

接種によって冠状動脈炎を発症するモデルマウスにおいて、血管炎発症と好中球抗体 MPO-ANCA の誘導との関係を調べる。さらに、CADS 誘導の血管炎に高値に認められる MPO-ANCA が対応分子である MPO を生体にて抗原としているか、また血管炎の発症に MPO が関与しているかについて、本モデルマウスに MPO 欠損遺伝子を導入するために、MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS を接種し検討する。

## B. 研究方法

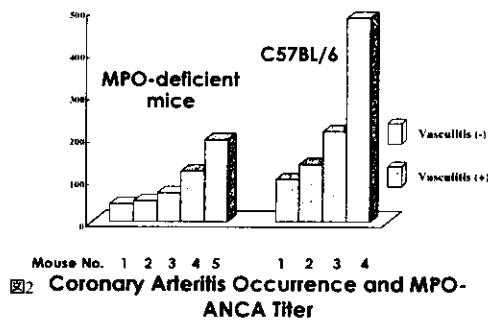
- 1) 血管炎モデルマウスの調整: 本疾患モデルは、川崎病リスクの冠状動脈炎発症モデルとして作られ、罹患児糞便から分離した *C. albicans* 由来物質により誘導した。
- 2) マウスのリコンビナント MPO の調整: マウスのリコンビナント MPO は、ヒトのリコンビナント MPO と同様に作成した。
- 3) マウス血清中の MPO-ANCA 値: ヒトおよびマウス MPO の ELISA により測定した。
- 4) MPO-KO の MPO-ANCA 産生と血管炎発症の検討: CADS 誘導の血管炎率と血清中の MPO-ANCA 値について野生型のそれと比較した。MPO-KO 群、C57BL/6 (対照群) (4 週、雄、各

5) について、CADS を 5 日間腹腔接種し、3 週間のインターバル後再び同様に接種した。3 週後心採血にて屠殺、病理標本を作製し血管炎の評価をした。MPO-ANCA はヒト MPO-III を抗原とする ELISA 法にて測定した。

## C. 研究結果

1) マウス MPO (mMPO) の特異的抗体を作成するため、マウスリコンビナント MPO に対する抗体を作成し、mMPO 特異的抗体を得た (図 1)。また、コンビナント mMPO 分子は作成により mMPO 特異的抗体を作成でき、抗体の標準化が確認できた。

2) CADS 誘導の冠状動脈血管炎に伴い MPO-ANCA 値は、MPO-KO マウスでは、野生型マウスに比べ抑制された。CADS 誘導の血管炎発症率と血清中の MPO-ANCA 値について野生型のそれと比較した結果、血管炎の発症率は、MPO-KO 群では 40% と対照群 100% より激減した。一方、血清 MPO-ANCA 値は MPO-KO 群では、95.8hEU で、対照群の 234.1hEU と比較して有意に抑制されていた (図 2)。



3) MPO-KO マウスでは CADS 誘導の冠状動脈血管炎が激減した。CADS 誘導の冠状動脈血管炎に伴い MPO-ANCA は、MPO-KO マウスでは、野生型マウス比し著しく抑制された。MPO-KO マウスでは CADS 誘導の冠状動脈血管炎が激減した (図2)。

#### D. 考察

リコンビナント MPO 分子は作製できたので、これを用いてポリクローナル抗体を作製する。今後は、Deletion mutants からフラグメントを調整し、エピトープ解析を行う。野生型マウスにおいて、冠状動脈血管炎発症率と MPO-ANCA 値に、正の相関が認められたことから、CADS 抽出物誘導の冠状動脈血管炎の発症に MPO-ANCA 産

生の関与が示唆された。また、MPO-KO マウスにおいて、CADS 抽出物誘導の冠状動脈血管炎の発症が低下し、血清中の MPO-ANCA が低値を示した個体が多かったことから、MPO が抗原になっていることが確認された。しかし、MPO-KO マウスにおいて、CADS 抽出物誘導の血管炎を発症し、MPO-ANCA 値の高い個体が認められたことにより、MPO-ANCA 産生には、MPO 以外の抗原の存在も示唆された。

#### E. 結論

リコンビナント MPO 分子および得意抗体は作製できた。今後は、これによるエピトープ解析を行う。

一方、MPO 欠損マウスは、CADS 誘導の血管炎発症率と血清中の MPO-ANCA 値について野生型のそれと比較した結果、血管炎の発症率は、MPO-KO 群では 40%と対照群 100%より激減し、血清 MPO-ANCA 値は MPO-KO 群では、有意に抑制されていた。この様に、CADS 誘導の冠状動脈血管炎に伴い MPO-ANCA は、MPO-KO マウスでは、野生型マウス比し著しく抑制された。MPO-KO マウスでは CADS 誘導の冠状動脈血管炎が激減した。野生型マウスにおいて、冠状動脈血管炎発症率と MPO-ANCA 値に、正の相関が認められた。また、MPO 欠損マウスにおいて C.

