

# 複雑な病気セリアック病 3

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)<sup>1,2</sup> 吉野 精一 (YOSHINO Seiichi)<sup>3</sup>

Key Words: セリアック病, 歴史, 遺伝学

本論文「複雑な病気セリアック病 3」は“Celiac Disease and Gluten” (by Herbert Wieser, Peter Koehler and Katharina Konitzer) 2014 の第 1 章 Celiac Disease-A Complex Disorder の一部を翻訳紹介するものである。

## 5. 診断

診断は複雑であり、高レベルの臨床的疑惑を必要とする傾向があるため、CD (Celiac disease) は西洋人集団で最も診断不足の状態の 1 つである。CD の正確な診断は、CD の疑いのある個人にとって非常に重要である。偽陽性の結果は、無制限の生涯にわたる無グルテン食を強いることになる。これは、被災者とその家族の両方にとって大きな課題である。偽陰性の結果は、CD 患者としての潜在的な健康障害を負わせる。特に重篤な症状のある患者の診断の遅れは、主に悪性腫瘍による長期合併症のリスクと死亡率の増加に関連するので、避けるべきである<sup>179)</sup>。しかし、残念なことに遅延は一般的であり、診断前の症状の平均持続期間は 4.5 年から 11 年である。さらに、患者の 4 分の 1 は、診断が行われる前に 3 人以上の医師に相談する必要がある<sup>180)</sup>。CD はさまざまな腸外症状を伴うため、患者は、皮膚科医、リウマチ専門医、歯科医、内分泌専門医、神経科医などの小児科医や消化器専門医以外のさまざまな専門家に診察される。

CD 関連の合併症の一部は、CD が時間内に治療されない限り、元に戻せない場合がある。たとえば、成長遅滞、骨粗鬆症、および異常な歯列は、早期に治療しなければ永久に残る。これらの理由から、集団検診に適した CD が提案されている。ただし、広範な集団スクリーニングの役割については議論の余

地がある。特に、無症候性の人に対するスクリーニングの利点は、健康状態の増加が無グルテン食への固執による負担を上回るかどうかは不明であるため、依然として議論の対象となっている。集団検診に対する賛成論と反対論は、Aggarwal と同僚によってまとめられている<sup>177)</sup>。現在、第一度近親者または他の近親者が生検で確認された CD を持っている人には、スクリーニングが推奨されている。CD に関連することが知られている自己免疫疾患のある人もスクリーニングの候補者である。今後の研究では、無症候性患者の CD 診断の実際的な利点に焦点を当て、診断前後の生活の質の測定および無グルテン食の導入に重点を置くべきである<sup>177)</sup>。大量スクリーニングの効果的な代替法は、微妙な症状または非定型症状のみを抱え、リスクグループに属する個人の間での血清学的スクリーニングによる積極的な症例発見である。教育と医療従事者の意識向上を伴うこのアプローチにより、フィンランドの一般集団で多数の CD 患者が検出された<sup>181)</sup>。

診断のアプローチは、CD の病態機構のより良い理解と、より敏感で特定の血清学的検査の利用可能性のために、ここ数十年の間に変化した。要約すると、診断スキームは以下で構成されている (図 1.9)。

1. 病歴と症候学
2. 血清学的検査
3. 小腸生検での組織学的所見

<sup>1</sup> 神戸女子大学, <sup>2</sup> 日本穀物科学研究会前会長, <sup>3</sup> 辻調理専門学校

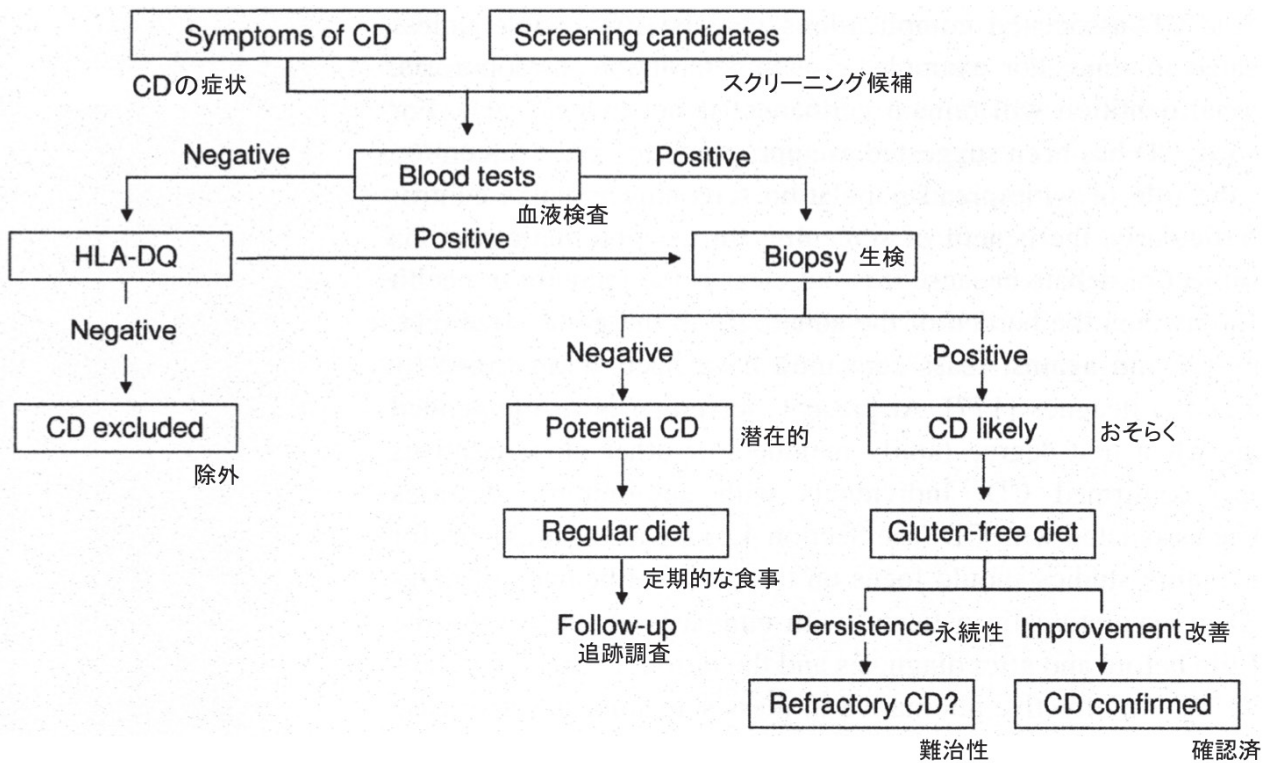


図 1.9 セリアック病 (CD) を診断するために提案されたアルゴリズム (手順)

