

新たに保険収載された多発性筋炎・皮膚筋炎の検査法： 抗アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) 抗体について

Detection of autoantibodies to multiple aminoacyl-tRNA synthetases (ARS) by a single ELISA in polymyositis/dermatomyositis; a laboratory test newly approved by the national health insurance system in Japan

やま さき よし おき やま だ ひで ひろ さ とう みのる
山 崎 宜 興¹⁾ : 山 田 秀 裕¹⁾ : 佐 藤 実²⁾
Yoshiaki YAMASAKI Hidehiro YAMADA Minoru SATOH

はじめに

多発性筋炎 (Polymyositis : PM) は四肢近位筋や頸部筋の対称性筋力低下を特徴とする全身性炎症性筋疾患である。筋炎に加え、上眼瞼の浮腫を伴う青紫色の皮疹 (ヘリオトロープ疹)、膨隆した紫色の落屑性の皮疹を伴う手指関節伸側の紅斑 (Gottron 徴候) など特徴的な皮膚症状を伴った場合を皮膚筋炎 (Dermatomyositis : DM) と呼ぶ。PM/DM はしばしば生命予後に影響を与えるような肺、心臓などの重要臓器病変や悪性腫瘍を合併するため、早期の適確な診断、治療が求められる^{1,2)}。炎症性筋疾患で最も代表的な PM/DM の原因はいまだに不明であるが、その発症には自己免疫機序が関与していると考えられ、患者血清中には細胞成分に対するさまざまな自己抗体が検出される³⁾。

PM/DM で検出される自己抗体は、筋炎特異的自己抗体 (myositis-specific autoantibodies ; MSA) と筋炎関連自己抗体 (myositis-associated autoantibodies ; MAA) の2つに分類される⁴⁾。このうちアミノアシル tRNA 合成酵素 (aminoacyl tRNA synthetase ;

ARS) に対する自己抗体 (抗 ARS 抗体) は PM/DM で最も高頻度 (25-40%) に検出される MSA である。歴史的には、1980 年に Nishikai らが PM 患者血清に抗 Jo-1 抗体を発見し⁵⁾、Mathews らがその対応抗原がヒスチジル tRNA 合成酵素であることを報告した⁶⁾。以後、抗 PL-7 (スレオニル tRNA 合成酵素) 抗体⁷⁾、抗 PL-12 (アラニル tRNA 合成酵素) 抗体⁸⁾、抗 EJ (グリシル tRNA 合成酵素) 抗体⁹⁾、抗 OJ (イソロイシル tRNA 合成酵素) 抗体¹⁰⁾、抗 KS (アスパラギニル tRNA 合成酵素) 抗体¹¹⁾ が同定された。さらに最近になり 1 例報告ではあるが抗 Zo (フェニルアラニル tRNA 合成酵素) 抗体¹²⁾、抗 Ha (チロシル tRNA 合成酵素) 抗体¹³⁾ がそれぞれ発見され、これまで計 8 種類の抗 ARS 抗体が報告されている (表 1)。抗 ARS 抗体陽性患者は筋炎に加え間質性肺炎が高頻度にみられるなど共通した臨床的特徴を有する¹⁴⁾。この事は抗 ARS 抗体の産生に至る何らかの共通した病態が臨床症状の発現と深くかかわっていることが推測され病因論的にも興味深いところである。抗 ARS 抗体の測定は筋炎の診断・治療方針決定の補助としても有用であるが、これまで日常診療において測定可能な抗 Jo-1 抗体を除き、抗

表 1 抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体 (抗 ARS 抗体)

抗 ARS 抗体	対応抗原 (ARS)	筋炎での頻度 (%)	『MESCUPTM Anti-ARS テスト』
抗 Jo-1 抗体	ヒスチジル tRNA 合成酵素	15-30	○
抗 PL-7 抗体	スレオニル tRNA 合成酵素	2-17	○
抗 PL-12 抗体	アラニル tRNA 合成酵素	0.5-6	○
抗 EJ 抗体	グリシル tRNA 合成酵素	0.5-4	○
抗 KS 抗体	アスパラギニル tRNA 合成酵素	<2	○
抗 OJ 抗体	イソロイシル tRNA 合成酵素	<2	×
抗 Zo 抗体	フェニルアラニル tRNA 合成酵素	1 例報告のみ	×
抗 Ha 抗体	チロシル tRNA 合成酵素	1 例報告のみ	×

