

22. ANCA関連血管炎における抗HMG1/HMG2抗体

尾崎 承一 (京都大学医学部臨床病態医科学講座)

傍島 淳子 (京都大学医学部臨床病態医科学講座)

上杉 裕子 (京都大学医学部臨床病態医科学講座)

中尾 一和 (京都大学医学部臨床病態医科学講座)

吉田 充輝 (東京理科大学基礎工学部生物工学科)

KEYWORD=ANCA、HMG1、HMG2、古典的PAN、MPA

[研究要旨]

古典的結節性多発動脈炎(PAN)、顕微鏡的多発血管炎(MPA)および壊死性半月体形成性腎炎(NCGN)、Churg-Strauss症候群(CSS)における抗HMG1/HMG2抗体の意義を間接蛍光抗体法、ELISAで解析した。P-ANCAは、MPA、NCGNの100%、CSSの90%、PANの40%に陽性であった。抗MPO抗体は、MPA、NCGNの100%、CSSの80%、PANの0%に検出された。抗HMG1/HMG2抗体は、MPAの0%、NCGNの43%、CSSの60%、PANの40%に検出された。抗MPO抗体と抗HMG1/HMG2抗体の各疾患での検出頻度の違いは、ANCA関連血管炎のなかでの病態の違いを反映するものと思われた。また、PANのP-ANCA陽性の一例は、抗HMG1/HMG2抗体が極めて高力価を示し、多発肝小動脈瘤を認めた。抗HMG1/HMG2抗体は自己免疫性肝疾患と密接な関連のある抗体であるが、この症例はそれらと血管炎との関係に重要な示唆を与えた。

Anti-HMG1/HMG2 antibodies in ANCA-related vasculitis

[Aim] To investigate the clinical and pathological significance of anti-HMG1/HMG2 antibodies in classical polyarteritis nodosa (PAN), microscopic polyangiitis (MPA), necrotizing crescentic glomerulonephritis (NCGN) and Churg-Strauss syndrome (CSS).

[Methods] Serum samples from 5 patients with PAN (including 3 patients with cutaneous PAN), 11 patients with MPA, 7 patients with NCGN and 10 patients with CSS. ANCA were tested by routine indirect immunofluorescence (IIF).

Antibodies to HMG1, HMG2 and myeloperoxidase (MPO) were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay.

[Results] P-ANCA were detected in 100% of patients with MPA and NCGN, 90% of patients with CSS and 40% of patients with PAN. Anti-MPO antibodies were detected in 100% of patients with MPA and NCGN, 80% of patients with CSS and 0% of patients with PAN. Anti-HMG1/HMG2 antibodies were detected in 0% of patients with MPA, 43% of patients with NCGN, 60% of patients with CSS and 40% of patients with PAN. One patient with PAN, positive for anti-HMG1/HMG2 antibodies, showed small aneurysms in only hepatic artery.

[Conclusion] Anti-HMG1/HMG2 antibodies were useful to distinguish MPA/NCGN and classical PAN together with anti-MPO antibodies. Anti-HMG1/HMG2 antibodies seemed to related with vasculitis in the liver.

[研究目的]

血管炎症候群は侵される血管のサイズにより分類されてきたが、ANCAの登場により、ANCA関連血管炎とその他という新たな分類が試みられている。今回我々は従来の分類によれば中型血管炎に属する古典的結節性多発動脈炎（PAN）と小型血管炎に属する顕微鏡的多発血管炎（MPA）および壊死性半月体形成性腎炎（NCGN）、Churg-Strauss症候群（CSS）におけるANCAを間接蛍光抗体法（IIF）と酵素抗体法（抗MPO抗体と抗HMG1/HMG2抗体）により検討した。

[研究方法]

当院および関連病院で確定診断のついたPAN5名（3名はcutaneous PAN）、MPA11名およびNCGN7名、CSS10名の血清を用いた。ANCAは、エタノール固定した好中球およびリンパ球、ホルマリン固定した好中球を基質とする間接蛍光抗体法（IIF）により判定した。抗HMG1/HMG2抗体と抗MPO抗体は、酵素抗体法により検討した。ブタHMG1およびHMG2は、ブタ胸腺から精製した。MPOは、Elastin Products社製を用い、いずれもSDS-PAGEで精製度を確認し、5 μ g/mlの濃度で50 μ lずつマイクロタイタープレートに貼った。いずれの抗体価も、陽性血清の希釈曲線から読みとり、陽性血清を100units/ml（抗HMG1/HMG2抗体）、288units/ml（抗MPO抗体）と仮定したときの価であらわした。いずれも、健常人のmean+3SDを越えるものを陽性とした。コントロールとして、健常人23名の血清を用いた。

[結果と考察]

IIFの結果P-ANCAは、MPA、NCGNではともに100%、CSSでは90%、PANでは40%に検出された。抗MPO抗体はMPA、NCGNではともに100%、CSSでは80%に検出されたがPANでは0%であった。抗HMG1ないしHMG2抗体は、MPAでは0%、NCGNでは43%、CSSでは60%、PANでは40%に検出された(図1、表1)。

以上の結果、小型血管炎に属するMPAおよびNCGNでは、全ての患者にP-ANCAが検出され、かつ抗MPO抗体もこれら2疾患では全例陽性であった。しかし、抗HMG1ないしHMG2抗体はMPAでは検出されず、NCGNでは約半数の患者に検出され、血管炎が全身におよぶ場合と、腎に局限する場合とで差異がみられた(Fisher検定、 $P=0.043$)。CSSでは、P-ANCA陽性の9例中7例に抗MPO抗体、5例に抗HMG1ないしHMG2抗体が陽性で、MPO-ANCA関連血管炎の中では、MPAおよびNCGNとは異なる傾向がみられた。また中型筋型動脈の血管炎であるPANの中でP-ANCAが陽性であった2例はともに抗MPO抗体は陰性であり、このうち1例は抗HMG1/HMG2抗体が極めて高力価を示した。この症例は、右季肋部痛とともに急速な胆道系酵素が上昇した経過に対応して、腹腔動脈造影上肝動脈のみに小動脈瘤を認め、肝動脈炎をきたした症例である(図2)。抗HMG1/HMG2抗体は臨床症状の改善とともに低下ないし消失し、これに呼応してIIFにおけるP-ANCAも消失した(図3)。