4. グルテンを含まない食事に対する臨床的および血清学的 (必要に応じて組織学的) 応答

スクリーニングの候補者も同じ手順に従う必要がある。遺伝的 HLA 検査は CD の初期評価には示されていないが、例えば、症候学と血清学の間​​の矛盾または曖昧な小腸生検のために CD 診断が論争のある場合、例えば、症候学と血清学の間​​の矛盾またはあいまいな小腸生検のため役立つ可能性がある。

プライマリケア医 (何でも診る専門医) は診断のプロセスで中心的な役割を果たす。CD のよく知られた症状は、医師に血清学的検査の開始を促すはずである。さらに、自己免疫疾患および CD 患者の第一度近親者は血清学的検査のために考慮されるべきである。診断手順の進め方は異なって評価される。米国消化器病学会は、CD の疑いのある人の診断を確認するために腸生検を義務付けている。対照的に、2004 年のコンセンサス声明では、米国国立衛生研究所は、血清学的所見が陽性である場合、または血清学的結果が診断的でない場合にのみ生検を推奨している<sup>101)</sup>。ESPGHAN(European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) は以前、次の 3 つのステップを推奨していた。

1. 生検→扁平粘膜

2. グルテンフリー食, 生検→寛解 (見かけ正常化) 状態の粘膜

3. グルテンチャレンジ, 生検→扁平粘膜  
チャレンジは平均 3~4 週間実施する必要がある、1 日に 3~4 枚の小麦パンをテストする。3 つの生検を含むこのような患者の負担と時間のかかる手順が必要かどうかの問題により、1990 年に ESPGHAN は、グルテンの場合、グルテンチャレンジは必須ではないことを示唆した (2 歳未満の子供を除く)。無食は生検標本の症状と形態の良好な改善をもたらした<sup>182)</sup>。

2012 年、ESPGHAN は診断ガイドラインの別の改訂版を発表した<sup>183)</sup>。主な結論は、CD の診断は

1. グルテン依存症状
2. CD 特異抗体レベル
3. HLA-DQ2 または HLA-DQ8 対立遺伝子の存在
4. 十二指腸生検における組織学的変化 (絨毛萎縮および陰窩過形成)

前のガイドラインの修正において、IgA TGA (Anti-transglutaminase antibody) 力価が高い場合 (>100 U/mL ⇒ 正常の上限の 10 倍)、十二指腸生検は省略できる。特に子供の場合、生検を省略することで、全身麻酔による内視鏡検査の負担と、この手順の潜在的な悪影響を回避できる。新しい

ESPGHAN の証拠に基づくガイドラインは、選択された症例では生検をスキップすることを推奨していないが、医師が単にそうすることを許可していることに注意しなければならない。クラップと同僚たちの研究は、TGA (Anti-transglutaminase antibody) に対して症候性で陽性の選択された小児において、組織学的所見とは無関係に CD 診断を確立できるという見解を支持した<sup>183)</sup>。しかし、他の研究では、EMA (Anti-endomysium (筋内膜) antibody) および TGA が陰性の小児の予期せぬ頻度の症例が報告されたが、陽性の組織学<sup>184)</sup> およびカットオフ TGA レベルなしは 100% の陽性 CD 予測値<sup>185)</sup> に関連することが見出された。したがって、確認的な腸生検の必要性がまだ存在する可能性がある。すべての場合において、腸粘膜の回復とグルテンを含まない食事での治療後の血清学的検査陰性は、CD の診断の重要な証拠である。

生検が必要な場合は、バルブの 1 つを含む少なくとも 5 つの標本サンプルを収集する必要がある。これが唯一の影響を受ける部位である可能性があるためである。Marsh 3 による絨毛萎縮は、以前は CD の診断を設定するために必要だったが、新しい ESPGHAN ガイドラインは、Marsh 2 も CD 診断に十分であると結論付けている<sup>186)</sup>。診断が確立され、グルテンフリーの食事が導入された場合、CD の追跡と管理のために繰り返し血清学的検査が推奨される。無症候性の患者では、グルテンを含まない食事下での 2 回目の生検で粘膜の組織学的回復を証明することが推奨される。

CD の診断は、患者がグルテンを含む食事をしていく間に行う必要がある。したがって、診断プロセスが終了するまで、通常のグルテンを含む食事を摂取する必要がある。これは、家族が CD と診断されているため、グルテンを含まない食事を摂っている家族には特に強調されるべきである。さらに、多くの患者は、適切な診断検査の前に無グルテン食を開始する。そのような場合、血清学または生検による診断の正確性に対するグルテン離脱の影響は、グルテンを含まない食事の期間と厳格さに依存する。診断結果が不明確な場合は、血清学的異常と特徴的な腸の損傷を再現するのに十分な期間、グルテンを食事に再導入する必要がある<sup>187, 188)</sup>。一部の患者ではグルテン攻撃に対する重度の反応が起こる可能性が

あるため、グルテンを徐々に増やすことを薦める。患者は、1 日に 3～4 枚の小麦パンで 3～4 週間チャレンジする必要がある。症状が再発しない場合、抗体測定を使用して腸生検のタイミングをガイドすることができる。しかし、グルテンを含まない食事を長期間続けた患者は、グルテンが再導入された後、血清学および粘膜組織学の再発に数年かかる場合がある。

CD の診断に対する患者の反応は異なる。古典的な症状のある患者の大部分は、CD と診断され、その状態での生活に適應していることに満足している<sup>189)</sup>。ただし、画面検出された無症候性の人および腸管外症状のある人は、古典的な症状のある人よりも診断を否定的に経験した。古典的な症状なしに診断された少数の患者は、診断されたことを後悔した。

### 5-1. 血清学的検査

CD は、血液と腸組織の両方に現れるグルテン暴露に応答した疾患特異的抗体によって特徴付けられる。現在、血清または血漿サンプルからの抗体の検査が最も頻繁に適用されている。これらの検査は、CD の臨床的疑いのある症候性患者の非侵襲的診断補助として、また診断用小腸生検の患者を選択するために重要である。肯定的な結果は CD の診断を強く支持するが、否定的な結果は病理学的特徴を他の状態と区別するのに非常に役立つ。さらに、抗体検査は、集団のスクリーニングおよびグルテンフリーの食事の順守のフォローアップに非常に役立つ。CD によって引き起こされるものと同様の腸粘膜への損傷を引き起こすことが知られている多くの障害は、これらのテストで偽陽性の結果を与えない。しかし、セロネガティブ (血清陰性) CD の有病率は、診断されたすべての症例の最大 10% を占めることが示されていることを言及する必要がある<sup>190)</sup>。したがって、グルテンを摂取している人の血清陰性は CD の可能性を排除しないことに留意することが重要である。感度と特異度の両感度と特異性という用語は、血清学的検査のパフォーマンスを評価するときに使用される。感度とは、疾患のある患者を正確に識別するテストの能力を指す<sup>191)</sup>。感度が 100% のテストでは、すべての患者が正しく識別される。感度 80% のテストでは、病気の患者の 80%

