

〈原著〉

## 関節リウマチ患者における血清中シトルリン化フィブリノゲン およびその抗体の定量

寺澤 文子<sup>1)</sup>、石井 亘<sup>2)</sup>、樋口 由美子<sup>3)</sup>、新井 慎平<sup>4)</sup>、奥村 伸生<sup>3)</sup>

### Measurement of the serum levels of citrullinated fibrinogen and its antibodies in rheumatoid arthritis patients

Fumiko Terasawa<sup>1)</sup>, Wataru Ishii<sup>2)</sup>, Yumiko Higuchi<sup>3)</sup>, Shinpei Arai<sup>4)</sup> and Nobuo Okumura<sup>3)</sup>

**Summary** Citrullinated proteins and autoantibodies are detected in the serum of about 75 % of rheumatoid arthritis (RA) patients and can be observed from the early stages of the disease. We suspected that citrullinated fibrinogen and the antibody against it are the specific molecules found in RA patients; therefore, we measured their levels using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on recombinant citrullinated fibrinogen and a mouse monoclonal antibody against it.

The citrullinated fibrinogen levels of the RA patients (n=13), systemic lupus erythematosus (SLE) patients (n=2), and normal controls (n=21) were 204-2,881 ng/mL, 87 and 97 ng/mL, and 47-291 ng/mL ( $134 \pm 60$  ng/mL), respectively. The citrullinated fibrinogen antibody levels of the RA patients, SLE patients, and normal controls were 25-1,780 U/mL, 13 and 27 U/mL, and 4.0-10.9 U/mL ( $5.4 \pm 1.5$  U/mL), respectively. The serum measurements obtained in the RA patients indicated that the assay exhibited 76.9 % sensitivity and 95.7 % specificity for the citrullinated fibrinogen antigen, and 100 % sensitivity and 87.0 % specificity for the citrullinated fibrinogen antibody.

In this study, we established an ELISA-based method for measuring the serum levels of

<sup>1)</sup> 北陸大学新学部設置準備室 (医療保健学部医療技術学科)

石川県金沢市太陽が丘1丁目1番地

<sup>2)</sup> 信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科  
長野県松本市旭3-1-1

<sup>3)</sup> 信州大学医学部保健学科  
長野県松本市旭3-1-1

<sup>4)</sup> 信州大学大学院医学系研究科  
長野県松本市旭3-1-1

<sup>1)</sup> New Faculty Establishment and Planning Office  
(Department of Medical Technology and Clinical Engineering, Faculty of Health and Medical Sciences),  
Hokuriku University

1-1, Taiyogaoka, Kanazawa, Ishikawa, 920-1180, Japan

<sup>2)</sup> Department of Medicine (Neurology and Rheumatology),  
Shinshu University School of Medicine  
3-1-1, Asahi, Matsumoto, Nagano, 390-8621, Japan

<sup>3)</sup> Department of Biomedical Laboratory Sciences,  
School of Health Sciences, Shinshu University  
3-1-1, Asahi, Matsumoto, Nagano, 390-8621, Japan

<sup>4)</sup> Department of Health and Medical Sciences,  
Graduate School of Medicine, Shinshu University  
3-1-1, Asahi, Matsumoto, Nagano, 390-8621, Japan

受領日：平成28年6月9日

受理日：平成28年7月18日

citrullinated fibrinogen and antibodies against it.