1) 聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科
〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1
2) 産業医科大学産業保健学部成人老年看護学講座
〒807-8555 福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘 1 番 1 号

1) *Rheumatology and Allergology, St. Marianna University School of Medicine (2-16-1, Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa)*
2) *Department of Clinical Nursing, School of Health Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan (1-1 Iseigaoka, Yahata-nishi-ku, Kitakyushu, Fukuoka)*

ARS 抗体を検出は一部の施設での免疫沈降法 (図 1) などの特殊な検査でのみ行われてきた。このたび 2014 年 1 月より抗 Jo-1 抗体に加え抗 EJ, PL-7, PL-12, KS の計 5 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素に対する自己抗体を単一の酵素免疫測定法 (ELISA) キットで測定する新たな検査 (抗 ARS 抗体測定) が保険収載され、今後の PM/DM の補助診断に大きく貢献すると予想される。

本稿では PM/DM、抗 ARS 抗体について概説した後、今回保険収載された体外診断用抗 ARS 抗体測定キットである『MESACUP™ anti-ARS テスト』の測定原理、有用性、結果を解釈し臨床に用いる際の注意点について述べる。

I. 抗 ARS 抗体と陽性例の特徴

ARS は ATP の存在下で対応するアミノ酸と tRNA を結合させ、アミノアシル tRNA を合成する反応を触媒する酵素で、20 種類のアミノ酸に対応する 20 種類の ARS が細胞質内に存在する (図 2)。抗 ARS 抗体はそれぞれの ARS に対する抗体の総称で、

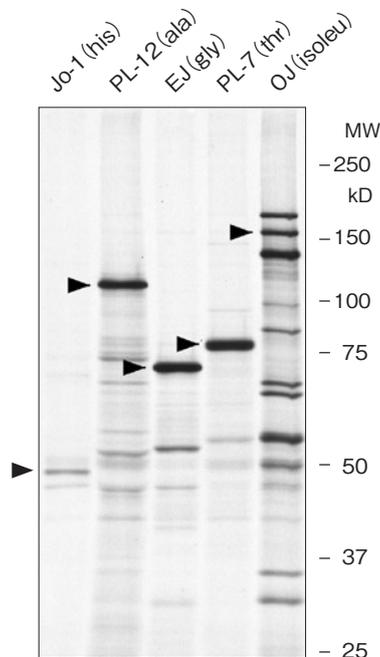


図 1 免疫沈降法による抗 ARS 抗体の検出 (IP)

³⁵S-メチオニンで標識された K562 細胞抽出物を抗原として、抗 ARS 抗体 (Jo-1, PL-12, EJ, PL-7, OJ) 陽性患者血清 IgG で免疫沈降を行い、認識された蛋白を SDS-PAGE で分画、オートラジオグラフィーで検出した。矢印 (▶) は対応抗原の位置を示す。

PM/DM 患者の血清を用いてこれまで 8 種類の抗 ARS 抗体が記載されている。興味深いことに、いずれの ARS 抗体も筋炎と関連するが、同一患者に複数の抗 ARS 抗体 (例えば抗 Jo-1 抗体と抗 PL-7 抗体) が共存することはまれである。

抗 ARS 抗体陽性患者には筋炎 (78-91%) のほか、間質性肺炎 (90%)、多関節炎 (64-83%)、Raynaud 現象 (62%)、発熱 (20%)、手指腹側の角質化を伴う皮疹 (機械工の手) (17-71%) などを高頻度に認め、均質な疾患群を構成すると考えられている (頻度は文献 15 より引用)。これを Targoff は anti-synthetase syndrome (抗 ARS 抗体症候群) と呼称した¹⁴⁾。特に間質性肺炎は胸部 HRCT で判定できる軽微なものも含めるとほぼ必発で、筋炎症状に先行、あるいは筋炎がないか軽度で気づかれない場合、特発性間質性肺炎と診断されるケースもある¹⁶⁾。間質性肺炎は慢性に緩和に経過する例が多いが、一部には急速進行例もある (図 3)。以前は均質と考えられてきた抗 ARS 抗体症候群であるが、最近になり抗 PL-7 抗体陽性患者は抗 Jo-1 抗体陽性患者に比べ筋症状が軽度である¹⁷⁾、強皮症との重複が多いという報告