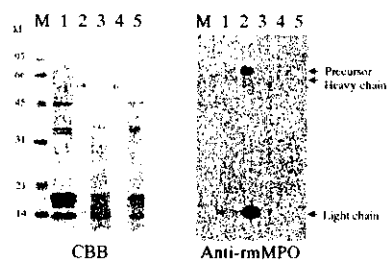


図1 Western Blotting by Anti-rmMPO Antibody  
 4: Marker, 1 Mouse PMN, 2: Purified mouse MPO,  
 3: Human PMN, 4: Purified human MPO, 5: Human lymphocytes

*albicans* 抽出物誘導の冠状動脈血管炎の発症の低下と関連して MPO-ANCA が低値を示した個体が多かった。このことは、MPO が抗原になっていることを示している。しかし、MPO-ANCA 産生には、MPO 以外の抗原の存在も示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujii, A., Tomizawa, K., Arimura, Y., Nagasawa, T., Y-Ohashi, Y., Hiyama, T., Mizuno, S. and K. Suzuki. Epitope analysis of myeloperoxidase-specific anti-neutrophil Cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated glomerulonephritis. Clin. Nephrology 53, 242-252, 2000.
- 2) Y. Kawai, A. Ishida-Okawara, H. Okuyama, F. Kura, K. Suzuki. Modulation of chemotaxis, O<sub>2</sub>-production and myeloperoxidase release from human polymorphonuclear leukocytes by the ornithine-containing lipid and serineglycine-containing lipid of *Flavobacterium*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 28, 205-209, 2000.
- 3) Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda and M. Koyama. "Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. J. Infectious Diseases 182,

1276-1279, 2000.

- 4) K. Suzuki, H. Nunoi, M. Miyazaki, F. Koi Book : The Peroxidase Multigene Family of Enzymes. Springer-Verlag: Berlin; 2000 Chapter 20 in Petrides P.E., Nauseef W.M. (Eds). "Prevalence of Inherited Myeloperoxidase Deficiency in Japan"
- 5) 鈴木和男 特集「血管炎の基礎と臨床」血管炎と自己抗体—抗好中球細胞質抗体を中心に— 最新医学 55; 2636-2646, 2000

### 2. 学会発表

- 1) Kazuo Suzuki, Akiko Ishida-Okawara, Yuki Hashimoto, Toshikazu Shirai, Hiroshi Hashimoto. Risk epitope of MPO of vasculitis in Japanese population. 第9回国際血管炎 ANCA Workshop 4月12日—15日, グロニンゲン・オランダ
- 2) Kei Takahashi, Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Yuki Hashimoto, Shiro Naoe, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Kazuo Suzuki. MPO is not antigen for MPO-ANCA in candida extract (CE)-induced vasculitis: Observation using MPO-KO mice. 第9回国際血管炎 ANCA Workshop 4月12日—15日, グロニンゲン・オランダ
- 3) T. Ihara, E. Muso, S. Sasayama, A. Ishida-Okawara, Y. Hashimoto, K. Suzuki. Studies on Neutrophil Function and Glomerulonephritis. 第9回国際血管炎 ANCA Workshop 4月12日—15日, グロニンゲン・オランダ
- 4) 鈴木和男 シンポジウム「深在性真菌の発症機序とその対策—アスペルギルス症を中心として：真菌感染成立に關与する好中球機能」第74回日本感染症学会、4月20日—21日