**Key words:** Citrullinated fibrinogen, Anti-citrullinated fibrinogen antibody, rheumatoid arthritis, ELISA

## I. 緒言

関節リウマチ (RA) は関節破壊を主要病変とする全世界で最も頻度の高い全身性自己免疫疾患である。このRA患者血清の75%程度にシトルリン化タンパクに対する自己抗体が存在し、しかも高い疾患特異性を有し、疾患の極初期から検出されることが報告されている<sup>1)~3)</sup>。生体内においてシトルリン化タンパクは、フィブリノゲン・フィブリン (以下Fbg・Fbnとする)、フィラグリン、ピメンチン、 $\alpha$ -エノラーゼ、タイプIIコラーゲンなどのタンパクが、炎症時に好中球のペプチジルアルギニン・ディミナーゼ (PADI4) により分子内のアルギニンがシトルリンに変換されることにより生成される<sup>4)</sup>。これらのシトルリン化タンパクはRAに特異的ではない<sup>5)</sup>が、抗シトルリン化タンパク抗体産生はRAに特異的とされ、産生された抗体がRAの発症に密接に関与していることが明らかにされている<sup>6)</sup>。近年、環状シトルリン化ペプチド (Cyclic Citrullinated Peptide, CCP) に対する抗体検査が新規項目として保険適用になっている。

シトルリン化されたFbg・Fbnとそれらに対する抗体は、RA患者の関節液中に存在し、それが疾病の発症と活動性に関与することが明らかになってきた<sup>7), 8)</sup>。しかしその詳細な機序は明確になっていないことから、我々は次のようなRAの病態形成モデルを想定した。すなわち、何らかの原因で関節に存在するFbgがシトルリン化 (以下シ-Fbgとする) され、それが血液を介して免疫系組織に運ばれて抗原刺激され、抗シトルリン化Fbg抗体 (以下抗シ-Fbg抗体とする) を産生し、その抗体が関節に循環しそこに沈着しているシ-Fbnと結合することにより各種炎症細胞に炎症の場を提供する、というものである。この想定は血液中にシ-Fbgおよびその抗体が循環していることが前提となる。シトルリン化されるタンパクのうち、生体内に最も多いのはFbgである。我々は血液中のシ-Fbgとその

抗体が定量的に検出できれば、RAの診断、治療経過観察、および病態解明に繋がる重要な情報となると考え、高感度ELISAによる定量法の検討を行なった。

## II. 材料と方法

本研究は信州大学倫理審査委員会の承認 (No.2315) を得ており、患者および対照とする健常者には文書および口頭で十分な説明を行ない、同意を得られたものについて実施した。

### 1) シ-Fbgの作製

すでに我々が作製してあるリコンビナントFbgを、ウサギ筋肉由来のペプチジルアルギニンディイミナーゼ (Sigma) を用いてシトルリン化させた<sup>9)</sup>。

### 2) モノクローナル抗シ-Fbg抗体の作製

シトルリン化リコンビナントFbgを抗原とし、それに対するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを業者 (MBL) 委託にて作製した。確立された抗体産生細胞株10クローンの培養上清について、シ-Fbg 10  $\mu$ g/mL を固相化したプレートを用いてELISAを行い、得られた吸光度から抗体を良好に産生しているハイブリドーマを選択して、Hybridoma-SFM (GIBCO) で馴化し、培養した。上清に分泌された抗体はプロテイン-G (GEヘルスケア) を用いて回収・精製した。得られた抗体とシ-Fbgとの反応性は、シ-Fbgを2-Mercapthethanolにより還元した後、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、作製した抗体を一次抗体として用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

### 3) 検体

検体はRA患者13名の日常検査に使用した後の残余血清を用いた。SLE患者2名の血清を疾患対照、健常者21名の血清を正常対照群として用いた。我々はすでにシ-Fbgはトロンビンの作用を受けることがなくFbnにならないことを証明<sup>9)</sup>していることから、測定には血清を用いた。

4) ELISAによるシ-Fbgおよび抗シ-Fbg抗体の測定

①測定条件の検討

抗原測定条件の検討では、マイクロプレート（ヌンク、Maxisorp）への固相化は作製したモノクローナル抗シ-Fbg抗体をPBSで0.5、1、5、10、50  $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調整して用いた。標準物質であるシ-Fbgは0から2,000 ng/mLまでの10濃度の希釈系列を作成して用いた。2次抗体には抗ヒトFbg抗体（Abcam）をビオチン標識化キット-NH<sub>2</sub>（コスモバイオ）によりビオチン化し、濃度20  $\mu\text{g}/1400\ \mu\text{L}$ としたものを1%BSAで2,000～20,000倍の範囲で希釈して用いた。次に反応させるストレプトアビジン結合HRP（Beckman Coulter Cell Lab）は1%BSAで2,000～20,000倍の範囲に希釈して用いた。検体は2、5、10、20、100倍希釈について検討した。