従来、血管炎症候群は侵される血管のサイズにより分類されてきたが、現実的にはPANとMPAの鑑別は現在も確立された基準はなく、現在のところ抗MPO抗体の有無により両者を鑑別しようと試みられている。今回の我々の結果でも、MPAとNCGNの全例に抗MPO抗体は陽性であるのに対しPANではたとえP-ANCAが陽性であっても抗MPO抗体は陰性であった。一方、抗HMG1/HMG2抗体はMPAでは全例陰性であるのに対し、NCGNおよびMPO-ANCA関連血管炎のひとつであるCSSにおいては検出された。これらの結果、MPO-ANCA関連血管炎の症例を抗MPO抗体のみならず抗HMG1/HMG2抗体の観点からさらに検討することが血管炎症候群の病因の解明の一助となる可能性が示唆された。さらに今回提示したPANの症例は腎病変がなく肝動脈炎のみを認め、P-ANCAが陽性であっても抗MPO抗体は陰性でありHMG1/HMG2がP-ANCAの対応抗原であることが示唆された症例である。HMG1/HMG2は、自己免疫性肝炎のP-ANCA対応抗原であり、また原発性胆汁性肝硬変でもその抗体は高頻度に検出され、抗HMG1/HMG2抗体は、肝臓の自己免疫疾患と極めて密接な関連のある抗体と考えられる。この症例はこれらの自己免疫性肝疾患とHMG1/HMG2の関係を推定する上で重要な示唆を与えるものである。

[結論]

抗MPO抗体はMPA、NCGNでは陽性、PANでは陰性であることが診断上重要であることが示唆された。一方、抗HMG1/HMG2抗体はMPAでは検出されずNCGN、CSS、PANに比較的高頻度に検出された。MPO-ANCA関連血管炎のなかでの病態の違いが示唆され、その鑑別診断の一つとして抗HMG1/HMG2抗体が有用であると思われた。抗HMG1/HMG2抗体は自己免疫性肝疾患と密接な関連があるが、それらと血管炎との関係に重要な示唆を与えるPANの症例が見いだされた。

(謝辞：本文中の肝動脈炎合併PAN症例の血清および臨床データを提供して頂きました天理よろづ相談所病院、八田 和大先生に深謝いたします。)

[参考文献]

1. Sobajima J, Ozaki S, Okazaki T et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in ulcerative colitis: anti-cathepsin G and a novel antibody correlate with refractory type. *Clin Exp Immunol* 1996; 105:120-125.
2. Sobajima J, Ozaki S, Osakada F et al. Novel autoantigens of pANCA in ulcerative colitis: non-histone chromosomal proteins, HMG1 and HMG2. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 107: 135-140.
3. Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H et al. Prevalence and characterization of P-ANCA directed against HMG1 and HMG2 in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 1998; 111:402-407.
4. Uesugi H, Ozaki S, Sobajima J, et al. Prevalence of anti-HMG1/HMG2 antibodies in rheumatic diseases. *J Rheumatol* 1998; 25: 703-9.
5. Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H et al. High mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut* 1999, in press.

[研究業績]

1. Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H, et al. Prevalence and characterization of P-ANCA directed against HMG1 and HMG2 in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 1998;111(2):402-7.
2. Uesugi H, Ozaki S, Sobajima J, et al. Prevalence and characterization of novel

- P-ANCA, antibodies to the high mobility group non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2, in systemic rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 1998;25:703-9.
3. Ozaki S, Sobajima J, Uesugi H, et al. Antibodies to the novel P-ANCA target antigens high mobility group proteins HMG1 and HMG2: A new marker for autoimmune hepatitis?. *Clin. Exp. Immunol.* 1998;112(suppl.1):20.
 4. Uesugi H, Ozaki S, Sobajima J, et al. High mobility group non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2: Are they P-ANCA target antigens? *Clin. Exp. Immunol.* 1998;112(Suppl. 1): 52.
 5. Tanaka M, Ozaki S, Osakada F, et al. Cloning of follistatin-related protein (FRP) as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases. *Int. Immunol.* 1998;10(9):1305-14.
 6. Shinkura N, Ikai I, Yamauchi A, et al. Autoantibodies to FK506 binding protein 12 (FKBP12) in autoimmune diseases. *Autoimmunity*, in press.
 7. Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H, et al. High mobility group non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut*, in press.
 8. Ozaki S.: Hybridomas, T cell. In "Encyclopedia of Immunology, 2nd ed" Delves P. J. editor. 1998; pp.1152-4, Academic Press, London.
 9. 熊谷俊一、森信暁雄、尾崎承一、他. 膠原病患者のレイノー現象に対する塩酸サルボグレラートの臨床効果について。リウマチ、1998;38(3):504-10.
 10. 尾崎承一. 結節性多発動脈炎。「自己免疫でおこる難治性疾患—実地医家のための最新情報—」(坂根剛、編)、医薬ジャーナル社(東京)、1998;pp.45-54.
 11. 尾崎承一. 成人スチル病。「症候群辞典1000」(井廻道夫、他11氏、編)、診断と治療社(東京)、1998;p. 645.
 12. 河野厚、角田賢、尾崎承一、他. シェーグレン症候群。「症候群辞典1000」(井廻道夫、他11氏、編)、診断と治療社(東京)、1998;p. 679.
 13. 尾崎承一. 結節性多発動脈炎。「外来診療のすべて(改訂第2版)」(高久史麿、総監修)、メディカルビュー社(大阪)、1998;pp.794-5.
 14. 上月雅子、尾崎承一、中尾一和. 内科医からみたRAにおけるDMARDsの使用法。「別冊整形外科(No.34)、慢性関節リウマチ—最近の治療の動向」(中村孝志、編)、南江堂(東京)、1998;pp.42-7.

15. 尾崎承一. Behcet病。「内科学」(小俣政男他14氏、編)、医学書院(東京)、(印刷中)
16. 尾崎承一. 結節性多発動脈炎。「分かりやすい内科学」(井村裕夫、編集主幹)、文光堂(東京)、(印刷中)
17. 尾崎承一. トレランスとその破綻。「内科学教科書」(黒川清・松澤佑次、編集主幹)、文光堂(東京)、(印刷中)
18. 傍島淳子、尾崎承一、中尾一和. 新しいP-ANCA対応抗原HMG1/HMG2。最新医学、1998;53(1):136-42.
19. 尾崎承一. 抗好中球細胞質抗体:その対応抗原の多様性。最新医学、1998;53(3月増刊号)、60-8.
20. 傍島淳子、尾崎承一、中尾一和. 抗好中球細胞質抗体(ANCA)。Medical Technology、1998;26(9):11-4.
21. 尾崎承一. High mobility group 蛋白質HMG1/HMG2: その自己抗体の臨床的意義。日本臨床免疫学会誌、1998;21(3):95-107.
22. 岡崎貴裕、上月雅子、尾崎承一、他. CD4+T細胞の細胞障害機構。臨床免疫、1998;30(8):1161-4.
23. 上杉裕子、尾崎承一、中尾一和. P-ANCAとC-ANCA。medicina、1998;35(10):1702-3.
24. 尾崎承一. 難治性関節炎。Medical Practice、1998;15(12):2058-9.
25. 尾崎承一. 全身性エリテマトーデス。Molecular Medicine、35 臨時増刊号「症候・病態の分子メカニズム」1998;491-2.
26. 傍島淳子、尾崎承一. 消化器疾患とANCA。Molecular Medicine、35 臨時増刊号「症候・病態の分子メカニズム」1998;121-2.
27. 尾崎承一. リウマトイド因子。日本内科学会雑誌、1998;87(12):2396-401.
28. 尾崎承一. 新しいP-ANCA対応抗原の同定。炎症と免疫、1999;7(1):53-61.
29. 尾崎承一、傍島淳子、上杉裕子、他. 新規のP-ANCA—抗HMG1/HMG2抗体—その炎症性疾患における意義。炎症、1999;19(1):25-30.