(真の陽性)が検出されるが、病気の患者の20%は検出されない(偽陰性)。特異性とは、疾患のない患者を正確に識別するテストの能力を指す。テスト80%特異性とは病気の患者を正確にテストネガティブ(真陰性)80%と報告し、病気を持たない患者20%はテストポジティブ(擬陽性)として不正確に同定される。感度と特異性の両方は、テストのカットオフ値に依存する。

最初の血清学的検査は、1970年代および1980年代にAGA(Anti-gliadin antibody)を使用して開発された。最初は免疫蛍光染色に基づいており、次に酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)に基づいていた<sup>192,193)</sup>。IgAクラスのAGAは、やや高い感度に類似していることが示されているが、IgGクラスのAGAと比較して、特異性が大幅に向上している。AGAテストは当初非常に有望であるように見えたが、感度と特異性がかなり低いため、診断上の重要性を失った(表1.3)。AGAは、非セリアック性腸疾患および健康者の5~10%でも検出できる。したがって、診断ガイドラインでは、日常的な診断のためにAGAテストを中止することを推奨している<sup>195)</sup>。AGAはグルテンを含む食事への曝露後に最初に出現し、陽性のままであると考えられるため、2歳未満の子供の検査は例外かもしれないが、他のCD特異抗体は変動する可能性がある<sup>196)</sup>。しかし、より最近の研究では、IgAおよびIgG AGAテストでは、以下に説明するテストと比較して、追加の診断上の利点は得られないことが示された<sup>197,198)</sup>。

AGAの問題は、抗レチキュリン抗体(ARA)およびEMAテストの開発によって克服された。それ

らは、げっ歯類(ARA)または霊長類(EMA)組織を使用した間接免疫蛍光法に基づいている。ほとんどの研究で、それらの感度と特異性は両方とも90%以上であると報告されている。特に、EMA試験は、標準化が容易ではない主観的な半定量的方法である免疫蛍光検出に固有の困難にもかかわらず、長年にわたって診断およびスクリーニングの目的で使用されてきた。この試験では、サル食道またはヒトの臍帯組織のいずれかと、顕微鏡下での各サンプルの個別の読み取りが必要である。これにより、コストが増加し、観察者間のばらつきが懸念される。そのため、研究室で報告されているように、日常的な臨床設定では特異性はそれほど高くないかもしれない<sup>199)</sup>。EMAの結果に関するレポートには、調査したIgクラスの仕様、カットオフ希釈、解釈(正または負)、最高の希釈はまだ正、基質組織の仕様を含める必要がある<sup>186)</sup>。

1997年、TG2(Transglutaminase 2)はCD特異的自己抗原として同定され<sup>113)</sup>、ELISAベースのTGAテストの開発が可能になった。初期のアッセイでは、モルモットの肝臓に由来するTG2を使用していたため、偽陽性の結果が得られた。その後、高感度および特異性を示すヒト組換えTG2を適用した。ユーザーフレンドリーなテストは現在、多くのメーカーによって作成され、CDの最初のスクリーニングツールとして広く使用されている。ただし、市販のTG2 ELISAの性能はTG2抗原の品質によって異なる場合があることに留意することが重要である<sup>119)</sup>。TGA(Anti-transglutaminase antibody)検査結果は、測定されたIgクラスの仕様、製造業者、特定のテスト

表 1.3 血清学的検査の感度と特異性<sup>194)</sup>

Antibody <sup>a</sup>	Sensitivity (Range) (%)	Specificity (Range) (%)
IgA AGA	85 (57-100)	90 (47-94)
IgG AGA	85 (42-100)	80 (50-94)
EMA	95 (86-100)	99 (97-100)
IgA TGA	98 (78-100)	98 (90-100)
IgG TGA	70 (45-95)	95 (94-100)
IgA DGPA	88 (74-100)	95 (90-99)
IgG DGPA	80 (63-95)	98 (90-99)

<sup>a</sup>AGA, anti-gliadin antibody; DGPA, antibody against deamidated gliadin peptides; EMA, endomysial antibody; TGA, TG2-ANTIBODY.

キットに定義されたカットオフ値、および抗体値のレベル等、連絡する必要がある<sup>186)</sup>。

さらなる研究により、TGAの定量的測定を使用して粘膜の状態と疾患の重症度を予測できるかどうかが評価された。結果は、CD患者170人で測定されたIgA TGAレベル (> 30 U/mL) およびIgG TGAレベル (> 15 U/mL) の上昇が、Marsh 3a～3c病変に対する99%の特異性で、より重度の腸萎縮を予測することが実証できた<sup>200)</sup>。IgA TGAのレベルは、子供(n=97)と成人(n=227)の両方でマーシュタイプと高度に相関していることがわかった( $p<0.0001$ )<sup>200)</sup>。絨毛萎縮の程度が低いCD患者は、血清学的所見が陽性になる可能性が低い<sup>201)</sup>。

CD特異的抗体の検出は、ポイントオブケア(POC)テスト(簡易迅速検査)でラピッドテストキットを使用して指先で行うこともできるが、循環抗体の半定量テストとしてのみ行われる<sup>202-204)</sup>。現在、医療専門家が使用できるPOCテストがいくつかある。これらのテストの利点には、解釈の容易さ(ポジティブまたはネガティブ)、実験室での処理の必要性、数分以内の結果の入手可能性が含まれる。ただし、感度と特異性はほとんどのELISAベースのアッセイよりも低く、より多くの研究が明らかに必要である。人間の唾液中のTGA(Anti-transglutaminase antibody)の検出も可能であり、グルテンフリー食の前のモニターに用いられる。

EMA(Anti-endomysium antibody)の特異性はTGAの特異性よりも高いことが証明されているため、EMA(Anti-endomysium antibody)の使用はTGAテスト後の確認テストとして提案されている<sup>205)</sup>。連続テスト(TGA+EMA)は、CDの診断が本当に健康な患者に誤って割り当てられるリスクを減らすことができる。EMAおよびTGAテストは通常、IgAクラスの抗体に基づいており、IgA欠乏症の場合(血清総IgA<0.2 g/L)にのみIgGクラスの抗体が使用される。2004年、検出のための新しいテスト、エピトープQPEQFPを認識するDGPA(antibody against deamidated gliadin peptides)が導入された。これは、感度と特異性に従って有望な結果を表示する<sup>110)</sup>。ただし、IgA TGAテストは、IgA DGPAテストよりもパフォーマンスが大幅に向上し、コストも低くなる。さらに、最近のメタ分析では、IgA DGPAテストはIgA TGAテストよりも感度