抗体測定条件の検討では、固相としてシ-Fbgを0.5、1、5、10、50  $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調整して用いた。標準物質である抗シ-Fbg抗体は0から3,000 ng/mLまでの11濃度の希釈系列を作成して用いた。2次抗体にはビオチン化抗ヒトIgG抗体（Abcam）を2,000～10,000倍の範囲で希釈し、またストレプトアビジン結合HRPは抗原測定の場合と同様に希釈して用いた。検体は50、100、200、400、1,000、2,000、3,000倍希釈について検討した。

再現性については抗原、抗体それぞれ高濃度、低濃度2検体の同時再現性、日差再現性について10回ずつ測定し、CVを求めた。

②シ-Fbgおよび抗シ-Fbg抗体の測定

検討結果から決定した条件を用いて検体のシ-Fbgおよび抗シ-Fbg抗体測定を行った。

シ-Fbg測定では、10  $\mu\text{g/mL}$ 抗シ-Fbg抗体を120  $\mu\text{L}$ ずつマイクロプレートに固相化した。標準液はシ-Fbgの0～2,000 ng/mLを用いた。標準液と検体は100  $\mu\text{L}$ 、2次抗体にはビオチン化抗ヒトFbg抗体の8,000倍希釈液120  $\mu\text{L}$ 、次いでストレプトアビジン結合HRPの10,000倍希釈液120  $\mu\text{L}$ を反応させた。発色はTMB基質システム（Kirkegard Perry Lab）により行ない、反応停止液には1 Mリン酸100  $\mu\text{L}$ を用いた。吸光度は主波長450nm、副波長650 nmで検出した。検体はRA患者血清を10倍希釈、SLE患者と健常者血清を5倍希釈して用いた。

抗シ-Fbg抗体測定では、10  $\mu\text{g/mL}$ シ-Fbgを120  $\mu\text{L}$ ずつマイクロプレートに固相化した。標準液は抗シ-Fbg抗体の0～3,000ng/mLを用いた。標準液と検体は100  $\mu\text{L}$ 、2次抗体にはビオチン化抗ヒトIgG抗体の4,000倍希釈液を120  $\mu\text{L}$ 、次いでストレプトアビジン結合HRPの10,000倍希釈液120  $\mu\text{L}$ を反応させた。発色はTMB基質システムにより行ない、吸光度は主波長450 nm、副波長650 nmで検出した。検体は、基本的にRA患者血清は200倍希釈、高濃度のもものは800～2,000倍希釈、SLE患者と健常者血清は50倍希釈して用いた。

使用したモノクローナル抗体の濃度は、280 nmにおける吸光度1.00を1mg/mLとして求めたとき0.35 mg/mLであった。これを標準物質として得られた検体中のタンパク濃度の1  $\mu\text{g/mL}$ を抗体価1 U/mLとして表した。

6) RA関連検査項目の結果との比較

RA患者群の抗原量と抗体量のそれぞれについて、経過観察として日常検査で測定されたCRP、Matrix metalloproteinase (MMP) -3、血沈 (ESR、1時間値)、リウマトイドファクター (RF)、抗CCP抗体の測定値と比較し、相関について検討した。相関の有意性の検討は2変量相関の t 検定を用いて有意水準  $p$  (0.01、0.05) により行なった。

Ⅲ. 結果

1) シ-Fbgと抗シ-Fbg抗体の反応性

得られたモノクローナル抗体を一次抗体としたウェスタンブロッティングにより、シ-Fbgとの反応性を観察したところ、A $\alpha$ 鎖とB $\beta$ 鎖に特異的に反応した (Fig. 1)。