- 5) 鈴木和男 シンポジウム「自己免疫抗原：血管炎の病態に関連する MPO-ANCA のリスクエビトープ」第44回日本リウマチ学会、5月13日—15日
- 6) 鈴木和男 「血管炎における MPO-ANCA」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 7) 大川原明子、雑賀 寛、根本久一、鈴木和男「SCG/kj マウスの糸球体腎炎の発症・進行における活性化好中球の役割」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 8) 猪原登志子、小野孝彦、武曾恵理、橋本ゆき、大川原明子、鈴木和男 「糸球体腎炎における好中球機能についての検討」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 9) 大原関利章、大川原明子、高橋 啓、荒谷康昭、橋本ゆき、若山 恵、渋谷和俊、村田久雄、直江史郎、鈴木和男 「カンジダ菌抽出物を用いた川崎病血管炎モデルにおける MPO-ANCA の検討：MPO ノックアウトマウスを用いた解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 10) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男 「ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの真菌および細菌に対する感染防御能の解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 11) 倉 文明、後藤紀久、前川純子、塚野尋子、Dinauer MC、荒谷康昭、小山秀機、鈴木和男「Lgnlr あるいは NADPH oxidase によるマウスの致死性レジオネラ肺炎の防御」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 12) 亀岡洋祐、安谷屋正明、鈴木和男「新規 MPO 完全欠損患者の遺伝子解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 13) 松岡俊行、橋本ゆき、大川原明子、Keiko Ozato、新井孝夫、鈴木和男「ICSBP/IRF-8 ノックアウトマウスにおける好中球および MPO-ANCA 産生に関する解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 14) Kazuo Suzuki Geneva Biology of Ageing Workshop 2000: Phagocytes, Inflammation and Ageing. September 1-2, 2000 in Geneva 加齢生物学ワークショップ ジュネーブ2000：食細胞、炎症および加齢
- 15) Kazuo Suzuki, Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Yuki Hashimoto, Yosuke Kameoka, Takeshi Saito, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Shiro Naoe A Role of myeloperoxidase (MPO) for production of MPO-ANCA in *Candida albicans*-derived substances (CADS)-induced vasculitis in the coronary arteries using MPO-deficient mice and recombinant mouse MPO. The peoxidase superfamily II of animal and human enzymes: Biochemical basis and clinical application. September 3-8, 2000 in Vienna
- 16) Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda, and H. Koyama. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research, Oct. 16-20, Kyoto
- 17) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの生体防御能の低下 第73回日本生化学会大会 10月11—14日、横浜
- 18) 鈴木和男 血管炎における好中球と MPO-ANCA の役割第5回血管炎研究会 10月13—14日、東京

- 19) 大原関利章、大川原明子、高橋 啓、  
荒谷康昭、直江史郎、鈴木和男 カンジダ菌体抽出物誘導の血管炎モデルマウスにおける血管炎と MPO-ANCA の  
相関(2)－MPO ノックアウトマウスを用いた解析－ 5 回血管炎研究会、10  
月 13～14 日、東京
- 20) 荒谷康昭、倉文明、鈴木和男、小山秀  
機 MPO ノックアウトマウスの真  
菌・細菌に対する感染防御能の低下  
第 30 回日本免疫学会、11 月 14 日～1  
6 日、仙台
- 21) 大原関利章、大川原明子、高橋 啓、  
荒谷康昭、直江史郎、鈴木和男 カンジダ菌体抽出物誘導の血管炎モデルマウスにおける血管炎と MPO-ANCA の  
相関(2)－MPO ノックアウトマウスを用いた解析－ 第 30 回日本免疫学会、  
11 月 14 日～16 日、仙台
- 22) 大川原明子、大原関利章、高橋 啓、橋  
本ゆき、荒谷康昭、直江史郎、代田和  
恵、鈴木和男 カンジダ菌体抽出物  
(CADS) 誘導の血管炎モデルマウスに  
おける血管炎と MPO-ANCA の相関 －  
MPO ノックアウトマウスを用いた解析  
－ 第 23 回日本分子生物学会、12 月  
13 日～16 日、神戸
- 23) 亀岡洋祐、Amanda Persad、安谷屋正  
明、鈴木和男 新規 MPO 完全欠損患者  
の遺伝子解析 第 23 回日本分子生  
物学会、12 月 13 日～16 日、神戸

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 20. 全身性エリテマトーデスにおける抗好中球細胞質抗体 (ANCA) の検討

松岡康夫 (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)

鈴木 厚 (川崎市立川崎病院内科)