が低いことが示されている<sup>206)</sup>。

IgA抗体を用いた検査は、IgA欠乏症患者のCDの可能性を評価するのに役立つ。選択的IgA欠乏症はCD患者の約10%に認められ<sup>190)</sup>(一般集団よりも約10倍高い)、IgA抗体検査の偽陰性結果を引き起こす可能性がある。このシナリオでは、IgA合計の同時測定を考慮する必要がある。IgG DGPA(Deamidated gliadin peptide antibody)テストの感度と特異性は、IgG TGAテストの感度と特異性よりも高いため、IgA欠損者のテストに使用する必要がある。比較テストの特性を表1.3<sup>194)</sup>に示した。IgG EMAおよびIgG TGA検査は2歳未満の小児では感度が低いようであるため、非常に幼い小児にはより感度の高いIgG DGPA検査が推奨される<sup>207)</sup>。

DGPAはTGAよりも早期に出現することが報告されており、グルテンを含まない食事ではより早く解消することさえあり、食事のコンプライアンス(ルール)を監視するのに役立つ可能性があることを示唆している。要約すると、IgA TGAアッセイとIgG DGPAアッセイの組み合わせは、CDのスクリーニングに最適な組み合わせとして適合させる必要がある<sup>160)</sup>。高い抗体価が存在する場合は、十二指腸生検を避けることができる<sup>208)</sup>。

15の市販のELISAキット(IgA/IgG TGAおよびDGPA, IgG AGA)およびIgA EMAアッセイの性能と診断精度をRozenbergと同僚によって比較した<sup>209)</sup>。結果は、最大感度と最大特異性の両方に対する臨床的要求は、単一のテストでは達成できないことを実証した。4つのテスト(IgA DGPA, IgG DGPA, IgA TGA, IgA EMA)の組み合わせにより、それぞれ99%および100%の陽性および陰性の予測値が得られた。しかし、CDの確認のために腸の生検を避けることを目的とする場合、臨床診療での血清学的検査の正確性については、さらなる研究が必要になる可能性がある<sup>210)</sup>。

上記のテストのいずれも、腸の炎症のわずかな変化またはグルテン暴露の限られた期間に対する高い反応性を示していない。TG2の安定化されたオープン(アクティブ)コンフォメーションに対する抗体を測定することによるこの問題の解決策が提案されている<sup>211)</sup>。この開いたコンフォメーションTG2は、固有層のグルテンペプチドと架橋し、得られた複合体は、この複合体に対する抗体を産生する追加

の免疫応答をトリガーする。このテストは、グルテンを含まない食事の順守の評価に対してより敏感であることが示されており、無反応性 CD 患者の診断に役立つ可能性がある。3つの異なる抗原（複合体, TG2, 脱アミド化グリアジンペプチド）の組み合わせにより、スクリーニングテストとして新しい ELISA が開発された<sup>212</sup>。無症状の CD またはサイレント（無言）CD の患者を識別する際に優れた分析感度を提供するようであり、セリアック氷山の探索に役立つ可能性がある。

明白な胃腸障害のない患者では、血清 TGA (Anti-transglutaminase antibody) は存在しない可能性がある。そのような患者は通常、異なる TG (Transglutaminase) アイソザイムと反応する抗体を持っているヘルペス状皮膚炎の TG3 (eTG) と神経学的症状のある患者の TG6 である。セロネガティブ（血清陰性）CD は臨床上の課題であり、個人には血清抗体がないため、臨床的、遺伝的、および組織病理学的基準の統合が必要である<sup>190</sup>。血液抗体による診断が明確でない場合、腸粘膜に存在する CD のバイオマーカーは有用かもしれない。たとえば、腸の培養培地での EMA アッセイは、血清 EMA よりも高い感度 (98%) と特異性 (99%) を持っている<sup>213</sup>。絨毛先端での IEL の数とパターンの評価、および生検サンプルでの上皮内  $\gamma\delta$ T 細胞の増加の検出は、血清学的異常のない軽度の炎症を伴う CD の診断にも役立つ<sup>214</sup>。

POC (Point-of-care) テストを除くすべてのテストには、資格のある要員と実験施設が必要であり、結果は時間遅延後にのみ利用可能である。したがって、血清または全血 TGA の検出のために、いくつかの簡単で迅速な方法が開発された。これらは、良好な感度と特異性を提供する<sup>215,216</sup>。

それらは一滴の血で行うことができ、数分後に視覚的に読むことができる。Balkenhohl と Lisdate は、ヒト血清中のグリアジンと TG2 に対する抗体を検出するためのインピーダンス測定免疫センサーを開発した<sup>217,218</sup>。免疫センサーは、ポリ（ナトリウム 4-スチレンスルホン酸）の高分子電解質層で覆われた使い捨てのスクリーン印刷された金電極への抗原の固定化に基づいている。システムのテストでは許容可能な感度が示されたが、特異性は ELISA 技術と比較して低かった。ガラス状炭素電極上に金ナ

ノ粒子をドーピングした過酸化ポリピロールをプラットフォームとして使用して、TGA 用の新しい無標識インピーダンス測定免疫センサーを構築した<sup>219</sup>。Pividori らは、抗原 (TG2) のグラファイト-エポキシ複合電極への物理的吸収に基づいたアンペロメトリック電気化学免疫センサーを提案した<sup>220</sup>。少数の陽性および陰性血清サンプル（各 10 個）のテストでは、感度が 70%、特異性が 100% であることが明らかになった。最近では、CD 患者からの 29 の血清と 19 のネガティブコントロール血清の合計数は、100% の感度と 84% の特異性を示した<sup>221</sup>。

TG2 抗原でコーティングされた磁気ビーズに基づく CD 診断用の磁気電気化学免疫センサーが、血清サンプル分析に適用された<sup>222</sup>。臨床感度は 100%、臨床特異性は 98%、ELISA キット値との相関は 0.943 である。チオールベースの表面化学を使用して TGA を検出するための電気化学システムが Dulay と同僚によって導入された<sup>223</sup>。結果は、対応する ELISA キットとの優れた相関関係を示した。プラスチック光ファイバーの利用に基づく表面プラズモン共鳴バイオセンサーは、TG2/TGA 複合体の形成を監視するために開発された<sup>224</sup>。得られた結果は、センサーが 30 ~ 3000 nmol/L の濃度範囲で複合体を測定する。IgA および IgG タイプの AGA および TGA の同時検出は、電気化学二重免疫センサーによって達成された<sup>225</sup>。得られた結果は、センサーが従来の ELISA キットの優れた代替品となりうることを示している。DGPA 検出用の最初の電気化学免疫センサーは、Neves と同僚によって説明された<sup>226</sup>。実際の血清サンプルの評価に成功し、提示された方法が CD 診断の有望な分析ツールであることを示した。要約すると、電気化学免疫センサーは、シンプルで費用対効果が高く、ポイントオブケアの分析方法であるため、従来の ELISA 手法の有望な代替手段として表示される。ただし、長期的な安定性や表面効果など、いくつかの制限が依然として残っており、確立された ELISA 法と比較した電気化学免疫センサーの重要な評価には将来の研究が必要である。