2) 測定条件の検討

抗原測定では固相化濃度10  $\mu\text{g/mL}$ 、ビオチン化抗ヒトFbg抗体は8,000倍希釈、ストレプトアビジン結合HRPは10,000倍希釈液を用いたとき、両対数グラフによる検量線は8～500 ng/mLの間で直線性を示した。検体の希釈倍数は吸光度から判断して、RA患者血清は10倍、SLE患者と健常者血清は5倍が適当であり、また希釈直線性も良好であった。同時再現性は平均1,810 ng/mLのとき7.9%、500 ng/mLのとき10.3%、日差再現性は平均2,881 ng/mLのとき4.1%、

204 ng/mLのとき23%であった。

抗体測定では固相化濃度10 μg/mL、ビオチン化抗ヒトFbg抗体の8,000倍希釈、ストレプトアビジン結合HRPの10,000倍希釈液を用いたとき、両対数グラフによる検量線は10~2,000 ng/mLの間で直線性を示した。検体の希釈は吸光度から判断してRA患者血清は200~800倍、SLE患者と健常者血清は200倍が適当であり、

また希釈直線性も良好であった。同時再現性は平均303 U/mLのとき7.2%、181 U/mLのとき4.3%、10回の測定による日差再現性は平均1,780 U/mLのとき5.9%、25 U/mLのとき17.1%であった。

3) シ-Fbgの定量

RA患者の血清中抗原量は204~2,881 ng/mLであった。それに対してSLE患者では87と97 ng/mL、健常者では47~291 ng/ml (m ± SD=134 ± 60 ng/mL) であった (Table 1, Fig. 2)。

4) 抗シ-Fbg抗体の定量

RA患者の血清中抗体価は25-1,780 U/mLであった。それに対してSLE患者では13と27 U/mL、健常者では4.0~10.9 U/mL (5.4 ± 1.5 U/mL) であった (Table 1, Fig. 3)。

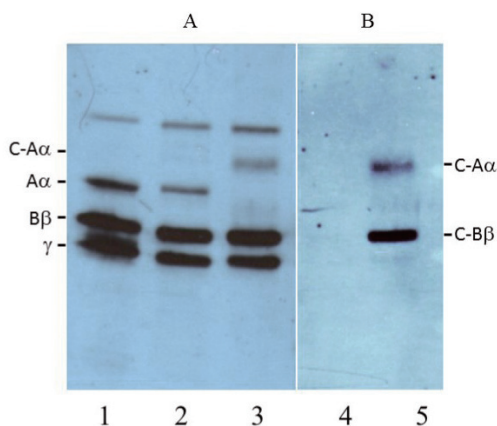


Figure 1. Western blotting of citrullinated fibrinogen. A: 1<sup>st</sup> antibody; polyclonal anti-fibrinogen antibody B: 1<sup>st</sup> antibody; monoclonal anti-citrullinated fibrinogen antibody. 1: normal plasma fibrinogen, 2, 4: recombinant fibrinogen, 3, 5: citrullinated recombinant fibrinogen. C-A α: citrullinated A α-chain, C-B β: citrullinated B β-chain.

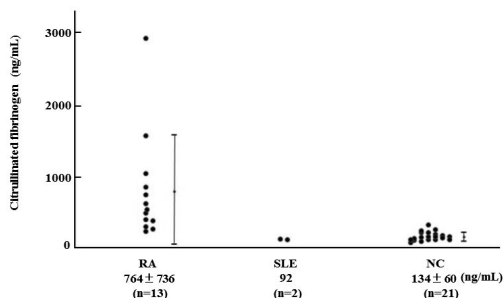


Figure 2. Distribution of citrullinated fibrinogen levels in serum of the RA, SLE and normal control

Table 1. Results of citrullinated fibrinogen, anti-citrullinated fibrinogen antibody, and routine tests of RA patients