KEY WORDS=全身性エリテマトーデス, 抗好中球細胞質抗体

〔研究要旨〕 全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)患者の抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)を酵素抗体法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA法)と、間接蛍光抗体法(immunofluorescence, IF法)により測定し、SLEの臨床像とANCAとの関連性について検討した。

SLE患者61例のANCAを測定した。ANCAはmyeloperoxidase (MPO)を抗原としたELISA法と、エタノール固定ヒト好中球スライドを用いたIF法により検出した。SLEの患者背景として検査時年齢、発症時年齢、罹病期間、皮疹、強膜炎、末梢神経炎、中枢神経・精神障害、腎症、他の膠原病関係疾患の合併症などの臨床所見と、抗核抗体、抗DNA抗体、赤沈、蛋白尿、血尿、顆粒円柱などの検査所見を調べ、ANCAとの関係を検討した。

ANCA全体の陽性頻度は12例(19.7%)で、SLEの平均発症時年齢が23.6歳と、陰性例の30.7歳に比べて若年であった。ANCA陽性例は蝶形紅斑、腎症の陽性頻度が有意に高かった。

ELISA法によるMPO-ANCAの陽性頻度は4例(6.6%)であり、IF法によるP(perinuclear)-ANCAの陽性頻度は6例(9.8%)、C(cytoplasmic)-ANCAの陽性頻度は3例(4.9%)であった。IF法によるP-ANCA陽性例は蝶形紅斑の陽性頻度が有意に高く、特に中枢神経・精神障害の陽性頻度は高い相関を示した。

IF法は、ELISA法に比し、SLEの血管炎によると思われる症状を、広くスクリーニングするのに有用と思われた。

Investigation on Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibody in Systemic Lupus Erythematosus

Yasuo Matsuoka (Internal Medicine, Kawasaki Municipal Hospital), Norihiko koido (Internal Medicine, Kawasaki Municipal Hospital), Atsushi Suzuki (Internal Medicine, Kawasaki Municipal Hospital)

We determined anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) in SLE patients with the means of enzyme-linked immunosorbent assay method (ELISA) and immunofluorescence method (IF) to investigate the relation between clinical findings and ANCA in SLE.

ANCA was determined in 61 SLE patients. ANCA was detected by the ELISA method using myeloperoxidase (MPO) as antigens and the IF method using ethanol-fixed human neutrophil slides.

We investigated the relation between ANCA and clinical findings such as a mean age at examination, a mean age at the first onset of SLE, duration of morbidity, butterfly area lesions, scleritis, peripheral neuritis, central nervous system lupus and psychosis, nephropathy, complication of other connective tissue diseases, etc. for SLE patients' backgrounds and laboratory findings such as antinuclear antibody, anti-DNA antibody, erythrocyte sedimentation rate, proteinuria, hematuria and granular epithelium, etc.

Whole ANCA was positive in 61 cases (19.7%) and 23.6 years of mean age at the first onset of SLE that was younger than negative cases. Whole ANCA positive cases were associated with significant frequency of butterfly area lesions and nephropathy.

MPO-ANCA was positive in 4 cases (6.6%) with the ELISA methods and P(perinuclear)-ANCA was positive in 6 cases (9.8%) and C(cytoplasmic)-ANCA was positive in 3 cases (4.9%) with the IF methods. P-ANCA positive cases with IF method were associated with significant frequency of butterfly area lesions, central nervous system lupus and psychosis.

The IF method seemed more useful for broad screening of symptoms possibly due to SLE vasculitis than the ELISA method.

〔研究目的〕我々は当研究班において3年度にわたり、慢性関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)患者における抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)の頻度を、酵素抗体法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA法)ならびに間接蛍光抗体法(immunofluorescence, IF法)により測定し、RAの臨床像とANCAとの関連性について検討してきた。その結果、腎症などの関節外症状とANCAとの関連性があることについて報告した。

そこで今回は、より血管炎との関連性が強く、多彩な症状を呈する全身性の自己免疫性疾患である全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)患者のANCAを測定し、SLEの臨床像とANCAとの関連性について検討した。

〔研究方法〕 対象とした症例は、川崎市立川崎病院に通院しているSLE患者61例、男性3例、女性58例である(表1)。検査時年齢の平均は $44.7 \pm 13.7$ 歳で、SLEの平均発症時年齢は $28.9 \pm 10.2$ 歳、平均罹病期間は $14.7 \pm 8.9$ 年間である。ちなみに昨年度発表のRA患者においては、検査時年齢は $59.0 \pm 12.0$ 歳、RAの発症時年齢は $46.5 \pm 14.2$ 歳、罹病期間は $12.6 \pm 9.4$ 年間であった。

