスタチンを抗原とした ELISA 法を確立した。¹¹⁾今回 ACA を含め、近年 RA 診断の指標と考えられている抗シトルリン化環状ペプチド抗体 (α -CCP), 抗ガラクトース欠損 IgG 抗体 (CA・RF), MMP-3 と IgM-RF の有用性を比較検討した。

対象と方法

RA 血清 ($n=68$) は、横浜総合病院より譲渡された。なお、RA は ACR 診断基準に従い診断され、本学臨床研究倫理委員会及び桐陰横浜大学の倫理審査を経ている。また健常者血清 ($n=20$) は、北海道赤十字血液センターに研究申請を出し認可された後、譲渡された。譲渡された血清は、使用まで -80°C 又は -30°C で保存した。RA と確定診断された 68 症例を対象とし、IgM-RF 測定を行い、RF 陽性群、RF 陰性群に分類し、各群について他の血清マーカーの測定を行った。測定値は平均 \pm 標準偏差 (ave \pm S.D.) で表した。測定に用いた ELISA キットは、IgM-RF: Rheumatoid Factor IgM (Organic Diagnostika, Germany), α -CCP: Immunoscan RA (Euro-Diagnostica, The Netherlands), MMP-3

: パナクリア MMP-3 (第一化学薬品, 東京), CA・RF: エイテスト CA・RF (三光純薬, 東京) を用いた。また抗カルパスタチン抗体の測定はヒト赤血球型カルパスタチン (Calbiochem, Germany) を用いて当研究室で改良した ELISA 法により測定した。¹¹⁾カットオフ値は ELISA キットのマニュアルに従った。

結 果

1. IgM-RF 測定 IgM-RF が陽性を示した RA 症例は 45.6% ($n=31$), 陰性を示したのが 54.4% ($n=37$) であり、ave \pm S.D. はそれぞれ 172.9 ± 116 IU/ml, 7.1 ± 5.6 IU/ml であった (カットオフ値: 20 IU/ml) (Fig. 1)。なお図には示さないが、健常者は 3.2 ± 0.1 IU/ml であった。

2. α -CCP 測定 α -CCP では、RA における感度は 83.8% (57/68) であった。RF 陽性群 ($n=31$) の感度は 96.8% (30/31), RF 陰性群 ($n=37$) では 73.0% (27/37) であり、ave \pm S.D. はそれぞれ 418.3 ± 208.4 U/ml, 271.6 ± 241.3 U/ml であった (カットオフ値: 25 U/ml, 健常者 10.4 ± 1.5 U/ml) (Fig. 2)。