		C-Fbg (ng/mL)	Anti-C-Fbg (U/mL)	CRP (mg/dL)	MMP-3 (ng/mL)	ESR (1h) (mm/hr)	RF (IU/mL)	Anti-CCP (U/mL)
RA	Pt-1 f	592	56	0.10	268.0	4.0	291	139
	2 f	461	25	2.16	93.5	14.0	119	1.5
	3 f	367	181	0.77	38.7	>140.0	60	18.3
	4 f	820	303	1.18	114.4	43.0	240	179.0
	5 m	268	40	1.35	202.4	55.0	31	93.4
	6 f	1533	126	8.69	98.3	39.0	2080	>=500
	7 m	708	53	0.82	445		145	202
	8 m	1008	1780	0.87	517.0	30.0	1340	485
	9 m	350	730	3.05	215.6	62.0	10	>=500
	10 f	236	68	1.9	109.3	27.0	62	>=300
	11 f	204	28	3.99	712.7	10.0	6	0.6>
	12 m	507	524	0.00	481.7	1.0	138	>=500
	13 f	2881	45	12.68	288.1	117.0	1160	121.0
		(764 ± 736)	(305 ± 494)					
SLE	1	87	13					1.7
	2	97	27					<0.6
NC(n=21)		47-291 (134 ± 60)	4.0-10.9 (5.4 ± 1.5)					<0.6
Reference value				<0.1	m: 36.9-121 f: 17.3-59.7	3.0-15.0	<15	<4.5

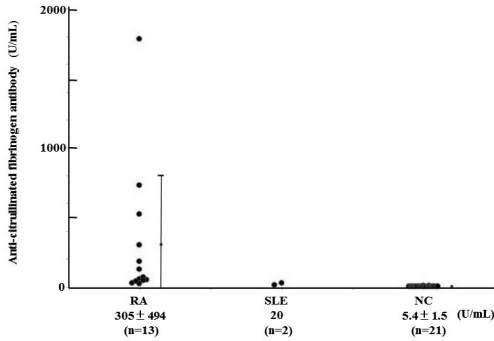


Figure 3. Distribution of anti-citrullinated fibrinogen antibody levels in serum of the RA, SLE and normal control

5) RAにおけるシ-Fbgの抗原および抗体測定  
の感度、特異度

抗原量は健常者21例では47~291 ng/mlであったが、サンプル数は少なく、正規分布していないことからノンパラメトリック法により高値の2.5%を除いた値を正常上限として求めると285 ng/mLとなった。これをカットオフ値とすると、RA患者では13例中204、236、268 ng/mLの3例を除く10例が陽性、SLE患者2例は87と97 ng/mLで陰性、健常者では21例中291 ng/mLの1例を除く20例が陰性となり、感度は76.9% (10/13)、SLE患者と健常者を合わせた非RA群23例から求めた特異度は95.7% (22/23) となった。

抗体量は健常者では4.0~10.9 U/mLであった。抗原量と同様に正常上限値を求めると10.7

U/mLとなった。これをカットオフ値とすると、RA患者では13例中13例が陽性、SLE患者2例は陽性、正常者では21例中20例が陰性となり、感度は100% (13/13)、SLE患者と健常者を合わせた非RA群23例から求めた特異度は87.0% (20/23) となった。

6) RA関連検査項目の結果との比較

抗原量、抗体量とそれぞれの相関をみたところ、抗原量とCRP ( $r=0.84, p=0.01$ ) (Fig. 4)、抗原量とRF ( $r=0.72, p=0.01$ ) (Fig. 5) に有意な相関が認められた。抗CCP抗体濃度測定は業者に委託したが測定限界濃度が500または300 U/mLであり、正確な相関は求められなかった。しかし上限値をそのまま測定値とした場合、患者抗体量との相関係数は $r=0.63$  ( $p=0.05$ ) となった (Fig. 6)。また中程度の相関は抗原量と血沈 ( $r=0.41$ )、弱い相関が抗体量とMMP-3 ( $r=0.31$ )、抗体量とRF ( $r=0.32$ ) に認められた。