臨床所見については、罹病期間の全経過において認められた症状を取り上げた。蝶形紅斑は61例中27例(44.3%)と多くの症例で認められた。腎症は最も多く61例中34例(55.7%)と半数以上に認められた。他の膠原病関係疾患の合併症は26例(42.6%)に達しており、うちシェーグレン症候群が最も多く61例中13例(21.3%)であった。また明らかなRAの合併も6例(9.8%)認められた。その他には、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性肝炎、虚血性腸炎などの合併症が認められた。

検査所見については、抗核抗体は55例(90.2%)が陽性であった。抗DNA抗体も31例(50.8%)と半数以上で陽性であった。赤沈は一時間値平均で $30.5 \pm 26.6$ mmと亢進し、検査時に蛋白尿を認めたのは19例(31.1%)おり、さらに尿沈渣において顆粒球円柱を認めたものが4例(6.6%)であった。

ANCAの測定方法は、ELISA法はmyeloperoxidase(MPO)を抗原として用いて測定し、10EU以上を陽性とした。IF法はMBL社製キットのヒト好中球エタノール固定プレートを用いてIgG型ANCAの測定を行った。なお、抗核抗体はP-ANCAの染色パターンに類似しているため、ホルマリン固定による確認用スライドでも同様の試験を全例施行した。また、患者血清は20倍希釈血清を用いて測定した。IF法における染色パターンの結果を、図1に示した。上段左のように、エタノール固定プレートで好中球の核の周辺が強く染色されるパターンを示し、ホルマリン固定による確認用スライドでは核周辺の染色が消え、びまん性に細胞質の染色がみられればP-ANCA陽性と判定した。中段のように、エタノール固定、ホルマリン固定ともに好中球の核の周辺が強く染色されるパターンを示すものは抗核抗体と判定した。これらに対し、下段のC-ANCAはエタノール固定において好中球細胞質がびまん性に染色されるパターンを示し、ホルマリン固定でも同様の染色パターンを示した。

SLEの患者背景として検査時年齢、発症時年齢、罹病期間、蝶形紅斑等の皮疹、強膜炎、末梢神経炎、中枢神経・精神障害、腎症、シェーグレンなど他の膠原病関係疾患の合併症などの臨床所見と、抗核抗体、抗DNA抗体、赤沈、蛋白尿、血尿、顆粒円柱などの検査所見の値を調べELISA法およびIF法によるANCAの有無と、SLEの各患者背景との関連性について比較検討した。



[結果] IF法によるANCA陽性頻度の結果は、P-ANCA陽性例は6例(9.8%)、C-ANCA陽性例は3例(4.9%)であった(表2)。ELISA法によるMPO-ANCA陽性頻度の結果は4例(6.6%)であった。P-ANCAとMPO-ANCAともに陽性なのは1例だけであった。

昨年度の報告では、RAのANCA陽性頻度はP-ANCAは122例中21例(17.2%)でC-ANCA陽性例はいなかった。MPO-ANCAは122例中9例(7.4%)であった。ANCAの陽性頻度に関しては、RAとSLEで差は無いものと思われた。またIF法によるP-ANCA陽性例とELISA法によるMPO-ANCA陽性例との間に差が認められたが、その点はRAの場合にも認められたが、今後の検討を要するものと思われた。

SLEの患者背景としての臨床所見と検査所見の値を調べ、ANCAの有無とSLEの各患者背景との関連性について比較検討した(表3)。ANCA陽性例は全体では、61例中12例(19.7%)であった。ANCA陽性例では、SLEの平均発症時年齢が $23.6 \pm 10.7$ 歳と、陰性例の $30.7 \pm 9.5$ 歳に比べて若年であった。さらにANCA陽性例は蝶形紅斑、腎症の陽性頻度に有意な差を認めた。また有意とは言えないがANCA陽性例は、中枢神経・精神障害の陽性頻度でも比較的の高い傾向が見られた。