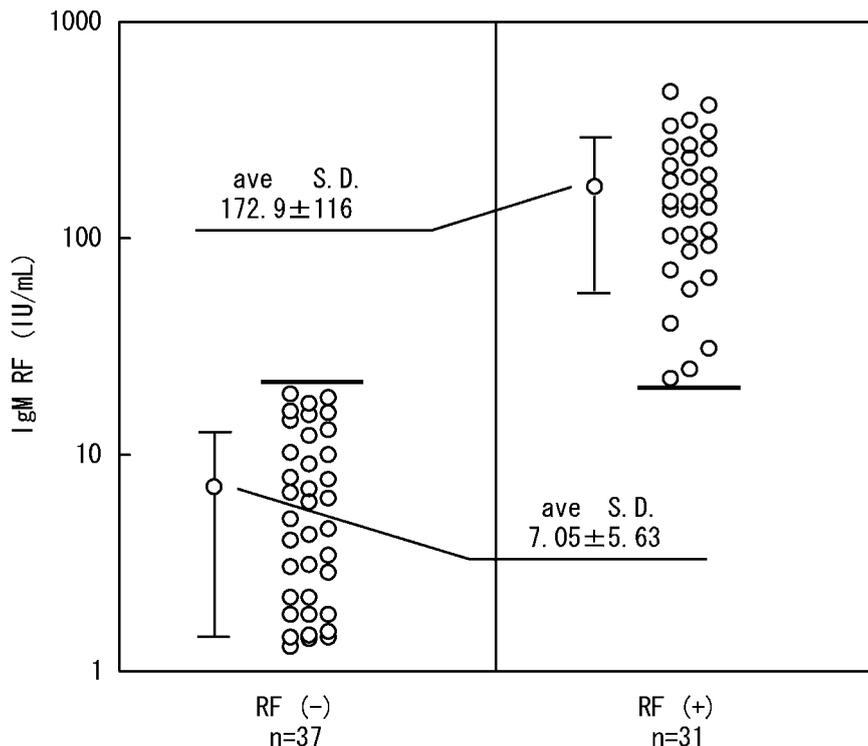


Fig. 1. Comparison of Serum Levels of IgM-RF in RA Patients Divided from the Cut-off Value
Small bar (—) shows the cut-off value.

3. CA・RF 測定 CA・RF では, RA における感度は 77.9% (53/68) であった. RF 陽性群 ($n=31$) の感度は 100% (31/31), RF 陰性群 ($n=37$) では 59.5% (22/37) であり, $ave \pm S.D.$ はそれぞれ 65.4 ± 26.1 U/ml, 13.4 ± 13.4 U/ml であった (カットオフ値: 6 U/ml, 健常者 1.2 ± 0.4 U/ml) (Fig.

3).

4. MMP-3 測定 健常者の血清 MMP-3 値は他の血清マーカーと異なり, 男性の方が女性よりも高値を示す傾向にあるため, MMP-3 のデータ解析は男女に分けて行った. MMP-3 では, RA における感度は 77.9% (53/68 (男性 $n=7$, 女性 $n=61$))

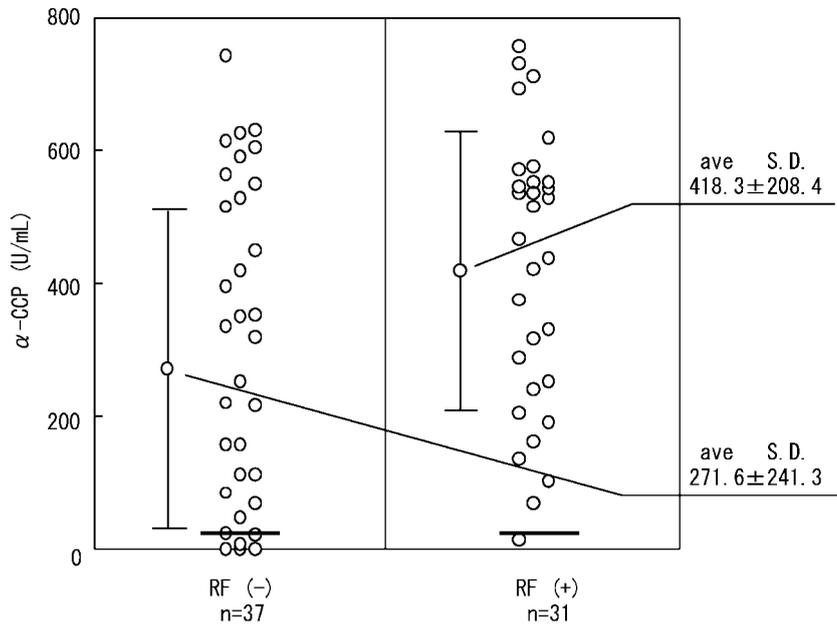


Fig. 2. Comparison of Serum Levels of α -CCP in RF Positive and Negative Groups
Small bar (—) shows the cut-off value.