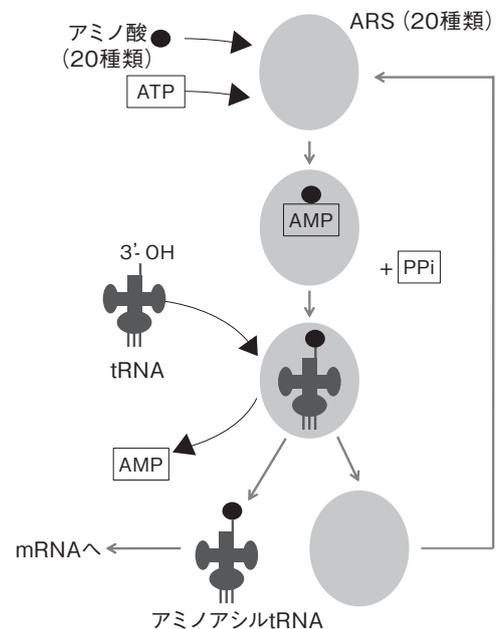


図 2 アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS)

ARS は ATP の存在下で対応するアミノ酸と tRNA を結合させ、アミノアシル tRNA を合成する反応を触媒する酵素である。20 種類のアミノ酸に対応するそれぞれの ARS が細胞質内に存在する。抗 ARS 抗体はそれぞれの ARS に対する抗体の総称で、PM/DM 患者の血清からのこれまで 8 種類の抗 ARS 抗体が検出されている。



図3 抗PL-7抗体陽性筋炎患者に合併した間質性肺炎

抗ARS抗体症候群に合併した間質性肺炎には本例のように急速進行例がある。本例はステロイドとシクロフォスファミドの併用で加療。

もある¹⁸⁾。さらに、抗PL-12抗体¹⁹⁾、抗KS抗体²⁰⁾、抗OJ抗体陽性例²¹⁾では肺病変が主体で明らかな筋症状に乏しい例がみられる。このように抗ARS抗体陽性例が必ずしも均質な疾患群でないことがわかってきている³⁾。また、間質性肺炎は軽症例が多いとされてきたが、最近、抗Jo-1抗体陽性例に比べ抗Jo-1以外のARS抗体陽性例(特に抗PL-7抗体、抗PL-12抗体)では、治療抵抗性の間質性肺炎を合併しやすく、生命予後も有意に不良であったとの報告もあり²²⁾、慎重な経過観察が必要である。従来、臨床応用がほとんどされてこなかった抗Jo-1抗体以外の抗ARS抗体を測定することで、PM/DMの診断、臨床像の傾向をある程度推定することが可能となり、臨床的に有用と考えられる。

II. 保険収載された抗ARS抗体の測定

これまで抗ARS抗体は、煩雑な手技と多くの時間を必要とするアイソトープ標識蛋白の免疫沈降法(図1)、RNA免疫沈降法でのみ検出されるため、

一部の限られた施設でしか測定できなかった。そのため日常の診療にも役立つような簡便なELISAの開発が求められてきた。三森らのグループは5種類の抗ARS抗体同時検出のルーチン化を目指してELISAを開発し²³⁾、この検査が最近保険収載された。詳細を表2に示す。これは血清中のARSに対する自己抗体のうち、抗Jo-1抗体、抗PL-7抗体、抗PL-12抗体、抗EJ抗体、抗KS抗体の5種類の自己抗体を検出するものであり(個々の抗ARS抗体についての情報は得られない点に注意が必要)、PM/DMの診断補助として極めて有用と思われる。また、PM/DMは間質性肺炎など肺病変が先行し、あるいは筋症状が軽微で病初期には特発性間質性肺炎と診断されることもあり¹⁶⁾、特発性間質性肺炎の患者において将来のPM/DMの発症リスクを考える場合は、抗ARS抗体を積極的に測定し基礎疾患として炎症性筋疾患が存在しうるか慎重に評価することが望ましい。