表1 PANとMPO-ANCA関連血管炎におけるANCA陽性率

IIF Positive for antibodies to

	N	P-ANCA	C-ANCA	HMG1	HMG2	HMG1or2	MPO
PAN(cutaneous PAN)	5(3)	2(1)	0(0)	1(0)	2(1)	2(1)	0(0)
MPA	11	11	0	0	0	0	11
NCGN	7	7	0	1	3	3	7
CSS	10	9	0	3	6	6	8

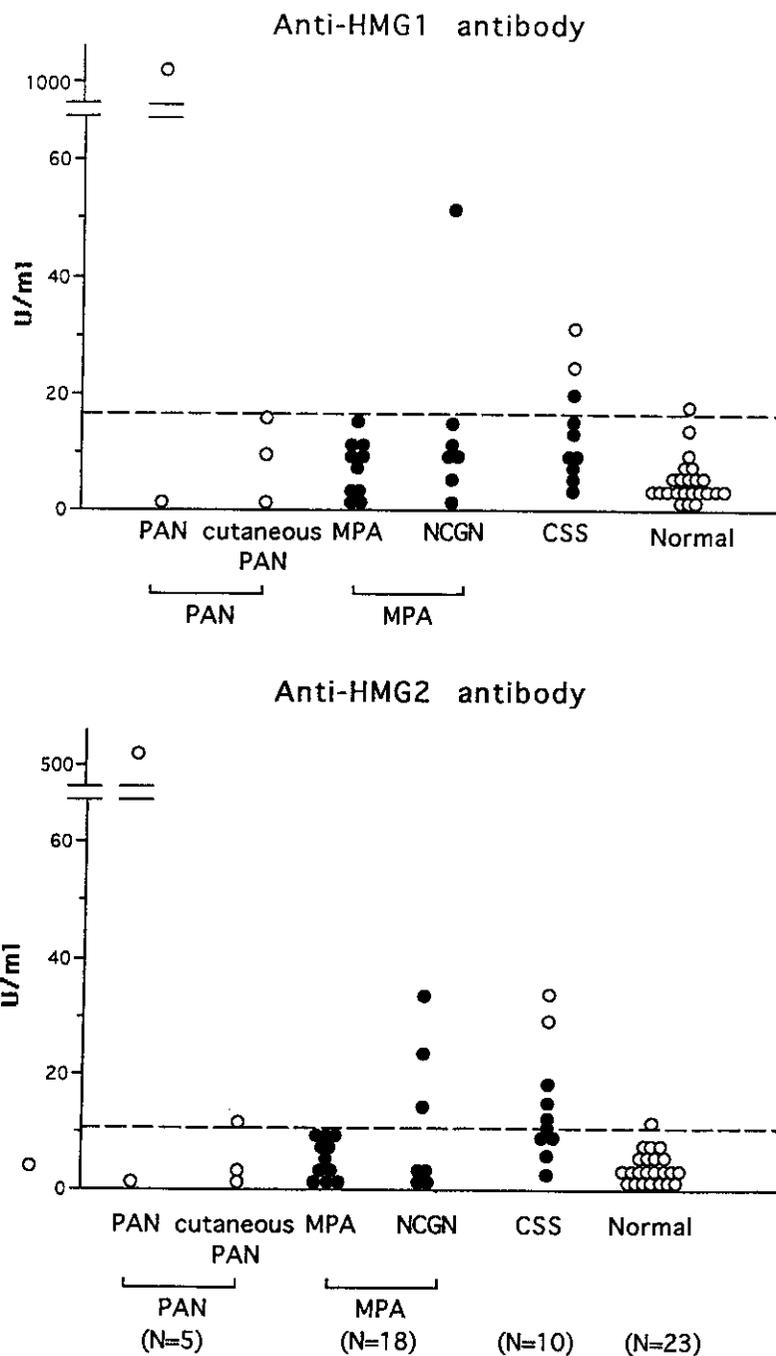


図1 抗HMG1/HMG2抗体力価 破線は健常者の平均値+3SDのcut-off値を示す。●=抗MPO抗体陽性 ○=抗MPO抗体陰性

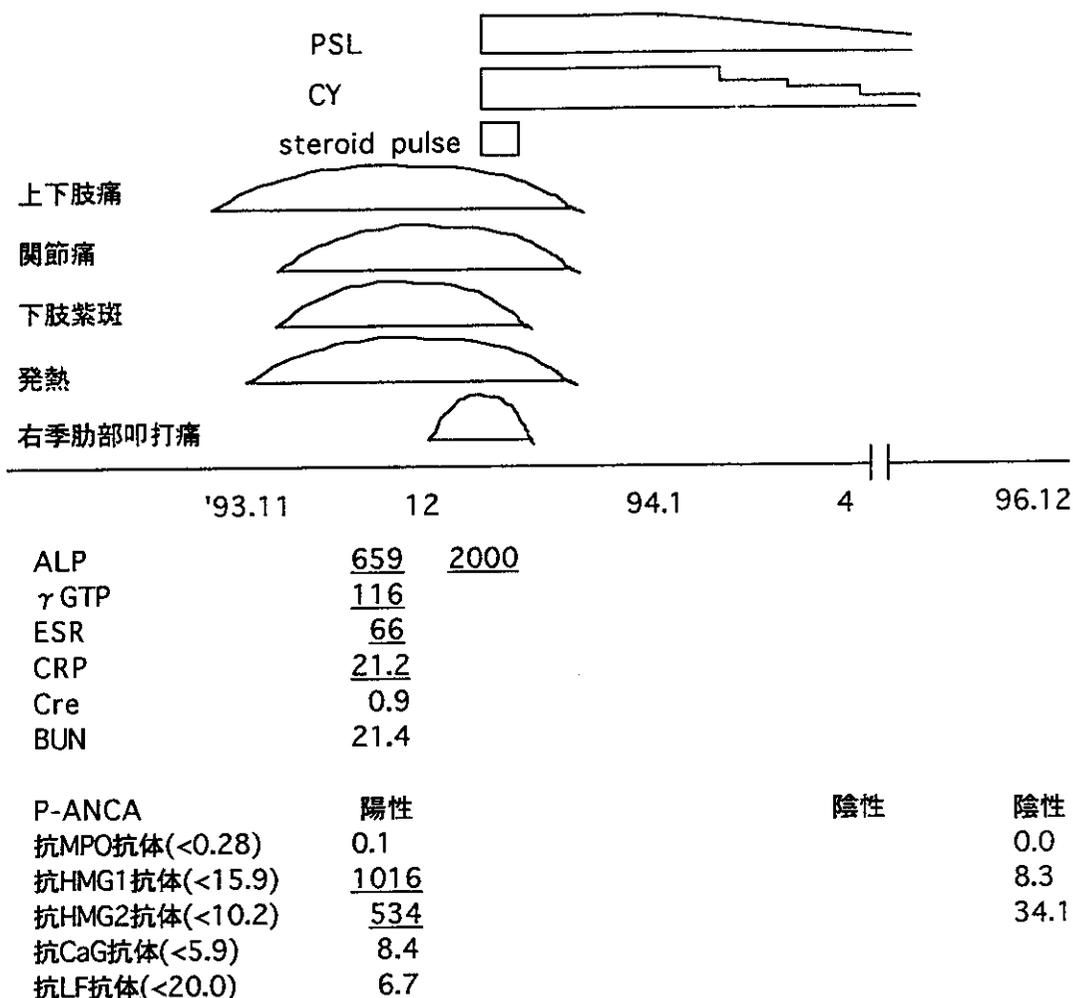


図2 61才女性臨床経過

解熱剤無効の上下肢痛、関節痛、発熱及び下肢紫斑あり、炎症所見、胆道系酵素高値を認められて入院。入院後、急激な胆道系酵素の上昇とともに右季肋部叩打痛を認め、腹腔動脈造影で肝動脈のみに多発性動脈瘤が認められた。皮膚生検で皮下組織に壊死性血管炎が認められた。PSL、CYにより速やかに改善した。

図3



治療前
エタノール固定好中球

治療前
ホルマリン固定好中球

治療後
エタノール固定好中球

23. ANCA による血管内皮細胞障害性および血管内皮細胞上の サイトカイン、細胞接着因子、接着率の検討

吉田雅治 (東京医科大学八王子医療センター 腎臓科)

伊保谷憲子 (東京医科大学八王子医療センター 腎臓科)

<KEYWORD=>抗好中球細胞質抗体, 血管内皮細胞障害性, 細胞接着因子, 接着率,
肺・腎血管炎

[研究要旨]

ANCA関連血管炎の精製ANCA IgGには培養ヒト血管内皮細胞に対して障害性があることをトロンボモデュリン(TM)の系で見出した。ANCAによる血管内皮細胞障害には、好中球のサイトカインによるprimed、細胞接着因子の存在および血管内皮細胞上のIL-1、CD40の発現、好中球の内皮細胞への接着性の増強の関与が認められた。ANCA関連血管炎の病態には、ANCA-サイトカイン-sequence説に加え、細胞接着因子、CD40および好中球の血管内皮細胞への接着性の関与を明らかにした。

Enhancement of intracellular adhesion molecules in human endothelial cells, CD40 expression and adherence of neutrophils to endothelial cells by antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) with renal pulmonary vasculitis

Yoshida Masaharu, Ioya Noriko

Department of Nephrology, Hachioji Medical Center of Tokyo Medical University.

[Aim] Recently novel antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) were discovered to be associated with pulmonary and renal small vessel vasculitis. The aim of this study was to clarify the ability of ANCA to stimulate endothelial expression of interleukin-1 (IL-1), adhesion molecules and CD40 molecules and/or adherence of neutrophils to endothelial cells, which initiate the ANCA cytokine sequence processes.

[Methods] Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and pulmonary microvascular endothelial cells (HMVEC-L) were grown to confluence and were stimulate by ANCA IgG and the tumor necrosis factor (TNF)- α . IL-1, adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) and CD40