つぎにANCA陽性例をIF法によるP-ANCA、C-ANCAとELISA法によるMPO-ANCAのそれぞれにわけ、各ANCAとSLEとの関係を比較検討した(表4)。各ANCAとも平均検査時年齢、平均発症時年齢、平均罹病期間に差はなかった。IF法によるP-ANCA陽性例は陰性例に比べ、蝶形紅斑の陽性頻度が有意に高く、特に中枢神経・精神障害の陽性頻度では高い相関を示していた。他にはC-ANCA陽性例、MPO-ANCA陽性例に有意な差はなく、各ANCA間の間にも有意な差は認められなかった。

[考察] ANCAは、C-ANCAがWegener肉芽腫症に、P-ANCAが顕微鏡的多発動脈炎や壊死性半月体形成性腎炎に高率に陽性を示す自己抗体であることが知られている。しかし、ANCAと膠原病各疾患の病態との関連性については、未だに不明な点が多く結論づけられていない。SLEにおいても、SLEが血管炎や腎疾患を合併しやすい疾患であることから、SLEの病態にANCAが関与する可能性が推測されるが、十分な検討はまだなされていない。

ANCAの測定には従来からのIF法とANCAの対応抗原を測定するELISA法の二種類が知られている。SLEにおけるANCAの陽性頻度は3-25%<sup>14)</sup>と報告されている。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<sup>14)</sup>。P-ANCAの対応抗原としてはFalk & Jennetteら<sup>7)</sup>により大部分がMPOであると同定されたが、lactoferrin、elastase、cathepsin、lysozymeなどこれまでに10種類以上あることが知られている。我々の成績でも

ELISA法によるMPO-ANCAの陽性頻度と、IF法によるP-ANCAの陽性頻度とに差が認められた。IF法によるP-ANCA陽性例でMPO-ANCAが陽性であったのは6例中1例(16.7%)でしかなく、我々のRAでの成績でもP-ANCA陽性例でMPO-ANCAが陽性であったのは33.3%であった。P-ANCA陽性例はそのままMPO-ANCA陽性とは必ずしもいえず、P-ANCA陽性でMPO-ANCA陰性例については、MPO以外のP-ANCA対応抗原に対する自己抗体成分を測定している可能性が考えられた。

ANCA陽性例は全体では、SLEの平均発症時年齢が陰性例に比べて若年であった。さらにANCA陽性例と蝶形紅斑、腎症との間に有意な相関を認めた。またANCA陽性例と中枢神経・精神障害の間でも比較的の高い傾向が見られた。ANCAと蝶形紅斑、中枢神経・精神障害との関連性については報告<sup>8)</sup>が少なく、Novoら<sup>9)</sup>は歯周炎との関連性を報告しているがまだ不明な点が多い。腎症、中枢神経・精神障害とも血管炎との関係が強く疑われる臨床症状であり、ANCAとSLEにおける血管炎症候群との関連性を示唆する結果と考えられた。

IF法によるP-ANCA、C-ANCAおよびELISA法によるMPO-ANCAそれぞれに、SLEの患者背景や臨床像の各項目について各ANCAとの関連性を検討した。IF法によるP-ANCA陽性例は陰性例に比べ、蝶形紅斑の陽性頻度が有意に高く、特に中枢神経・精神障害の陽性頻度では高い相関を示していた。今までの我々を含めたRAでの報告とは異なっており、SLEにおける血管炎症候群の病態を考察する上で興味深い結果であった。

今回の検討ではANCAの測定は一時点である。一方、臨床所見はSLEの経過中認められた所見であることから、ANCA測定の時期が問題となる。各臨床所見が出現した活動期と消失した安定期では、その病態に違いがあると推測されるためである。またANCA力価は疾患活動性を反映し変動することより、ANCA陰性であっても関連性は否定できない点が問題として残される。従ってSLEの臨床症状とANCA値との関連性については、IF法においては患者血清の希釈倍率を変えての半定量的測定と、各測定法による経時的測定を加え再検討する必要があると考えられた。