III. 抗ARS抗体ELISAの測定原理

『MESACUP™ anti-ARSテスト』はELISAにより血清中の抗ARS抗体を検出する検査キットである。5種類の組み替え蛋白のARS(PL-7, PL-12, EJは大腸菌で発現させたHis-tag標識蛋白、Jo-1, KSはHi-5細胞で発現させたGST融合蛋白)を抗原として固層化したマイクロカップ(ARS感作マイクロカップ)に検体(希釈した患者血清)を添加し、抗体を抗原に反応(1次反応)させる。洗浄後、ペルオキシダーゼ酵素を標識した抗ヒトIgGポリクロナール抗体(ヤギ)(酵素標識抗体)を添加して反応(2次反応)させ抗原・抗体・酵素標識抗体の複合物を形成させる。再び洗浄後、テトラメチルベンジンと過酸化水素の溶解液(酵素基質液)を添加し、

表2 『MESACUP™ Anti-ARSテスト』の詳細

・測定項目：抗ARS抗体(抗Jo-1抗体、抗PL-7抗体、抗PL-12抗体、抗EJ抗体、抗KS抗体)
・測定目的：血清中の抗ARS抗体の検出(PM/DMの診断の補助)
・測定方法：ELISA
・使用蛋白：ARSの組み替え蛋白(PL-7, PL-12, EJは大腸菌で発現させたHis-tag蛋白、Jo-1, KSはHi-5細胞で発現させたGST融合蛋白)
・有用性：既存の抗Jo-1抗体検査に加えて4つの抗ARS抗体を測定できるため、PM/DMに対する臨床的感度が高くなる。
・注意点：個々の抗ARS抗体に対する情報は得られない。また、抗OJ抗体、抗Zo抗体、抗Ha抗体は検出できない。
・保険点数：190点

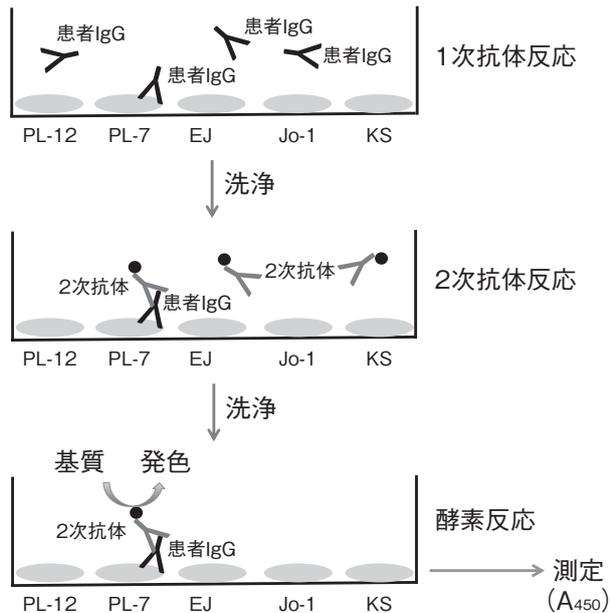


図4 ELISAの手順

希釈した患者血清をARSの組み替え蛋白質を抗原として固着化したマイクロカップに添加し、抗原・抗体反応(1次反応)をさせる。洗浄後、ペルオキシダーゼ酵素を標識した抗ヒトIgGポリクロナール抗体(ヤギ)(酵素標識抗体、2次抗体)を添加して反応(2次反応)させて抗原・抗体・酵素標識抗体の複合物を形成させる。再び洗浄後、酵素基質液を添加し、ペルオキシダーゼにより酵素反応させ発色させる。反応停止後、吸光度(A_{450})を測定し、抗ARS抗体を検出する。