messenger RNA (mRNA) were detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. The adherence rate of neutrophils to endothelial cells was measured by peroxidase activity after mixing neutrophils with endothelial cells treated with peroxidase.

[Results] IL-1, ICAM-1, VCAM-1 and CD40 mRNA were found in HUVEC and HMVEC-L in patients with renal pulmonary vasculitis. IL-1, ICAM-1 and VCAM-1 expression reached continuity after exposure to the ANCA with lung hemorrhage and rapidly progressive glomerulonephritis. The Adherence rate of neutrophils to endothelial cells was high in ANCA positive renal and pulmonary vasculitis patients.

[Conclusion] These results indicate that ANCA treatment of HUVEC and HMVEC-L induce sequential expression of IL-1, ICAM-1, VCAM-1, CD40, mRNA and adherence neutrophils to endothelial cells as well as their corresponding severity of ANCA associated renal and pulmonary vasculitis.

[研究目的]

近年、腎および肺を中心とする毛細血管、細小血管レベルの血管炎をきたす抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎症候群の報告例が多く経験されるが、免疫抑制療法の反応性、転帰、予後に多様性を認める^{1), 2)}。

今回自験ANCA関連血管炎症候群において、ANCAによる血管炎発症機序を解明する³⁾ 目的でANCAの血管内皮細胞障害性およびサイトカイン、細胞接着因子、好中球の内皮細胞への接着性について検討した。

[研究方法]

1. 対象症例：ANCA関連血管炎症候群5例 [MPO-ANCA関連血管炎3例 (壊死性半月体形成腎炎 (NCGN) 1例、顕微鏡的多発動脈炎 (MPA) 1例、Wegener症候群 (WG) 1例、PR-3 ANCA関連血管炎2例 (WG2例)] 。

2. ANCAの測定：間接蛍光抗体法⁴⁾ および抗原特異的ELISAを用いてC[proteinase-3 (PR-3)] ANCA⁵⁾ と、P [myeloperoxidase (MPO)] ANCA⁶⁾ を測定した。

3. 培養ヒト血管内皮細胞 [臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) 、肺毛細血管内皮細胞 (HMVEC-L)] 上のinterleukin-1 α (IL-1 α)、細胞接着因子の発現：Bandt7) らの方法に準じ、HUVEC、HMVEC-Lを1-3代継代培養し、confluentになった血管内皮細胞に、ANCA陽性血清IgGを0.5mg/dl、ヒト好中球 (PMN) を 2×10^6 個、腫瘍壊死因子 (TNF) — α 50U/mlを添加培養し、血管内皮細胞よりtotal-messenger (m)-RNAを抽出し、RT-PCRにて増幅後アガロースゲル電気泳動にてIL-1 α 、ICAM-1、VCAM-1、ELAM-1、CD40の発現を検出