血清抗体のほかに、血清 T 細胞は診断目的で使用できる。FleurduPré と共同研究者は、グルテン感受性 T 細胞のより良い検出を可能にする末梢血 T 細胞の新しいサブセットを特定した。これにより、

腸粘膜抗原に対する特異性が向上した<sup>227)</sup>。この研究は CD のサブタイプを特定するために重要な結果をもたらし、治療的反応性を評価する非侵襲的な方法を提供する可能性があります。

## 5-2. 小腸生検

小腸粘膜の組織学的判断は、血清学的検査の利用可能性によりもたらされる診断の進歩にもかかわらず、一般的に CD 診断の基準とみなされている。生検は、小腸のカプセルまたは内視鏡で行うことができる。カプセル生検は、X線透視下で吸引-ギロチン機構を備えたカプセル（たとえば、ワトソнкаプセル）によって行われる。通常、組織片は大きく、方向付けが容易ですが、カプセルを飲み込むことは患者にとって不快であり、医師にとっては労働集約的で時間がかかる<sup>101)</sup>。したがって、標準の光ファイバー機器を使用した内視鏡生検は、カプセル生検にほぼ完全に取って代わった。ビデオカプセル内視鏡検査（VCE）は、数年前に消化器疾患の診断のために臨床診療に導入された。日常の臨床診療における CD 患者での VCE の使用に関する現在の適応を評価するために、VCE はさまざまなヨーロッパのセンターの多くの CD 患者で実施された<sup>228)</sup>。結果は、VCE が RCD（Refractory celiac disease = 不応の celiac disease）の管理に決定的な影響を与える可能性があることを実証したが、残りの患者ではより限定的な役割しか果たさない。Kurien と同僚は、特に抗体陰性の絨毛萎縮を有する患者のあいまいな症例での VCE の使用を提唱している<sup>229)</sup>。VCE は、従来の内視鏡検査を受けられない、または受けたくない患者、血清学的検査および十二指腸生検が正常な患者、および警戒症状を発症する患者にも実施される<sup>230)</sup>。

CD は十二指腸絨毛萎縮の最も一般的な原因ですが、非セリアック性腸症はまれではなく、CD と間違われる可能性がある<sup>231)</sup>。たとえば、熱帯性スプルー、自己免疫性腸疾患、一般的な可変免疫不全、膠原性スプルー、細菌性過成長、炎症性腸疾患、および薬物誘発性粘膜損傷は、絨毛萎縮を引き起こす可能性があり、鑑別診断で除外する必要がある<sup>232)</sup>。これらの障害のほとんどは、正常な TGA レベル、生検での上皮内リンパ球増加症、および無グルテン食に対する組織学的反応の欠如によって特徴付け

られる。非セリアック腸症は、多くの場合、HLA-DQ2/8 検査が陰性であることで確認でき、ほとんどの場合、対象を絞った調査により確定的な病因を確認できる。

歴史的に、生検は空腸から採取された。後に、十二指腸の第二部からの生検は、感度と特異性を失うことなく十分であると考えられてきた。十二指腸球根からの生検は、この領域が胃酸にさらされており、消化性障害を起こしやすいため、注意して解釈する必要がある。しかし、十二指腸球根は、グルテンによって誘発された粘膜損傷を検出する最も敏感な部位であり、十二指腸球根生検は、組織学的診断の精度を高めることができる<sup>233)</sup>。たとえば、Tanpowpong と同僚は、CD の子供 103 人中 6 人が十二指腸球部でのみ Marsh 3 の生検を受けたことを示した<sup>234)</sup>。したがって、実際には、少なくとも 4～6 個の内視鏡標本を十二指腸の第 2 部から採取し、2 個のサンプルを球根部から採取することを提案するのが妥当と思われた<sup>232,235)</sup>。CD 患者はビタミン K が不足していることが多いため、生検の前に凝固検査（coagulation study）を実施する必要がある。

生検ピースは適切に配置されている必要があり、全体で視覚化され、互いに平行に配置された少なくとも 3～4 つの連続した絨毛陰窩ユニットを含む必要がある。生検はすぐに緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンで縁に埋め込み、ヘマトキシリン-エオシンとギムザで染色する必要がある。病理組織学的評価は、内視鏡検査の適応症を知らない経験豊富な病理学者が実施する必要がある。理想的には、消化器疾患の経験を持つ病理学者は生検スライドを検査して、トロピカルスプルー、消化性十二指腸炎、移植片対宿主病などの他の腸疾患と CD を区別する必要がある。生検の顕微鏡的評価では、以下のターゲットを考慮する必要がある：管腔表面（例：感染因子の確認）、腸細胞（例：刷子縁、絨毛および陰窩アーキテクチャの喪失、陰窩過形成）、腸細胞あたりの IEL 数、基底膜（例：肥厚）、粘膜固有層（例：炎症の種類と程度）。絨毛および陰窩のアーキテクチャと IEL の数により、粘膜損傷の程度を軽度から顕著な絨毛萎縮および総絨毛萎縮まで評価できる。それにもかかわらず、観察者間のばらつき、斑状の粘膜損傷、低悪性度の組織病理学的異常、および技術的限界の結果として、偽陽性および偽陰性の診断が

発生する可能性がある<sup>236)</sup>。

絨毛萎縮 (Marsh 3) は、以前は CD の診断を設定するために必要であった。しかし、新しい ESPGHAN ガイドラインでは、これらの患者が実際に CD に苦しんでいることが証明されているため、Marsh 2 も診断の確立に十分であると結論付けている。対照的に、この非特異的病変は他の疾患にも関連している可能性があるため、Marsh 1 病変は CD の診断にはまだ不十分と考えられている。絨毛萎縮の報告と CD の診断のばらつきを避けるため、病理学者間の小腸組織病理学報告の均一性が推奨される<sup>235)</sup>。曖昧な血清学および組織学の場合、生検組織は、EMA (Anti-endomysium antibody) および TGA (Anti-transglutininase antibody) の測定にさらに利用できる<sup>104, 237-240)</sup>。これらの抗体のレベルは臨床症状と相関しており、グルテンを含まない食事の導入後、粘膜抗体と症状の両方が解消した。腸の TGA の測定は、潜在的な CD の特定にも役立つ<sup>239)</sup>。腸組織の IgM TGA の分析は、IgA 欠乏症の患者の診断に役立つかもしれない。