酵素(ペルオキシダーゼ)により反応させ発色させる(酵素反応)。反応停止後、吸光度(A_{450})を測定し、血清中の抗ARS抗体を検出する(図4)。得られた吸光度は組み替え蛋白のARSに対するIgG抗体の量を反映しており、式によりIndex値が算出される。自己免疫疾患患者を含む432例を用いて検討した結果、Index値25未満を陰性、Index値25以上を陽性、としている。

IV. RNA免疫沈降法との一致率

Nakashimaらはさまざまな膠原病、間質性肺炎、健常人の計694例で抗ARS抗体ELISAの有用性をRNA免疫沈降法での結果と比較した²³⁾。これによると、102人がELISAで抗ARS抗体陽性症例となり、このうち、1例を除く101例でRNA免疫沈降法にて実際に抗OJ抗体以外の抗ARS抗体が検出され、抗OJ抗体以外の検出感度は100%、特異度は99.8%で良好な結果となった²³⁾。この解析では抗ARS抗体は筋炎患者250例中77例と30.8%もの症例で陽性であったのに対し、筋炎以外の膠原病患者でわず

か3%、健常人からは検出されなかった。筋炎の中では、PMで30.8%、DMで35.5%、amyopathic DMでは13.0%、重複症候群では33.3%で抗ARS抗体が陽性となっており²³⁾、PM/DMのみならず、典型的皮疹のみを呈する症例、強皮症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチなど他の膠原病を有する症例でも筋症状や典型的皮疹など筋炎の合併を疑った場合、補助診断として有用である。95例の抗ARS抗体陽性患者で89.4%は間質性肺炎、56.8%は関節炎・関節痛、25.3%はMechanic hand、38.9%は発熱、32.6%はRaynaud現象がみられ、抗ARS抗体陰性の筋炎患者に比べいずれも高頻度に抗ARS症候群の特徴を有していた²³⁾。また、強皮症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチなど筋炎以外の膠原病では抗ARS抗体陽性例はわずか2.2-4.0%であり、抗ARS抗体は筋炎にほぼ特異的にみられた²³⁾。また、特発性間質性肺炎では10.7%(168例中18例)もの頻度で抗ARS抗体陽性であり、筋炎に肺病変が先行している、あるいは、筋症状が臨床的には明らかではない症例が特発性間質性肺炎の症例の中には潜在していることが考えられる²³⁾。

V. どのような時に抗ARS抗体を測定するか

進行性・対称性の四肢筋力や頸部筋の低下を認める症例、筋症状がない場合でもヘリオトロープ疹、Gottron徴候など典型的皮疹を有する症例(amyopathic DM)では必ず測定すべきである。間質性肺炎のすべての例で抗ARS抗体を測定することに意義があるかどうかは、今後検討されるべき課題であるが、少なくともリウマチ性疾患の存在を示唆するような症状があり基礎疾患として筋炎の存在が否定できない場合には、抗ARS抗体を測定することは必要であろう。抗ARS症候群が疑われる場合、抗体の検索対象となるが、抗ARS症候群は前述した症状が同時に出現するとは限らず、病初期には非特異的な症状のみがみられる可能性があることを念頭におく必要がある。また、PM/DMが疑われた場合にスクリーニングの蛍光抗体法による抗核抗体検査で細胞質型の場合(図5)、抗ARS抗体の存在する可能性が高くなる。悪性腫瘍に合併した筋炎でも頻度は低いが抗ARS抗体が陽性の例もある¹⁶⁾