[結論] IF法は、ELISA法に比し、SLEの血管炎によると思われる症状を、広くスクリーニングするのに有用と思われた。

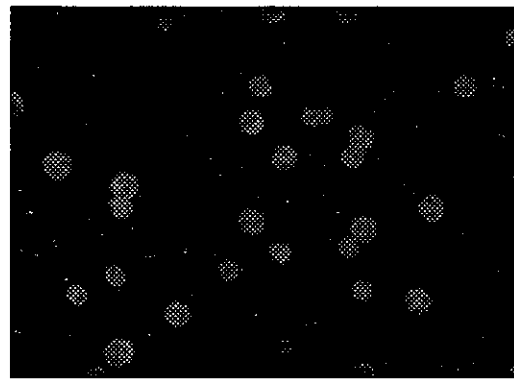
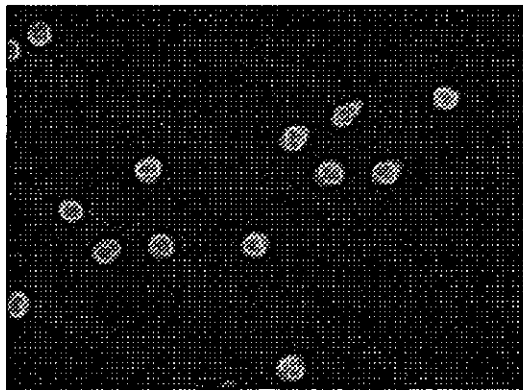
#### [参考文献]

1. Nassberger L, Sjoholm AG, et al. Autoantibodies against neutrophil cytoplasm components in systemic lupus erythematosus and in hydralazine-induced lupus. Clin. Exp. Immunol. 1990;81:380-383.
2. Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-

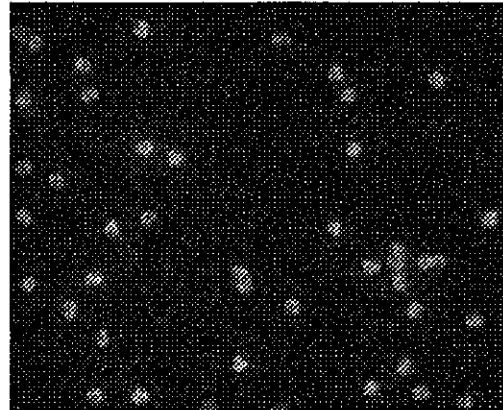
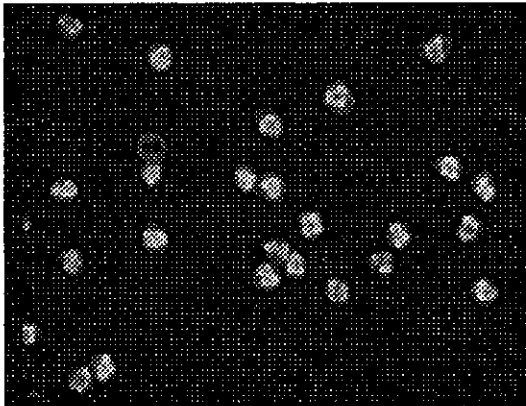
- associated diseases. *Am. J. Kidney Dis.* 1991;18:175-179.
3. Galeazzi M, Morozzi G, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in 566 European patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 1998;16:541-546.
  4. Faure-Fontenla MA, Rodriguez-Suarez RS, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus in childhood. *J. Rheumatol.* 1999;26:2480-2481.
  5. Schnabel A, Hauschild S, Gross WL. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in generalized autoimmune diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1996;109:201-206.
  6. Chikazawa H, Nishiya K, et al. Immunoglobulin isotypes of anti-myeloperoxidase and anti-lactoferrin antibodies in patients with collagen diseases. *J. Clin. Immunol.* 2000;20:279-286.
  7. Falk RJ & Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *New. Eng. J. Med.* 1988;318:1651-1657.
  8. Sanna G, Piga M, et al. Central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2000;9:573-583.
  9. Novo E, Garcia-MacGregor E, et al. Periodontitis and Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J. Periodontol.* 1999;70:185-188.