IEL (Intraepithelial lymphocyte) の増加は CD の特徴の 1 つであり、疾患の初期に発見され、寛解の初期に消失する絨毛構造の変化よりも、CD のより敏感なパラメーターである可能性がある。ただし、上皮内リンパ球増加症は CD 専用の機能ではないため、その診断的証拠はより広い臨床的狀況でのみ評価できる。IEL はモノクローナル抗 CD3 抗体で免疫染色するのが最適である。これにより、IEL カウントの精度が大幅に向上する。これは、Marsh 1 病変の同定、特に血清 TGA の上昇を伴う患者での通常の絨毛/陰窩比の生検の評価で特に重要である<sup>241)</sup>。腸の生検から分離された IEL は、固形組織の研究に広く使用されている技術であるフローサイトメトリーによって測定できる<sup>242)</sup>。上皮細胞 100 個あたり 25 ~ 29 個の IEL のカウントは境界線の増加とみなされ、30 個以上のカウントは IEL の明確な増加を表す<sup>232)</sup>。IEL の増加は、血清学的異常を欠く軽度の炎症を伴う CD の場合、および CD と他の免疫介在性腸疾患の鑑別診断において有用な診断バイオマーカーとなり得る。組織学で Marsh 2 ~ 3 と一致する病変が示された場合、CD の診断が確認される。組織学が正常 (Marsh 0) または IEL カウントの増加のみを示す場合 (Marsh 1)、診断を確定する

前にさらにテストを実施する必要がある<sup>186)</sup>。

### 5-3. HLA-DQ テスト

CD 固有の HLA-DQ2/8 対立遺伝子を除き、他の遺伝子検査で説得力のある疾患の関連性は発見されていない、あるいは研究分野から臨床実践への道筋も見出されていない。CD 患者の 95% 以上が HLA-DQ2/8 陽性であると推定されている。しかし、DQ2/DQ8 対立遺伝子は白人集団では非常によく見られ (25% 以上) るが、発展途上国では CD を発症しても約 1% であり、このため、陽性の DQ2/DQ8 を使用して CD の診断を確認することはできない。たとえば、DQ2/DQ8 検査では、463 人の中で CD の陽性的中率がわずかに 6% であることが示された<sup>243)</sup>。

CD リスク予測は、将来、一般的な HLA 検査に非 HLA 感受性変異体を追加することにより改善される可能性がある<sup>244)</sup>。何よりも、HLA テストは CD の存在を除外するために使用する必要がある。CD には高い負の予測値 (≒ 97%) があるためである<sup>245)</sup>。HLA-DQ タイピングとは、リスクの高いグループにおける費用を節約する一次スクリーニングのステップであり、そこには例えば 1 型糖尿病、ダウン症候群、ターナー症候群などの CD に関連することが知られているような自己免疫および非自己免疫状態を持つ患者と、確認された症例をもつ第一度近親者患者を含む。さらに、他の検査に基づいた診断が明確でない場合、排他的な意味で有用な補助剤となり得る<sup>246)</sup>。このような場合、患者が HLA-DQ2/8 に陰性である場合、CD は一生除外することができ、さらなる調査と追跡調査は必要ない。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に基づく市販の DNA テストが利用可能になり、HLA-DQ2/8 の対立遺伝子の決定が可能になった。HLA-DQ2.2 がまれでも、DQ2.5 および DQ8<sup>247)</sup> 以外のテストに含める必要がある。DNA は、頬スワブまたは血液サンプルの細胞から抽出され、PCR によって分析される。タグ-塩基多型、半自動化された配列特異的プライマー PCR、融解曲線解析に続くリアルタイム PCR の使用などの新しい手法により、HLA タイピングが比較的 low コストで簡単かつ高速になった<sup>186)</sup>。指示された HLA タイピングにキャピラリー電気泳動を使用すると、試薬費用と技術時間を削減できる可能性がある<sup>248)</sup>。すでにグルテンを含まない食事



に固執している患者のCDを診断するために、いわゆるHLA-DQ2-グリアジン四量体試験が開発された<sup>249)</sup>。ビオチン化組換えDQ2.5ヘテロダイマーは、グルテンエピトープペプチドと複合している。これらの四量体は、蛍光標識ストレプトアビジンで多量体化され、4枚の白パンで3日間攻撃された潜在的

なCD患者の血液中のエピトープ特異的CD4<sup>+</sup>T細胞を検出するために使用された。4量体結合T細胞の数はグルテンの攻撃0と6日目にフォーサイトメトリーで測定した。この方法は既にグルテンフリー食事でそれらに設立した個人地位CD測定に正確な検知をしている。