した。

4. PMNの血管内皮細胞への接着率を、PMNを継代培養後の血管内皮細胞へ添加混和後、トリプシン-EDTAで処理、1% triton×で溶解し、残存PMNのペルオキシダーゼ活性より算定した。

[結果と考察]

1. ANCA精製IgGによる血管内皮細胞障害性

図1左下にANCA関連血管炎5例のHUVEC上の、ICAM-1、VCAM-1、IL-1 α のmRNAレベルの発現を、コントロールのG3PDHとともに示す。肺出血、急速進行性腎炎(RPGN)を示したANCA関連血管炎症例において、TNF- α 非添加および添加時ともに強く発現していた。

2. ANCA関連血管炎におけるIL-1 α mRNAの発現の経時的変動と臨床経過

図2にPR-3 ANCA関連血管炎2例のIL-1 α mRNAの経時的変動を示す。PR-3 ANCAが30EUと陽性を示し、肺出血を示したN.S.例は、TNF- α 非添加で24時間後に一過性のIL-1 α の発現をHUVEC上に認めたが、TNF- α 添加後にはIL-1 α の発現は全く認められなかった。本例は、ステロイドパルス療法が有効で寛解した。一方、PR-3 ANCAが800EUと高値を示し、RPGNと肺出血を示したT.M.例は、HUVEC上にTNF- α 添加後にconstitutiveな発現を認め、ステロイド大量および免疫抑制剤が無効で死亡した。

3. ANCA IgGと好中球による血管内皮細胞障害

HUVECおよびHMVEC-L上の血管内皮細胞に、ANCA関連血管炎患者5名より精製したIgGにTNF- α 、ヒトPMNを添加培養すると、図1右上に示すように培養上清中に、有意なトロンボモデュリン⁸⁾の上昇を認めた。

4. ANCA IgGによる好中球のHUVECに対する接着率

精製ANCA IgGをTNF- α で刺激した好中球とともにHUVECに添加すると、図1右下に示すように好中球の内皮細胞への接着率が有意に増加した。このANCA IgGによる好中球の内皮細胞への接着性は、抗ICAM-1、抗ELAM-1、抗CD40抗体の前処理により同程度に有意に抑制された。ANCA関連血管炎の血管炎発症機序として、ANCA—サイトカイン—sequence説が想定されているが⁹⁾、ANCAが血管炎の成立に直接どこまで関与しているかは明らかではない¹⁰⁾。そこで、今回培養ヒト血管内皮細胞(HUVEC、HMVEC-L)を用いて、ANCA陽性血清よりの精製IgGを、サイトカイン(TNF- α)添加、非添加の条件で培養し、血管内皮細胞上に発現する細胞接着因子(ICAM-1、VCAM-1、ELAM-1、CD40)およびIL-1 α の発現および、ヒトPMNの血管内皮細胞への接着率と、血管炎による臓器障害度、免疫抑制薬による転帰との関連を解析した。その結果、肺・腎血管炎の高度な肺出血、RPGNを示すANCA関連血管炎の

精製IgGを、HUVEC、HMVEC-Lに添加した際に、ICAM-1、VCAM-1、IL-1 α のmRNAレベルでの発現が認められた。特にTNF- α 添加後のconstitutiveなIL- α の血管内皮細胞上の発現は、強力免疫抑制療法に抵抗性の難治例に見出された。ANCA IgGによる内皮細胞上でのIL-1 α の発現は、ANCA関連血管炎症候群の血管炎の臓器障害の表現型および重症度と関連している可能性が示唆された。次に、精製ANCA IgGを、TNF- α で刺激した好中球とともにHUVEC上に添加すると、ヒト好中球の血管内皮細胞への接着率が有意に増加した。(MPO-ANCA > PR-3 ANCA) このANCA IgGによるヒト好中球の内皮細胞への接着性は、抗ICAM-1、抗ELAM-1、抗CD-40抗体の処理により同程度に阻止された。ANCA関連血管炎よりの精製ANCA IgGを、TNF- α 、ヒト好中球とともにHUVECおよび肺毛細血管内皮細胞に添加した場合、同程度にTMの系で血管内皮細胞障害性があることを見出した。

[結論]

今回の検討成績より図1左上に示すように、ANCA関連血管炎の病態には、ANCA—サイトカイン—sequence説に加え、血管内皮細胞側のサイトカイン、細胞接着因子、CD40の発現および好中球の血管内皮細胞への接着性の経路の関与が示唆された。

[参考文献]

- 1) Jennete JC and Falk RJ: Small vessel vasculitis. *New Eng J Med* 337:1512-1523, 1997.
- 2) Savage COS and Adu LH: Primary systemic vasculitis. *Lancet* 349: 553-558, 1997.
- 3) 吉田雅治: ANCA関連血管炎症候群. *リウマチ科*19: 575-586, 1998.
- 4) 吉田雅治: 抗好中球細胞質抗体. *臨床科学*33: 633-638, 1997.
- 5) 長澤俊彦、有村義宏、吉田雅治 他: Biocarb社ELISA kitによる抗好中球細胞質抗体 (ANCA) の測定法とWegener肉芽腫症の測定成績. *臨床検査機器・試薬* 15: 503-510, 1992.
- 6) 長澤俊彦、有村義宏、吉田雅治 他: ニッショー社製ELISAキットによるMPO-ANCAの基礎的、臨床的検討. *臨床検査機器・試薬* 18: 127-135, 1995.
- 7) De Bandt M, Ollivier V, Meyer L et al: Induction of interleukin-1 and subsequent tissue factor expression by anti-proteinase3 antibodies in human umbilical vein endothelial cells. *Arth Rheum* 40: 2030-2038, 1997.
- 8) M.Yoshida, M.Kozaki, N.Ioya et al: Plasma thrombomodulin levels as an indicator of vascular injury caused by cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 50: 1066-1069, 1990.
- 9) Gross WL, Schmitt WH, Csernok E: ANCA and associated diseases: immunodiagnostic and

24. 血管炎症例における血中血管内皮細胞障害因子検出の試みと 抗好中球細胞質抗体 subsets の蛍光抗体法による検出の基礎的検討

中林 公正(杏林大学第一内科)

長澤 俊彦(杏林大学第一内科)

前川 博行(杏林大学中央検査室)

澤田 範子(杏林大学中央検査室)