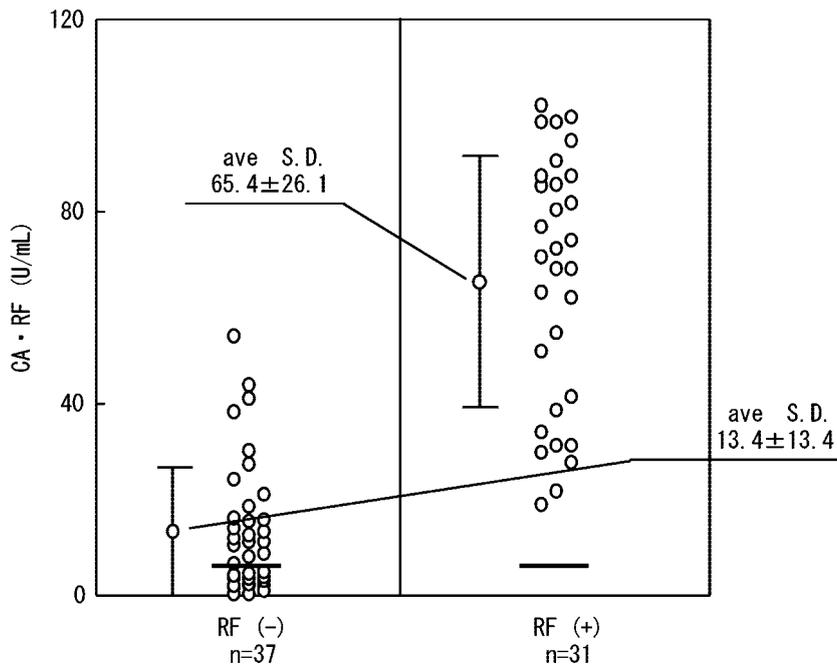


Fig. 3. Comparison of Serum Levels of CA・RF in RF Positive and Negative Groups
Small bar (—) shows the cut-off value.

であった。RF 陽性群 ($n=31$, 男性 $n=3$, 女性 $n=28$) の感度は 74.2% (23/31 (男性 $n=1$, 女性 $n=22$)), RF 陰性群 ($n=37$, 男性 $n=4$, 女性 $n=33$) では 81.1% (30/37 (男性 $n=3$, 女性 $n=27$)) であり, ave±S.D. は各群それぞれ男性 202.0±158.5 ng/ml, 女性 124.6±92.8 ng/ml, 男性 369.1±422.4 ng/ml, 女性 287.3±290.4 ng/ml であった (カットオフ値: 男性 121 ng/ml, 女性 59.7 ng/ml, 健常者 42.2±6.3 ng/ml) (Fig. 4).

5. ACA 測定 ACA では, RA における感度は 91.2% (62/68) であった。RF 陽性群 ($n=31$) の感度は 96.8% (30/31), RF 陰性群 ($n=37$) では 86.5% (32/37) であり, ave±S.D. はそれぞれ 0.23±0.09, 0.17±0.07 であった (Fig. 5)。なお, カットオフ値は, 健常者血清から得られた吸光度 (0.10±0.03) の ave+2S.D. (0.106) に定めた。

6. RF 陽性群 ($n=31$) の統計解析 RF 陽性群 (Table 1) について χ^2 独立性の検定 $m \times n$ 分割表を用いて解析を行った。α-CCP, MMP-3, CA・RF, ACA の 4 群間での解析では, 陽性率に差がみられたが (χ^2 値 17.84 > χ^2 値 (0.95) 7.81, 危険率 0.05 > p 値 (上側確率) 0.00047), α-CCP, CA・RF, ACA の 3 群間での解析では, 陽性率に差がみられなかった (χ^2 値 1.02 < χ^2 値 (0.95) 5.99, 危険

率 0.05 < p 値 (上側確率) 0.60)。以上より RF 陽性群では, 自己抗体マーカー (α-CCP, CA・RF, ACA) が MMP-3 より高陽性率であることが明らかとなった。

7. RF 陰性群 ($n=31$) の統計解析 RF 陰性群 (Table 1) について χ^2 独立性の検定 $m \times n$ 分割表を用いて解析を行った。α-CCP, MMP-3, CA・RF, ACA の 4 群間での解析では, 陽性率に差がみられたが (χ^2 値 8.18 > χ^2 値 (0.95) 7.81, 危険率 0.05 > p 値 (上側確率) 0.042), α-CCP, MMP-3, ACA の 3 群間での解析では, 陽性率に差がみられなかった (χ^2 値 1.02 < χ^2 値 (0.95) 5.99, 危険率 0.05 < p 値 (上側確率) 0.60)。以上より RF 陰性群では, α-CCP, MMP-3, ACA が CA・RF より高陽性率であることが明らかとなった。