## References

179. Rubio-Tapia A., Murray J.A.: Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010;**26**:116–122.
180. Evans K.E., Hadjivassiliou M., Sanders D.S.: Is it time to screen for adult coeliac disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;**23**:833–838.
181. Virta L.J., Kaukinen K., Collin P.: Incidence and prevalence of diagnosed coeliac disease in Finland: results of effective case finding in adults. *Scand J Gastroenterol.* 2009;**44**:933–938.
182. Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child.* 1990;**65**:909–911.
183. Klapp G., Masip E., Bolonio M., Donat E., Polo B., Ramos D. *et al.*: Celiac disease: the new proposed ESPGHAN diagnostic criteria do work well in a selected population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;**56**:351–356.
184. Makovicky P., Rimarova K., Boor A., Makovicky P., Vodicka P., Samasca G. *et al.*: Correlation between antibodies and histology in celiac disease: incidence of celiac disease is higher than expected in the pediatric population. *Mol Med Rep.* 2013;**8**:1079–1083.
185. Fernandez-Baneres F., Alsina M., Modolell I., Andujar X., Piqueras M., Garcia-Puig R. *et al.*: Are positive serum-IgA-tissue-transglutaminase antibodies enough to diagnose coeliac disease without a small bowel biopsy? Post-test probability of coeliac disease. *J Crohns Colitis.* 2012;**6**:861–866.
186. Husby S., Koletzko S., Korponay-Szabo I.R., Mearin M.L., Phillips A., Shamir R. *et al.*: European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;**54**:136–160.
187. Cotton D., Taichman D., Williams S., Crowe S.E.: Celiac disease. *Ann Intern Med.* 2011 ITC5-2-16.
188. Leffler D., Schuppan D., Pallav K., Najarian R., Goldsmith J.D., Hansen J. *et al.*: Kinetics of the histological, serological and symptomatic responses to gluten challenge in tests: sensitivity and specificity. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain.* 2008;**8**:221–223.
192. Buerger-Wolff A., Hernandez R., Just M., Signer E.: Immunofluorescent antibodies against gliadin: a screening test for coeliac disease. *Helv Paediatr Acta.* 1976;**31**:375–380.
193. O'Farrelly C., Kelly J., Hekkens W., Bradley B., Thompson A., Feighery C. *et al.*: Alpha gliadin antibody levels: a serological test for coeliac disease. *Br Med J.* 1983;**286**:2007–2010.
194. Leffler D.A., Schuppan D.: Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2010;**105**:2520–2524.
195. Hill I.D., Dirks M.H., Liptak G.S., Colletti R.B., Fasano A., Guandalini S. *et al.*: Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;**40**:1–19.
196. Giersiepen K., Lelgemann M., Stuhldreher N., Ronfani L., Husby S., Koletzko S. *et al.*: Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;**54**:229–241.
197. Foucher B., Johanet C., Jégo-Desplat S., Sanmarco M., Dubucquoi S., Fily-Nalewajk S. *et al.*: Are immunoglobulin A anti-gliadin antibodies helpful in diagnosing coeliac disease in children younger than 2 years? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;**54**:110–112.
198. Richter T., Bossuyt X., Vermeersch P., Uhlig H.H., Stern M., Hauer A. *et al.*: Determination of IgG and IgA antibodies against native gliadin is not helpful for the diagnosis of coeliac disease in children up to 2 years old. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;**55**:21–25.
199. Parizade M., Bujanover Y., Weiss B., Nachmias V., Shainberg B.: Performance of serology assays for diagnosing celiac disease in a clinical setting. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;**16**:1576–1582.
200. Dahlbom I., Korponay-Szabo I., Kovacs J.B., Szalai Z., Maeki M., Hansson T.: Prediction of clinical and mucosal severity of coeliac disease and dermatitis herpetiformis by quantification of IgA/IgG serum antibodies to tissue transglutaminase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;**50**:140–146.
201. Abrams J.A., Diamond B., Rotterdam H., Green P.H.R.: Seronegative celiac disease: increased prevalence with lesser degrees of villous atrophy. *Dig Dis Sci.* 2004;**49**:546–550.
202. Raivio T., Korponay-Szabo I., Collin P., Laurila K., Huhtala H., Kaartinen T. *et al.*: Performance of a new rapid whole blood coeliac test in adult patients with low prevalence of endomysial antibodies. *Dig Liver Dis.* 2007;**39**:1057–1063.
203. Popp A., Jinga M., Jurcut C., Balaban V., Bardas C., Laurila K. *et al.*: Fingertip rapid point-of-care test in adult case-finding in coeliac disease. *BMC Gastroenterol.* 2013;**13**:115.
204. Mooney P.D., Kurien M., Sanders D.S.: Simtomax, a novel point of care test for coeliac disease. *Expert Opin Med Diagn.* 2013;**7**:645–651.
205. Rostom A., Dube C., Cranney A., Saloojee N., Sy R., Garrity C. *et al.*: The diagnostic accuracy of serological tests for celiac disease: a systemic review. *Gastroenterology.* 2005;**128**:S38–S46.
206. Lewis N.R., Scott B.B.: Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;**31**:73–81.