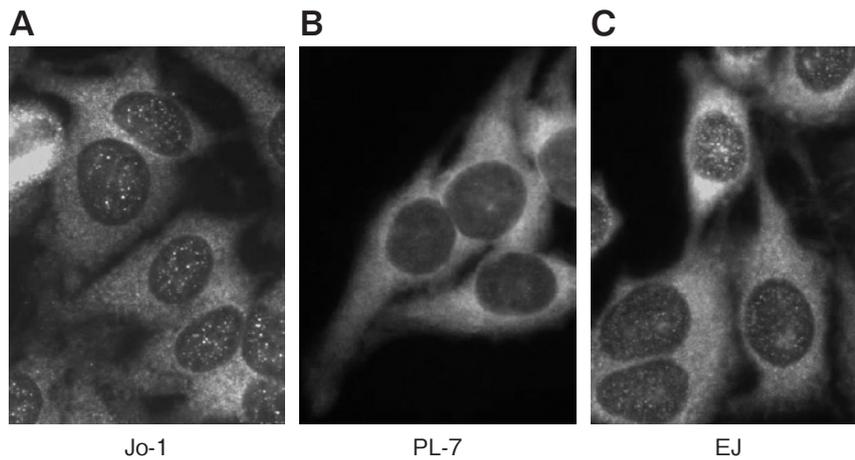


図5 蛍光抗体法(細胞質型)

蛍光抗体法は膠原病のスクリーニングでよく用いられる。筋炎を疑う症例や間質性肺炎の原因検索の際、蛍光抗体法で細胞質型と判定された場合、抗ARS抗体が検出される可能性が高くなる(写真A. 抗Jo-1抗体、B. 抗PL-7抗体、C. 抗EJ抗体陽性患者血清を用いた蛍光抗体法)。

VI. 抗ARS抗体の解釈上の注意点

前述した通り、抗ARS抗体の測定はPM/DMの補助診断、治療方針および予後や合併症の推測や間質性肺炎の原因検索の補助として有用であるが、その解釈には注意も必要である。

抗ARS抗体の測定はあくまでも筋炎診断の補助検査として有用なものであり、筋病変の重症度、重要臓器病変の画像および生理的評価や悪性腫瘍の検索の重要性がなくなる訳ではない。また、抗ARS抗体のレベルが臨床活動性と平行するという報告もあるが、抗ARS抗体の抗体量は疾患活動性には必ずしも比例しない。抗体レベルが低くても、進行性の間質性肺炎や心筋炎など生命予後に影響を与える重要臓器病変を呈する症例もあり、本検査での抗ARS抗体のindex値にかかわらず積極的な治療介入が必要である。通常、抗ARS抗体は治療により陰性化することはなく、初期評価で一度陽性であればその後は通常陽性のままである。したがって、全身性エリテマトーデスの抗ds-DNA抗体や血管炎のMPO-ANCA, PR3-ANCAのようにステロイド、免疫抑制療法の治療反応を評価する為の指標にはなり得ない。また、言うまでもないが、抗ARS抗体はPM/DMにかなり特異的ではあるが、その約30%にしか検出されない訳であるから、陰性でもPM/DMは否定されるものではない。

おわりに

これまで一部の施設でのみ測定されていた抗Jo-1抗体以外の抗ARS抗体の検査が日常診療で可能となり、今後、PM/DMの診断・治療方針の決定の補助になると思われる。また、抗ARS抗体陽性症例の臨床的知見が今後徐々に蓄積されることであろう。また、これまで特発性間質性肺炎と診断されていた患者の中で抗ARS抗体陽性が少なからず存在するが、このような症例はどの程度筋炎に進展するのか、治療はどうすれば良いのか、今後症例を蓄積し、検討していかなければならない。

文 献

- 1) Yamasaki Y, Yamada H, Ohkubo M, et al. Long-term survival and associated risk factors in patients with adult-onset idiopathic inflammatory myopathies and amyopathic dermatomyositis : experience at a single institute in Japan. *J Rheum.* 2011 ; **38**(8) : 1636-1643.
- 2) Azuma K, Yamada H, Ohkubo M, et al. Incidence and predictive factors for malignancies in 136 Japanese patients with dermatomyositis, polymyositis and clinically amyopathic dermatomyositis. *Mod Rheumatol.* 2011 ; **21**(2) : 178-183.
- 3) Mimori T, Imura Y, Nakashima R, et al. Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathy : an update on clinical and pathophysiological significance. *Curr Opin Rheumatol.* 2007 ; **19**(6) : 523-529.