IV. 考察

今回の我々の検討は、RA患者13例、SLE患者2例、健常者21例ときわめて少数であるが、シ-Fbgとその抗体の血中濃度の測定を試みたものである。

RAはいかに早期に的確に診断し、治療を開始するかが患者の予後に大きく関わる疾患のひとつであり、早期からの強力な治療により関節破壊を防ぐことができる<sup>10)</sup>。現在RAの診断、経過観察のためにCRP、MMP-3、RF、血沈などが測定されているが、いずれも他の疾患でも

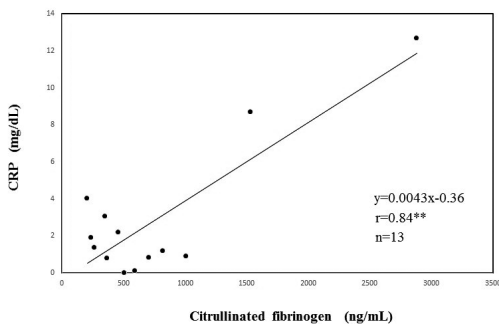


Figure 4. Relationship of citrullinated fibrinogen and CRP levels of the RA patients (n=13) (\*\* $p=0.01$ )

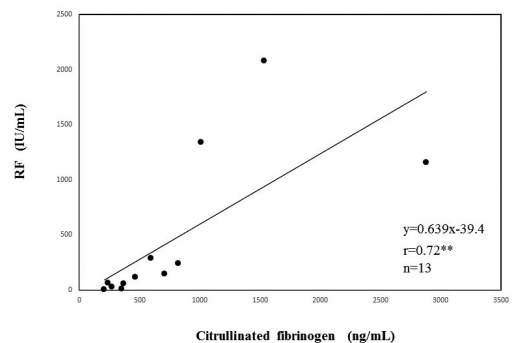


Figure 5. Relationship of citrullinated fibrinogen and RF levels of the RA patients (n=13) (\*\* $p=0.01$ )



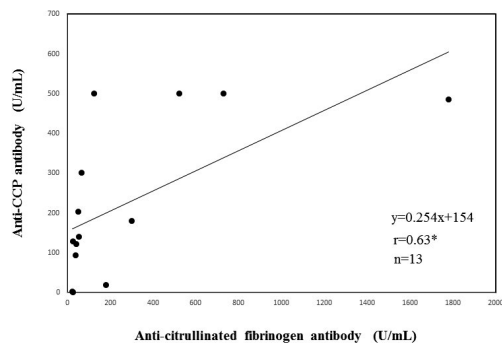


Figure 6. Relationship of anti-citrullinated fibrinogen antibody and anti-CCP antibody levels of the RA patients (n=13) (\* $p=0.05$ )

検出され特異性が高いとはいえない項目である。一方、RAにおける抗シトルリン化タンパク抗体産生はRAに特異的とされ、産生された抗体がRAの発症に密接に関与しているなど、臨床的有用性について数多くの知見が得られている<sup>1)–3), 6)–8), 11)–14)</sup>。なかでも抗CCP抗体産生は、滑膜中のB細胞の増殖・分化を引き起こす刺激因子とされており、陽性患者では陰性患者に比べて関節破壊が強<sup>6), 14)</sup>、また抗体価が高いほどその進行が速いという報告<sup>14)</sup>がある。しかしそれらの産生機序や病因的な役割についてはほとんど解明されていない。また抗CCP抗体のRAに対する特異度は89~98%と優れているが、感度はRFと同じくらいの88%程度であるとされている<sup>15)</sup>。さらに発症6カ月未満の早期における検出率は70%程度との報告もみられる<sup>16)</sup>。