207. Amarrì S., Alvisi P., Giorgio R., Gelli M.C., Cicola R., Tovoli F. *et al.*: Antibodies to deamidated gliadin peptides: an accurate predictor of coeliac disease in infancy. *J Clin Immunol.* 2013;**33**:1027–1030.
208. Vivas S., Ruiz de Morales J.G., Riestra S., Arias L., Fuentes D., Alvarez N. *et al.*: Duodenal biopsy may be avoided when high transglutaminase antibody titers are present. *World J Gastroenterol.* 2009;**15**:4775–4780.
209. Rozenberg O., Lerner A., Pacht A., Grinberg M., Reginashvili D., Henig C. *et al.*: A novel algorithm for the diagnosis of celiac disease and a comprehensive review of celiac disease diagnostics. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012;**42**:331–341.
210. Buerger-Wolff A., Buser M., Hadziselimovic F.: Intestinal biopsy is not always required to diagnose celiac disease: a retrospective analysis of combined antibody tests. *BMC Gastroenterol.* 2013;**13**:19.
211. Pallav K., Leffler D.A., Bennett M., Tariq S., Xu H., Kabbani T. *et al.*: Open conformation tissue transglutaminase testing for celiac dietary assessment. *Dig Liver Dis.* 2012;**44**:375–378.
212. Tozzoli R., Kodermaz G., Tampoia M., Visentini D., Tonutti E., Bizzaro N.: Detection of autoantibodies specific for transglutaminase-gliadin peptides complex: a new way to explore the celiac iceberg? *Riv Ital Med Lab.* 2010;**6**:28–35.
213. Carroccio A., Iacono G., di Prima L., Pirrone G., Cavataio F., Ambrosiano G. *et al.*: Antiendomysium antibodies assay in the culture medium of intestinal mucosa: an accurate method for celiac disease diagnosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;**23**:1018–1023.
214. Collin P., Kaukinen K., Maeki M.: Duodenal intraepithelial lymphocytosis: celiac disease or not? *Am J Gastroenterol.* 2009;**104**:1847.
215. Korponay-Szabo I.R., Szabados K., Pusztai J., Uhrin K., Ludmany E., Nemes E. *et al.*: Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: diagnostic accuracy and feasibility study. *Br Med J.* 2007;**335**:1244–1247.
216. Baviera L.C.B., Aliaga E.D., Ortigosa L., Litwin N., Pena-Quintana L., Mendez V. *et al.*: Celiac disease screening by immunochromatographic visual assays: results of a multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;**45**:546–550.
217. Balkenhohl T., Lisdat F.: An impedimetric immunosensor for the detection of autoantibodies directed against gliadins. *Analyst.* 2007;**132**:314–322.
218. Balkenhohl T., Lisdat F.: Screen-printed electrodes as impedimetric immunosensors for the detection of anti-transglutaminase antibodies in human sera. *Anal Chim Acta.* 2007;**597**:50–57.
219. West N., Baker P., Priscilla G.L., Arotiba O.A., Hendricks N.R., Baleg A.A. *et al.*: Overoxidized polypyrrole incorporated with gold nanoparticles as platform for impedimetric anti-transglutaminase immunosensors. *Anal Lett.* 2011;**44**:1956–1966.
220. Pividori M.I., Lermo A., Bonanni A., Alegret S., del Valle M.: Electrochemical immunosensor for the diagnosis of celiac disease. *Anal Biochem.* 2009;**388**:229–234.
221. Kergaravat S.V., Beltramino L., Gamero N., Trotta L., Wagener M., Pividori M.I. *et al.*: Electrochemical magneto immunosensor for the detection of anti-TG2 antibody in celiac disease. *Biosens Bioelectron.* 2013;**48**:203–209.
222. Adornetto G., Volpe G., de Stefano A., Martini S., Gallucci G., Manzoni A. *et al.*: An ELIME assay for the rapid diagnosis of coeliac disease. *Anal Bioanal Chem.* 2012;**403**:1191–1194.
223. Dulay S., Lozano-Sanchez P., Iwuoha E., Katakis I., O'Sullivan C.K.: Electrochemical detection of celiac disease-related anti-tissue transglutaminase antibodies using thiol based surface chemistry. *Biosens Bioelectron.* 2011;**26**:3852–3856.
224. Cennamo N., Varriale A., Pennacchio A., Staiano M., Massarotti D., Zeni L. *et al.*: An innovative plastic optical fiber-based biosensor for new bio/applications. The case of celiac disease. *Sens Actuators B Chem.* 2013;**176**:1008–1014.
225. Neves M.M.P.S., Gonzales-Garcia M.B., Delerue-Matos C., Costa-Garcia A.: Multiplexed electrochemical immunosensors for detection of celiac disease serological markers. *Sens Actuators B Chem.* 2013;**187**:33–39.
226. Neves M.M.P.S., Gonzalez-García M.B., Nouws H.P.A., Costa-García A.: An electrochemical deamidated gliadin antibody immunosensor for celiac disease clinical diagnosis. *Analyst.* 2013;**138**:1956–1958.
227. Fleur du Pre M., van Berkel L.A., Raki M., van Leeuwen M.A., de Ruiter L.F., Broere F. *et al.*: CD62LnegCD38<sup>+</sup> expression on circulating CD4<sup>+</sup> T cells identifies mucosally differentiated cells in protein fed mice and in human celiac disease patients and controls. *Am J Gastroenterol.* 2011;**106**:1147–1159.
228. Collin P., Rondonotti E., Lundin K.E.A., Spada C., Keuchel M., Kaukinen K. *et al.*: Video capsule endoscopy in celiac disease: current clinical practice. *J Dig Dis.* 2012;**13**:94–99.
229. Kurien M., Evans K.E., Aziz I., Sidhu R., Drew K., Rogers T.L. *et al.*: Capsule endoscopy in adult celiac disease: a potential role in equivocal cases of celiac disease? *Gastrointest Endosc.* 2013;**77**:227–232.
230. Tennyson C.A., Ciaccio E.J., Lewis S.K.: Video capsule endoscopy in celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012;**22**:747–758.
231. Pallav K., Leffler D.A., Tariq S., Kabbani T., Hansen J., Peer A. *et al.*: Noncoeliac enteropathy: the differential diagnosis of villous atrophy in contemporary clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;**35**:380–390.
232. Bao F., Bhagat G.: Histopathology of celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012;**22**:679–694.
233. Gonzalez S., Gupta A., Cheng J., Tennyson C., Lewis S.K., Bhagat G. *et al.*: Prospective study of the role of duodenal bulb biopsies in the diagnosis of celiac disease. *Gastrointest Endosc.* 2010;**72**:758–765.
234. Tanpowpong P., Broder-Fingert S., Katz A.J., Camargo Jr. C.A.: Predictors of duodenal bulb biopsy performance in the evaluation of coeliac disease in children. *J Clin Pathol.* 2012;**65**:791–794.
235. Arguelles-Grande C., Tennyson C.A., Lewis S.K., Green P.H.R., Bhagat G.: Variability in small bowel histopathology reporting between different pathology practice settings: impact on the diagnosis of coeliac disease. *J Clin Pathol.* 2012;**65**:242–247.
236. Mohamed B.M., Feighery C., Coates C., O'Shea U., Delaney D., O'Briain S. *et al.*: The absence of a mucosal lesion on standard histological examination does not exclude diagnosis of celiac disease. *Dig Dis Sci.* 2008;**53**:52–61.
237. Not T., Zibera F., Vatta S., Quaglia S., Martelossi S., Villanacci V. *et al.*: Cryptic genetic gluten intolerance revealed by intestinal antitransglutaminase antibodies and response to gluten-free diet. *Gut.* 2011;**60**:1487–1493.
238. Rathsmann S., Tysk C., Eriksson S., Hultgren O., Aaberg A.K., Olcen P.: Elution of antitransglutaminase antibodies from duodenal biopsies: a novel approach in the diagnosis of celiac disease. *APMIS.* 2012;**120**:666–674.
239. Tosco A., Aitoro R., Auricchio R., Ponticelli D., Miele E., Paparo F. *et al.*: Intestinal anti-tissue transglutaminase antibodies in

- potential coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 2013;**171**:69–75.
240. Picarelli A., di Tola M., Marino M., Libanori V., Borghini R., Salvi E. *et al.*: Usefulness of the organ culture system when villous height/crypt depth ratio, intraepithelial lymphocyte count, or serum antibody tests are not diagnostic for celiac disease. *Transl Res: J Lab Clin Med*. 2013;**161**:172–180.
  241. Ravelli A., Villanacci V.: Tricks of the trade: how to avoid histological pitfalls in celiac disease. *Pathol Res Pract*. 2012;**208**:197–202.
  242. Leon F.: Flow cytometry of intestinal intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *J Immunol Methods*. 2011;**363**:177–186.
  243. Hadithi M., vonBlomberg B.M.E., Crusius J.B.A., Bloemena E., Kostense P.J., Meijer J.W.R. *et al.*: Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Ann Intern Med*. 2007;**147**:294–302.
  244. Romanos J., Rosen A., Kumar V., Trynka G., Franke L., Szperl A. *et al.*: Improving coeliac disease risk prediction by testing non-HLA variants additional to HLA variants. *Gut*. 2014;**63**:415–5422.
  245. Ludvigsson J.F., Green P.H.: Clinical management of coeliac disease. *J Intern Med*. 2011;**269**:560–571.
  246. Hadithi M., Pena A.S.: Current methods to diagnose the unresponsive and complicated forms of coeliac disease. *Eur J Intern Med*. 2010;**21**:247–253.
  247. Mubarak A., Spierings E., Wolters V., van Hoogstraten I., Kneepkens C.M.F., Houwen R.: Human leukocyte antigen DQ2.2 and celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;**56**:428–430.
  248. Lavant E.H., Carlson J.: HLA DR-DQ genotyping by capillary electrophoresis for risk assessment for celiac disease. *Methods Mol Biol*. 2013;**919**:297–307.
  249. Brottveit M., Raki M., Bergseng E., Fallang L.E., Simonsen B., Loevik A. *et al.*: Assessing possible coeliac disease by an HLA-DQ2-gliadin tetramer test. *Am J Gastroenterol*. 2011;**106**:1318–1324.