考 察

RA の診療では, RA であるかどうかという鑑別診断と病態がどの程度進行するのかという予後予想が重要であり, これは他の全身性自己免疫疾患の診療においても共通に言えることである。また感度 100%, 特異度 100% という理想的な検査法は今のところ存在していない。

IgM-RF は IgG の Fc 部分に存在する抗原決定基

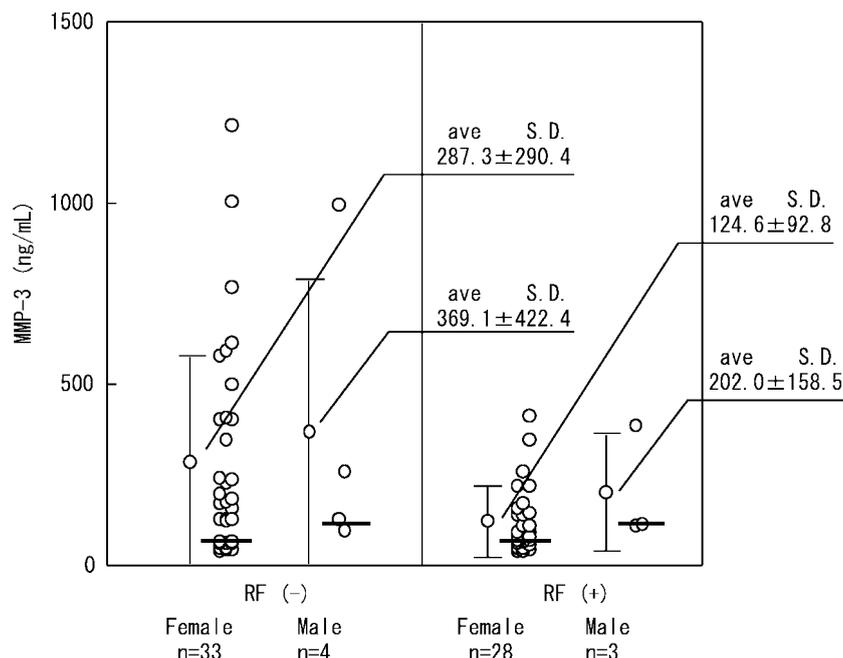


Fig. 4. Comparison of Serum Levels of MMP-3 in RF Positive and Negative Groups
Small bar (—) shows the cut-off value.

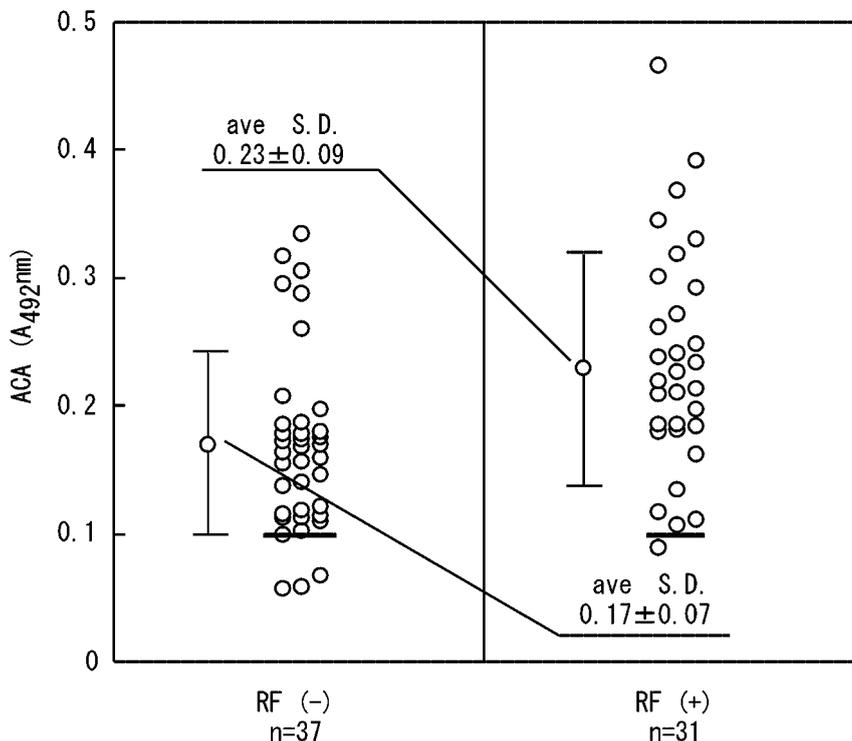


Fig. 5. Comparison of Serum Levels of ACA in RF Positive and Negative Groups
Small bar (—) shows the cut-off value.