一方、抗シ-Fbg抗体についての報告は少ないが、CruyssenらによるRA患者92例の血液中濃度の検討では感度60.9%、特異度98.7%であり、抗CCP抗体と同程度であったとの報告がある<sup>17)</sup>。今回の我々の結果では感度76.9%、特異度95.7%となり、感度は上がり特異度は同程度を示した。近年RA患者の関節液にはシトルリン化されたFbg・Fbnとそれらに対する抗体が存在し、それらの主要な対応抗原はシトルリン化されたFbnの $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖であることが証明された<sup>8)</sup>。またシ-Fbgとそれに対する抗体から形成される免疫複合体がToll-like Receptor 4とFc $\gamma$  Receptorを介してマクロファージを活性化すること<sup>18)</sup>、シトルリン化タンパクがIgEクラスに属する抗シ

トルリン化タンパク抗体を結合したFc $\epsilon$  Receptor Iを介してマスト細胞、好塩基球を活性化することが病態形成に関与することが報告されている<sup>19)</sup>。しかし我々は、シ-Fbgはトロンビンの作用を受けることができずFbnになれないことをすでに明らかにした<sup>9)</sup>こと、および関節内局所だけで免疫系が刺激され抗体産生・消費されるのであれば、血液中に抗体が大量に存在することの説明が難しいと考えた。そのような経緯から、我々は血液中のシ-FbgがB細胞に対して抗原性を発揮し、抗シ-Fbg抗体を産生し、その抗体が関節に循環し、そこに沈着しているシ-Fbnと結合することにより各種炎症細胞に炎症の場を提供するという病態モデルを想定した。しかし血液中にはシ-Fbgは存在しないという報告<sup>20)</sup>と、免疫複合体として存在するという報告<sup>21)</sup>とがあり、明らかにされてはいなかった。今回の我々の研究では、RA患者の血清中には、健常人に比較して明らかに高濃度のシ-Fbgとその抗体が存在し、高感度ELISAでの定量が可能であることを示した。

今回検討した13例のRA患者は、全例発症後数年以上経過しており、すでに治療中の患者のため、得られたシ-Fbgの抗原量、抗体量によるRA患者の病態の評価はできなかった。しかし抗CCP抗体は超早期発症後平均3カ月未満では感度40%程度<sup>2), 11)</sup>、6カ月未満では70%程度<sup>16)</sup>とされていることから、3カ月未満、6カ月未満の超早期発症患者においてシ-Fbgの抗原量、抗体量を測定し、超早期における測定意義を確認することが今後の課題である。

## V. 結語

本研究ではモノクローナル抗体を用いた高感度ELISAによる血清中シトルリン化フィブリノゲンの抗原量およびその抗体量の定量を試みた。RA患者血清中にはシトルリン化フィブリノゲンおよびその抗体が存在しており、抗原量測定の感度は76.9%、特異度は95.7%、抗体価測定の感度は100%、特異度は87.0%であり、血清中シトルリン化フィブリノゲンの抗原量およびその抗体量の定量が臨床検査に利用可能なことが明らかになった。今後はこれらの検査がRAの早期診断、治療経過観察、および病態解

明に寄与する検査項目となりうるかどうかを検討する必要がある。

## VI. 謝辞

本研究は、独立行政法人日本学術振興会科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金、基盤研究（C）課題番号25460678）の支援により行なったものである。