大藤 弥穂(杏林大学中央検査室)

蟹由 公子(杏林大学中央検査室)

KEYWORD =血管炎, 血管内皮細胞障害因子, 抗好中球細胞質抗体, 蛍光抗体法

[目的] 血管障害を来す諸疾患で、血清中に存在する血管内皮細胞障害因子(AECF)を、ヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)を用いて、検出を試みた。又、ヒト末梢血好中球細胞を用いて、抗好中球細胞質抗体(ANCA)の検出を、蛍光抗体間接法(IIF)で試みた。[方法] ミニシャーレで培養したHUVECに血清を添加し、培養上清に放出されるthrombomodulin(TM)をEIAで測定した。ANCAの検討は、セロフィルANCA試薬を用いて行った。[成績] 血清添加後24~48時間後に、上清中にTMの放出が認められた。細胞含有培養液：添加血清比は1：1が、最適比であった。ANCAは、抗MPO抗体や抗PR3抗体が高値例では、典型的なP-ANCAやC-ANCA patternとして認められたが、低力価や陰性例では、判定が困難であった。[結語] 血中のAECFを、培養系で放出TMを測定することにより検出する方法を確立した。IIFでANCAを検出することは、低力価や陰性例では、判定上困難が存在した。

A new method for the detection of anti-endothelial cell cytotoxic factor(s) and basic study on the anti-neutrophil cytoplasmic antibody with immunofluorescence staining in patients with angiitis.

Kimimasa Nakabayashi¹⁾, Toshihiko Nagasawa¹⁾, Hiroyuki Maekawa²⁾, Noriko Sawada

²⁾,Yae Oofuji ²⁾,Kiniko Kaniyu²⁾

First Department of Internal Medicine,Kyorin University School of Medicine

¹⁾,Department of Central Laboratory,Kyorin University School of Medicine ²⁾

[Purpose]The study was performed to detect the anti-endothelial cell(ACE) cytotoxic factor(s) and to identify the staining patterns of anti-neutrophil cytoplasmic antibody(ANCA) in sera of patients with various vasculitic diseases. [Method]To detect the AEC cytotoxic factor(s),the cultured endothelial cells from human umbilical cord were incubated with various patients sera for several different hours. Thereafter,the thrombomodulin(TM)s in the supernatant were determined by EIA.The basic study on staining patterns of ANCA in the short-time cultured granulocytes were critically tested by indirect immunofluorescence staining. [Result]AEC cytotoxic factor(s) was demonstrated over the incubation periods from 24 to 48 hrs when present. The staining patterns of ANCA were peripheral nuclear pattern or cytoplasmic pattern in typical cases,but these were any unclear cases not to be classified into these two patterns especillay when stainings were in weak intensity. [Conclusion]A new assay system of AEC cytotoxic factor(s) was established using cultured human umbilical cord cells and the detection of released TM. ANCA staining pattern by indirect immunofluorescence study was not easily identified when in weak intensity,and the further study is needed.

[緒言]

血管障害を来す疾患で、血中に存在し血管内皮細胞に障害性に作用する因子を検出する方法は従来より数種類報告されているが¹⁾⁻³⁾、今回は培養血管内皮細胞より放出される thrombomodulin(TM)を測定する系を用いて検出を試みた。また、ANCAの検出を蛍光抗体法で検討した。

[対象と方法]

1. 血管内皮細胞障害因子の検出法

ヒト臍帯より分離培養した血管内皮細胞(HUVEC)を、ミニシャーレ上に一層に発育させた。洗滌後、培地と血清を種々の比率で培養し、1、3、6、12、24、48時間後に、培地と

血清が混和された上清中のTMを測定した。即ち、血清中の血管内皮細胞障害因子が培養内皮細胞に障害性に作用し、培養上清中に放出されるTMをEIAで測定した。

2. ANCAの蛍光抗体法による検討

Inova Diagnostics社製のセロフィルANCA検出用試薬を用いて、蛍光抗体法でANCAの検出を試みた。ANCA測定用細胞は、短時間培養したヒト好中球である。この細胞に血清を反応させ、FITCラベルの抗ヒトIgで染色し判定した。尚、血清はEIAで抗MPO抗体、抗PR3抗体を測定した既知の血清を用いた。

[成績]

1. 血管内皮細胞障害因子

1) 予備実験

培地と血清の比を、9:1、3:1、1:1で行ったところ、1:1で最も症例によるTM値に差異のある結果を得た(表1)ので、培地0.5mlと血清0.5mlの比で実験を行った。

2) 培養反応時間

1、3、6、12、24、48時間後に上清を回収し、上清中のTM値を測定した。その結果、24時間、48時間反応で、症例による差異が認められた(図1)。1、3、6、12時間では、いずれの症例でも差異が認めにくかった。よって、培養反応時間は24~48時間が妥当と思われる。図2に、症例と健常人の成績を示した。

2. セロフィルANCA検出用試薬を用いての蛍光抗体法によるANCAの検出

抗MPO抗体、抗PR3抗体がEIA測定にて高力価の症例は、蛍光抗体法にても典型的に染色されたが、低力価及び陰性であった症例の判読は困難を極めた。図3(A)、(B)に典型的P-ANCAとC-ANCAを示す。これに対し、P-ANCA陰性でも図4(A)のごとく、P-ANCA類似の所見を呈する症例が存在した。又、健康成人血清で抗PR3抗体陰性であったが、図4(B)のごとく、C-ANCA類似の所見を呈する症例も存在した。さらに、BPI-ANCAが陽性の症例であったが、マクロファージと思われる細胞のみに強くC-ANCA様に染まる症例も存在した。以上のごとく、典型例では判読が容易であったが、非典型例では判読に困難を極めた。

[考察]

血管内皮細胞障害因子をヒト臍帯血管内皮細胞を用いて検出する方法は従来より数種類の方法が報告されている¹⁴⁾。今回は、血中の血管内皮細胞障害因子がHUVECに作用し、HUVECより放出される上清中のTM量をEIAで測定する新しい実験系で、その検出を試みた。初めに種々の条件設定を変更して行った結果、培地：血清比を1:1にし、かつ反応培養時

間を24-48時間にしておこなうのが、最も良い結果を得るとの成績に達した。尚、この反応系で安定した成績を得るには、血管内皮細胞が新鮮で、かつ長期間凍結保存していない細胞であることが重要と思われた。セロフィルANCA検出用試薬を用いての蛍光抗体法によるANCAの検出は、P-ANCA、C-ANCAとも高力価の典型例では判読が容易であった。しかし、低力価の症例や抗体陰性の症例では、P-ANCAやC-ANCAに類似した所見を呈することがあり、種々の立場から再検討を要すると思われた。このことは、従来 of 明瞭なANCA判読可能の考え方よりも、その困難さを支持する論文に一致する成績であった⁴⁾。