Table 1. Positivity Rates of Other Serum Markers in RF Positive and Negative Groups

		α -CCP (+)	MMP-3 (+)	CA · RF (+)	ACA (+)
RF positive group n=31	n	30	23	31	30
	%	97%	74%	100%	97%
RF negative group n=37	n	27	30	22	32
	%	73%	81%	59%	86%

Chi-square for independence test m × n contingency table was used for analysis.

と反応する自己抗体であるが、その特異度の低さから RF が陽性であっても RA とは診断できず、また健常者において RF が陽性であっても将来かならずしも RA を発症する訳ではない。

MMP-3 は経過の長い RA だけではなく、関節破壊の進行が早い RA では早期から血清値が高値となることがあり、また X 線所見との間に強い相関がみられることから、RA の関節破壊進行の予後予測において注目されている。¹²⁾ しかし、鑑別診断においては RA 以外に SLE、強皮症などでも高値が認められ、RA に特異的なマーカーとは言えず、他の

指標と合わせて総合的に診断する必要性がある。^{13,14)}

CA · RF は、RA 患者の血清中の IgG の糖鎖にはガラクトースが選択的に欠損していることから、この糖鎖異常が RA の発症や RF の産生に関与していることが考えられている。また CA · RF は IgM-RF よりも感度が高く、早期 RA や IgM-RF 陰性 RA での陽性率も高いと報告されたが、強皮症患者などでも高値を示し、やはり特異性に問題があることが知られている。¹⁵⁾

最近発見された α -CCP は、人工的に環状化したシトルリン化ペプチドに対する抗体を測定するもので、第二世代 (アミノ酸配列未発表) の α -CCP は感度も IgM-RF に匹敵し、また特異度も 90% 以上と高いことで知られる。早期 RA 患者の診断及び予後予測に有用であるとの報告も盛んに行われており、現在最も期待されている血清マーカーの 1 つである。¹⁶⁻¹⁸⁾

一方、RA 血清中の ACA の定量はこれまでも Western blotting 法やカルパスタチンの C 末アミノ酸残基を抗原とした ELISA 法により行われてきたが、その感度は 9-57% とあまり高いものではなか

った.^{9,10)}しかし筆者らの研究室で最近開発した赤血球カルパスタチンを抗原とした ELISA 法による RA 血清中の抗体価の測定は感度, 特異度とも RF を凌ぐものであった.¹¹⁾

このような背景のもとに, より有用な RA 血清マーカーの組み合わせを見出すことを目的とした。その結果, RF 陽性群では α -CCP, CA・RF, ACA が MMP-3 より高陽性率であり, また RF 陰性群では α -CCP, MMP-3, ACA が CA・RF より高陽性率であったことから, RA 診断基準に挙げられている RF に α -CCP, 又は ACA などの自己抗体測定を組み合わせたことが有用であると推察された。なお, RF と CA・RF 間には血清中の IgG に対する抗体を測定するという共通点から数値間に相関関係がみられたが, α -CCP, MMP-3, ACA と RF 間には相関関係はなく, 各々独立したパラメータであることが分かった (data not shown)。また実験結果には示さなかったが, ACA, α -CCP の特異度は各々 96.1%,¹¹⁾ 95.6% と, 従来 RF で報告されている特異度よりも高い値を示すことを確認している。

近年 ACR の診断基準よりも α -CCP を項目に含む診断基準の方が優れていることを示唆する報告もあり, 今回の実験で α -CCP と同等の結果を示した ACA についても, 疾患活動性との関連性等についてさらに研究を進める必要性があるものの, 今後大いにその利用が期待できると考えている。