### 参考文献

- 1) Snir O, Widhe M, Hermansson M, von Spee C, Lindberg J, Lindberg J, Hensen S, Lundberg K, Engstrom A, Venables PJ, Toes RE, Holmdahl R, Klareskoq L, Malmstom V. Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*, 62: 44-52, 2010. doi: 10.1002/art.25036.
- 2) Nell VP, Machold KP, Stamm TA, Ebert G, Heinzl H, Uffmann M, Smolen JS, Steiner G. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 64: 1731-1736, 2005.
- 3) Simon M, Girbal E, Sebbag M, Games-Daudrix V, Vincent C, Salama G, Serre C. The cytokeratin filament aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies", autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 92: 1387-1393, 1993.
- 4) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Tesima Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tadota T, Nakayama Y, Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinated enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*, 34: 395-402, 2003.
- 5) Chapuy-Regaud S, Sebbag M, Baeten D, Clavel C, Foulquier C, De Keyser F, Serre G. Fibrin deamination in synovial tissue is not specific for rheumatoid arthritis but commonly occurs during synovitis. *J Immunol*, 174: 5057-5064, 2005.
- 6) Berglin E, Johansson T, Sundin U, Jidell E, Wadell G, Hallmans G, Rantapää-Dahlqvist S. Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgG-RF at disease onset. *Ann Rheum Dis*, 65: 453-458, 2006.
- 7) Chapuy-Regaud S, Nogueira L, Clavel C, Sebbag M, Vincent C, Serre G. IgG subclass distribution of the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrin. *Clin Exp Immunol*, 139: 542-550, 2005. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02708.x.
- 8) Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhausser E, Nogueira L, Vincent C, Serre G. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol*, 166: 4177-84, 2001.
- 9) Okumura N, Haneishi A, Terasawa F. Citrullinated fibrinogen shows defects in FPA and FPB release and fibrin polymerization catalyzed by thrombin. *Clin Chim Acta* 401: 119-123, 2009.
- 10) Breedveld FC, Kalden JR. Appropriate and effective management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 63: 627-633, 2004.
- 11) Ota T, Shono E, Ikeda K. Investigation of useful autoantibodies for detecting very early rheumatoid arthritis (VERA) and for discrimination VERA from non-RA. *Mod Rheumatol*, 16 (Supple): 134-135, 2006.
- 12) 太田俊行：関節リウマチにおける抗シトルリン化ペプチド抗体測定の有用性。モダンメディア 53: 208-212, 2007
- 13) 佐田榮司、小岩美穂：抗シトルリン化蛋白抗体（抗CCP抗体）のリウマチ性疾患診断における有用性。愛媛県立医療技術大学紀要 1: 25-34, 2004.
- 14) Syversen SW, Gaarder PI, Goll GL, et al. High anti-CCP levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. *Ann Rheum Dis*, doi: 10.1136/and.2006.068247, May, 2007.
- 15) Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 32: 197-204, 2003.
- 16) Dubucquoi S, Solau-Gervais E, Lefranc D, Marguerie L, Sibillia J, Goetz J, Dutoit V, Fauchais AL, Hachulla E, FlipobRM, Prin L. Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic disease. *Ann Rheum Dis*, 63: 415-419, 2004.
- 17) Vander Cruyssen B, Cantaert T, Nogueira L, Clavel C, De Rycke L, Dendoven A, Sebaq M, Deforce D, Vincent D, Serre G, De Keyser F. Diagnostic value of anti-human citrullinated fibrinogen ELISA and comparison with four other anti-citrullinated protein as-

- says. *Arthritis Res Ther*, 8: R122, 2006. Pub online 2006 Jul 19 doi: 10.1186/ar2011.
- 18) Sokolove J, Zhao X, Chandra PE, Robinson WH. Immuno complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fcg receptor. *Arthritis Rheum*, 63: 53-62, 2011.
- 19) Schuerwegh AJ, Ioan-Facsinay A, Dorjee AL, Roos J, Bajema M, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Evidence for a functional role of IgE anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 2586-2591, 2010. doi: 10.1073/pnas.0913054107. E pub 2010 Jan 25.
- 20) Takizawa Y, Suzuki A, Sawada T, Ohsaka M, Inoue T, Tamada R, Yamamoto K. Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids. *Ann Rheum Dis*, 65: 1013-1020, 2006.
- 21) Zhao X, Okeke NL, Sharpe O, Batliwalla FM, Lee AT, Ho PP, Tomooka BH, Gregersen PK, Robinson WH. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 10: R94, 2008.