【結語】

ヒト臍帯血管内皮細胞を用いて血管内皮細胞障害因子を検出する方法は、従来より数種類報告されているが、今回著者らは独自の方法を確立した。即ち、血管内皮細胞が障害因子により障害され、内皮細胞より放出されるTMを測定する系である。今後この系を用いて、種々の血管障害を示す疾患で検討する必要がある。セロフィルANCA検出試薬による蛍光抗体法によるANCAの検討では、高力価症例では染色パターンの判読が容易であるが、低力価症例や抗PR3抗体・抗MPO抗体陰性の症例では染色パターンの判定に困難を来すことが多く、さらに種々の方面からの検討が必要であると思われた。

【文献】

- 1) Kahaleh MB, Shorer GK, LeRoy EC: Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med* 149:1326-1335, 1979.
- 2) Papa ND, Guidali L, Sironi M, et al: Anti-endothelial cell IgG antibodies from patients with Wegener's granulomatosis bind to human endothelial cells in vitro and induce adhesion molecule expression and cytokine secretion. *Arthritis Rheum* 39:758-766, 1996.
- 3) 吉田俊治、片山雅夫、水谷昭衛、他：血管炎症候群におけるエンドセリン及び抗内皮細胞抗体の検討. 厚生省特定疾患免疫疾患調査研究班 平成8年度研究報告書:61-66, 1997.
- 4) Kallenberg CGM, Brouwer E, Weening JJ, et al: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: Current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int* 46:1-15, 1994.

図1

血中血管内皮細胞障害因子検出の予備実験
 -HUVECをtarget cellとして-

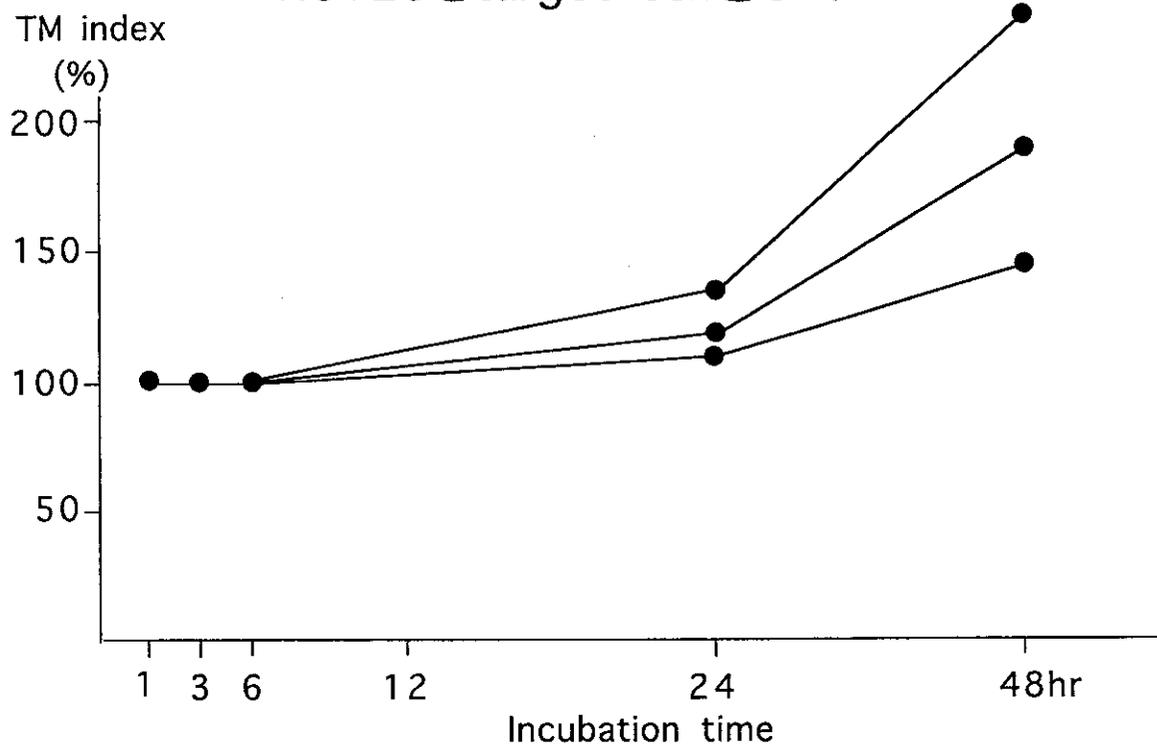
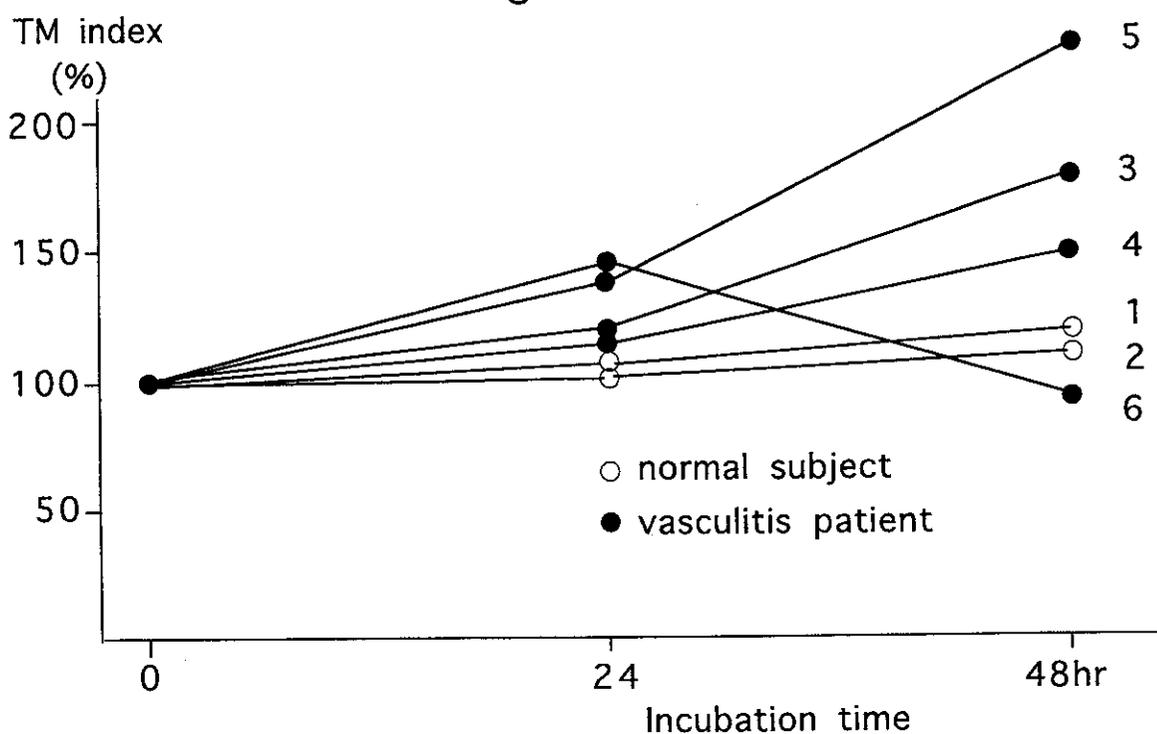