RA 診断は, 医師の診察技量, 経験に頼るところが大きく, 特に早期 RA に至っては, 熟練した専門医でも難しいのが現状である。簡便かつ客観的に判断できる高感度, 高特異度の血清マーカーを用い, 早期に RA 診断ができるようになることが有用ではないかと考えている。境界型 RA や早期 RA, 病態の進行度合での自己抗体の変動についてさらに検討していくことが今後の課題と言える。

REFERENCES

- 1) Arnett F. C., Edworthy S. M., Bloch D. A., McShane D. J., Fries J. F., Cooper N. S., Healey L. A., Kaplan S. R., Liang M. H., Luthra H. S., Medsger Jr. T. A., Mitchell D. M., Neustadt D. H., Pinals R. S., Schaller J. G., Sharp J. T., Wilder R. L., Hunder G. G., *Arthritis Rheum.*, **31**, 315-324 (1988).
- 2) Mageed R.A., "Manual of Biological Markers of Disease," section B1., eds. by van Venrooij W. J., Maini R. N., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996, pp. 1-27.
- 3) Woessner J. F. Jr., *FASEB J.*, **5**, 2145-2154 (1991).
- 4) Huet G., Flipo R. M., Richet C., Thiebaut C., Demeyer D., et al., *Clin. Chem.*, **38**, 1694-1697 (1992).
- 5) Lenaric B., Babrijelcic D., Rozman B., Drobnic-Kosorok M., Turk V., *Biol. Chem., Hoppe-Seyler*, **369**, 257-261 (1988).
- 6) Huet G., Flipo R. M., Colin C., Janin A., Hemon B., Collyn-d'Hooghe, M., Lafyatis, R., Duquesnoy, B., Degand, P., *Arthritis Rheum.*, **36**, 772-780 (1993).
- 7) Fukui I., Tanaka K., Murachi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 559-566 (1989).
- 8) Mimori T., Suganuma K., Tanami Y., Nojima T., Matsumura M., Fujii T., Yoshizawa T., Suzuki K., Akizuki M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7267-7271 (1995).
- 9) Lackner K. J., Schlosser U., Lang B., Schmltz G., *Br. J. Rheumatol.*, **37**, 1164-1171 (1998).
- 10) Vittecoq O., Salle V., Jouen-Beades F., Krzanowska K., Menard J. F., Gayet A., Fardellone P., Tauveron P., Le Loet X., Tron F., *Rheumatology (Oxford)*, **40**, 1126-1134 (2001).
- 11) Iwaki-Egawa S., Matsuno H., Yudoh K., Nakazawa F., Miyazaki K., Ochiai A., Hirohata S., Shimizu M., Watanabe Y., *J. Rheumatol.*, **31**, 17-22 (2004).
- 12) Tchetterikov I., Lard L. R., DeGroot J., Verzijl N., TeKoppele J., Breedveld F. C., Huizinga T. W., Hanemaaijje R., *Ann. Rheum. Dis.*, **62**, 1094-1099 (2003).
- 13) Kotajima L., Aotsuka S., Fujimani M., Okawa-Takatsuji M., Kinoshita M., Sumiya M., Obata K., *Clin. Exp. Immunol.*, **138**, 357-363 (2004).
- 14) Nishijima C., Hayakawa I., Matsushita T., Komura K., Hasagawa M., Takehara K., Sato S., *Clin. Exp. Immunol.*, **138**, 357-363 (2004).
- 15) Nishijima C., Sato S., Takehara K., *J. Rheumatol.*, **28**, 1847-1851 (2001).
- 16) Bizzaro N., Mazzanti G., Tonutti E., Villalta D., Tozzoli R., *Clin. Chem.*, **47**, 1089-1093

- (2001).
- 17) Goldbach-Mansky R., Lee J., McCoy A., Hoxworth J., Yarboro C., Smolen J. S., Steiner G., Rosen A., Zhang C., Menard H. A., Zhou Z. J., Palosuo T., Van Venrooij W. J., Eilder R. L., Klippel J. H., Schumacher Jr. H. R., El-Gabalawy H. S., *Arthritis Res.*, **2**, 236–243 (2000).
- 18) Visser H., Le Cessie S., Vos K., Breedveld F. C., Hazes J. M., *Arthritis Rheum.*, **46**, 357–365 (2002).