- 4) Targoff IN. Update on myositis-specific and myositis-associated autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol*. 2000 ; **12** (6): 475-481.
- 5) Nishikai M, Reichlin M. Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyositis : characterization of the Jo-1 antibody system. *Arthritis Rheum*. 1980 ; **23**(8): 881-888.
- 6) Mathews MB, Bernstein RM. Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase : a model for autoimmunity. *Nature*. 1983 ; **304**(5922): 177-179.
- 7) Mathews MB, Reichlin M, Hughes GRV, et al. Antithreonyl-tRNA synthetase, a second myositis-related autoantibody. *J Exp Med*. 1984 ; **160**(2): 420-434.
- 8) Bunn CC, Bernstein RM, Mathews MB. Autoantibodies against alanyl-tRNA synthetase and tRNA^{Ala} coexist and are associated with myositis. *J Exp Med*. 1986 ; **163**(5): 1281-1291.
- 9) Targoff IN, Trieu EP, Ploz PH, et al. Antibodies to glycyl-transfer RNA synthetase in patients with myositis and interstitial lung disease. *Arthritis Rheum*. 1992 ; **35**(7): 821-830.
- 10) Targoff IN, Trieu EP, Miller FW. Reaction of anti-OJ autoantibodies with components of the multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetase in addition to isoleucyl-tRNA synthetase. *J Clin Invest*. 1993 ; **91**(6): 2556-2564.
- 11) Hirakata M, Suwa A, Nagai S, et al. Anti-KS : identification of autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase associated with interstitial lung disease. *J Immunol*. 1999 ; **162**(4): 2315-2320.
- 12) Betteridge Z, Gunawardena H, North J, et al. Antisynthetase syndrome : a new autoantibody to phenylalanyl transfer RNA synthetase (anti-Zo) associated with polymyositis and interstitial pneumonia. *Rheumatology*. 2007 ; **46**(6): 1005-1008.
- 13) Hashish L, Trieu EP, Sadanandan P, et al. Identification of autoantibodies to tyrosyl-tRNA synthetase in dermatomyositis with features consistent with antisynthetase syndrome. *Arthritis Rheum*, 2005 ; **52**(supplement): S312.
- 14) Targoff IN. Autoantibodies in polymyositis. *Rheum Dis Clin North Am*. 1992 ; **18**(2): 455-482.
- 15) Katzap E, Barilla-LaBarca ML, Marder G. Antisynthetase syndrome. *Curr Rheumatol Res*. 2011 ; **13**(3): 175-181.
- 16) Yoshifuji H, Fujii T, Kobayashi S, et al. Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity*. 2006 ; **39**(3): 233-241.
- 17) Yamasaki Y, Yamada H, Nozaki T, et al. Unusually high frequency of autoantibodies to PL-7 associated with milder muscle disease in Japanese patients with polymyositis/dermatomyositis. *Arthritis Rheum*. 2006 ; **54**(6): 2004-2009.
- 18) Sato S, Hirakata M, Kuwana M, et al. Clinical characteristics of Japanese patients with anti-PL-7(anti-threonyl-tRNA synthetase) autoantibodies. *Clin Exp Rheumatol*. 2005 ; **23**(5): 609-615.
- 19) Targoff IN, Arnett FC. Clinical manifestations in patients with antibody to PL-12 antigen(alanyl-tRNA synthetase). *Am J Med*. 1990 ; **88**(3): 241-251.
- 20) Hirakata M, Suwa A, Takada T, et al. Clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase. *Arthritis Rheum*. 2007 ; **56**(4): 1295-1303.
- 21) Sato S, Kuwana M, Hirakata M. Clinical characteristics of Japanese patients with anti-OJ(anti-isoleucyl-tRNA synthetase) autoantibodies. 2007 ; **46**(5): 842-845.
- 22) Aggarwal R, Cassidy E, Fertig N, et al. Patients with non-Jo-1 anti-tRNA-synthetase autoantibodies have worse survival than Jo-1 positive patients. *Ann Rheum Dis*. 2014 ; **73**(1): 227-232.
- 23) Nakashima R, Imura Y, Hosono Y, et al. The multicenter study of a new assay for simultaneous detection of multiple anti-aminoacyl-tRNA synthetase in myositis and interstitial pneumonia. *PLoS One*. 2014 ; **9**(1)e85062.