図2

血中血管内皮細胞障害因子検出の予備実験
 -HUVECをtarget cellとして-



25. 慢性関節リウマチにおける抗好中球細胞質抗体の検討

松岡 康夫 (川崎市立川崎病院内科)

鈴木 厚 (川崎市立川崎病院内科)

小井戸則彦 (川崎市立川崎病院内科)

福田 純也 (川崎市立川崎病院病理)

入交 昭一郎 (川崎市立川崎病院内科)

【研究要旨】慢性関節リウマチ (RA) は関節症状のみならず関節外症状、血管炎合併の有無などにより病型に違いがみられる。今回、抗好中球細胞質抗体 (ANCA) のひとつである myeloperoxidase (MPO)-ANCA を測定し、RA の臨床像と MPO-ANCA との関連性を検討した。MPO-ANCA の基準値を 11 EU とすると 184 例中 27 例 14.6% が陽性であった。基準値を 15 EU とすると 184 例中 13 例 7.0% が陽性であった。赤沈、CRP 値と MPO-ANCA 値との間に有意の相関を認めた。臨床症状として蛋白尿、血尿、シェーグレンの有無と MPO-ANCA 値との間に有意の相関を認めた。

【研究目的】関節病変と全身性病変を合わせもつ RA 患者の経過を観察すると、関節病変の程度あるいは関節外病変の有無により各患者の病像に大きな違いがみられる。このような RA の病像の違いが、どのような因子によって規定されているのかまだ明らかではない。いっぽう ANCA は血管炎や腎疾患にみいだされる自己抗体で、血管炎症候群や腎疾患のみならず様々な疾患との関連性がこれまで検討されてきた。RA においても ANCA との関連性を示唆する報告 [1-6] が散見されるがまだ十分な検討には至っていない。我々は RA と ANCA との関連性を知る目的で検討をおこなった。

【研究方法】RA 患者 142 例の血清を用い MPO-ANCA を ELISA 法で測定した。RA 症例は 142 例で男性は 29 例、女性は 113 例である (表 1)。なお経時的に複数回測定した症例が 23 例含まれており測定した検体数は 184 検体である。対象患者の赤沈の平均値は 51.9 ± 34.9 mm/h、CRP は 3.0 ± 3.2 mg/dl であった。MPO-ANCA 値と患者背景との比較では、年齢、罹病期間、ステージ、クラス、リウマトイド因子、抗核抗体、抗 SSA 抗体、赤沈、CRP 値について検討した。MPO-ANCA 値と RA の臨床所見の比較としては、皮下結節、強膜炎、胸膜炎、肺臓炎、末梢神経炎、蛋白尿、血尿、腎不全、シェーグレン、アミロイドの合併の有無について比較検討した。なお蛋白尿、血尿は MPO-ANCA 測定時の所見であり、他の臨床項目は経過中に

認められた所見である。

【結果と考察】MPO-ANCAは基準値を11EUとすると14.6%が陽性であった(表2)。基準値を15EUとすると7.0%が陽性であった。MPO-ANCAと赤沈、CRPとの関連について調べた。表3に示すようにMPO-ANCA 11EU未満では赤沈値48.0 mm/h, CRP2.7 mg/dlであるのに対し11EU以上の陽性群では赤沈値75.8 mm/h, CRP4.7 mg/dlであり両者に有意差を認めた。基準値15EUについても同様であった。RAの患者背景として、年齢、罹病期間、ステージ、クラス、リウマトイド因子、抗核抗体、抗SSA抗体を調べたが有意な相関は認めなかった。次にRAの臨床所見として皮下結節、強膜炎、胸膜炎、肺臓炎、末梢神経炎、蛋白尿、血尿、腎不全、シェーグレン、アミロイドの有無を調べMPO-ANCAとの関連性をカイ二乗検定で検討した。蛋白尿および血尿の有無とMPO-ANCAとは、基準値を15EUで区切った場合に有意差を認めた。基準値11EUでは血尿に有意差を認めたが、蛋白尿は $p < 0.08$ 以下の傾向を示した。シェーグレンの合併の有無では基準値11EU以上で $P < 0.05$ 以下の有意差を認めた。MPO-ANCAを経時的に測定し得た32例について検討した。MPO-ANCAがすべて陰性であった持続陰性群は19例、いずれかが陽性であった間歇陽性群は6例、いずれも陽性であった持続陽性群は7例であった。蛋白尿を認めた頻度は持続陰性群では21.0%、間歇陽性群では33.3%、持続陽性群では42.9%であった。血尿を認めた頻度は持続陰性群では36.8%、間歇陽性群では50.0%、持続陽性群では57.1%であった。

RAにおけるANCAの検討は従来の蛍光抗体法を用いた報告では陽性率は20-50% [1-6]とされている。またANCAの中でもp-ANCAの陽性頻度が高いことが知られている [1, 3-6]。Mustilaら [1]の蛍光抗体法を用いた1997年の報告では、RAの22%がANCA陽性で、陽性例の96%がp-ANCAであったとしている。平成9年度の本研究班における我々の報告ではRAにおけるPR3-ANCA陽性率は0%、MPO-ANCA陽性率は34%であった。このことより陽性率0%のPR3-ANCAについては検討を加えず、RAとMPO-ANCAのみに注目し症例数および検体数を増やし検討した。これまでの報告によるとRAの罹病期間の長い症例 [3, 4]、RFや抗核抗体陽性の重症例 [4]、炎症所見高値例 [1]にANCA陽性例が多いとしている。今回の検討では、赤沈値、CRP値とMPO-ANCAとの間に有意な関連性を認めた。MPO-ANCAは臨床的に血管炎との関連性が強く示唆されている自己抗体であり、赤沈値やCRP値などの炎症所見とMPO-ANCAとの間に有意な関連性を認めたことは興味深い。今回、MPO-ANCA陽性例では蛋白尿や血尿をきたした症例が有意に多いことがわかった。RAの腎症の病態を考察する上で興味深い。MPO-