表1. SLEの患者背景

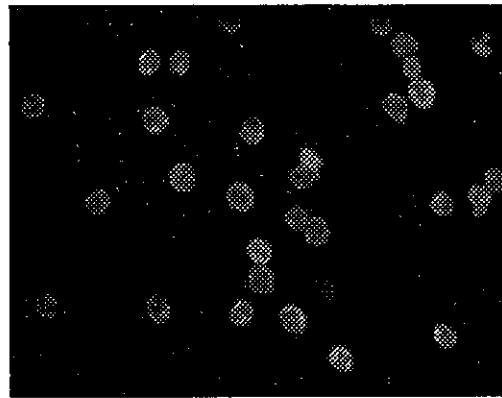
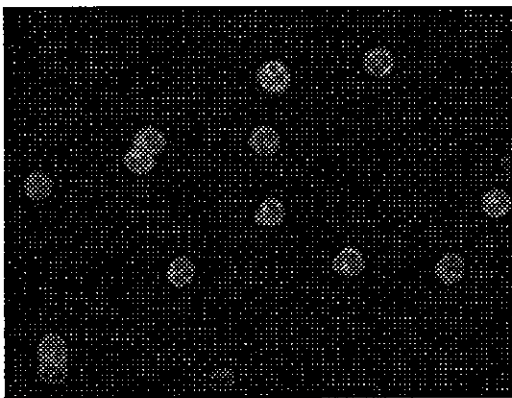
症例数	61例 (男性3, 女性58)	
検査時年齢	44.7±13.7 歳 (19~69)	
発症時年齢	28.9±10.2 歳 (12~48)	
罹病期間	14.7± 8.9 年 ( 1~37)	
臨床所見		
蝶形紅斑	27 例	44.3 %
強膜炎	11 例	18.0 %
末梢神経炎	3 例	5 %
中枢神経・精神障害	9 例	14.8 %
腎症	34 例	55.7 %
合併症	26 例	42.6 %
シェーグレン症候群	13 例	21.3 %
慢性関節リウマチ	6 例	9.8 %
その他	8 例	13.1 %
検査所見		
抗核抗体陽性例	55 例	90.2 %
抗DNA抗体陽性例	31 例	50.8 %
赤沈	30.5±26.6 mm/h	
蛋白尿	19 例	31.1 %
顆粒円柱	4 例	6.6 %
CRNN	0.9±1.0 mg/dl	



P-ANACA



FANA



C-ANACA

エタノール固定法

ホルマリン固定法

### 図1. 間接蛍光抗体法の染色パターン

MBL社製キットのヒト好中球エタノール固定プレートとホルマリン固定による確認用スライドを用いたIgG型ANCAの測定結果。患者血清は20倍希釈。上段はエタノール固定で核周辺が強く染色され、ホルマリン固定でびまん性に細胞質染色がみられるP-ANCA。中段はエタノール固定、ホルマリン固定とも核周辺が強く染色される抗核抗体。下段はエタノール固定、ホルマリン固定とも細胞質がびまん性に染色されるC-ANCA。

表2. ANACAの検査結果

症例	間接蛍光抗体法	ELISA法	症例	間接蛍光抗体法	ELISA法
1 I.Y. 33 ♀	P-ANCA	10 EU	32 K.H. 30 ♀	FANA	(—)
2 O.T 19 ♂	P-ANCA	(—)	33 S.K. 55 ♀	FANA	(—)
3 I.N. 55 ♀	P-ANCA	(—)	34 T.Y. 26 ♀	FANA	(—)
4 U.K. 44 ♀	P-ANCA	(—)	35 K.H. 36 ♀	FANA	(—)
5 Z.N. 47 ♀	P-ANCA	(—)	36 N.M. 32 ♀	FANA	(—)
6 F.Y. 40 ♀	P-ANCA	(—)	37 F.M. 63 ♀	FANA	(—)
7 M.H. 39 ♀	C-ANCA	(—)	38 Y.M. 54 ♀	FANA	(—)
8 Y.M. 53 ♀	C-ANCA	(—)	39 K.E. 38 ♀	FANA	(—)
9 K.J. 37 ♀	C-ANCA	(—)	40 T.S. 27 ♀	FANA	(—)
10 T.Y. 19 ♀	FANA	16 EU	41 E.E. 31 ♀	FANA	(—)
11 S.A. 26 ♀	FANA	12 EU	42 K.K. 39 ♀	FANA	(—)
12 H.Y. 49 ♀	FANA	11 EU	43 I.Y. 45 ♀	FANA	(—)
13 K.M. 58 ♂	FANA	(—)	44 I.K. 19 ♀	FANA	(—)
14 N.E. 47 ♀	FANA	(—)	45 K.M. 58 ♂	FANA	(—)
15 I.E 41 ♀	FANA	(—)	46 M.S. 69 ♀	FANA	(—)
16 O.H. 48 ♀	FANA	(—)	47 O.S. 68 ♀	(—)	(—)
17 K.T. 49 ♀	FANA	(—)	48 S.E. 49 ♀	(—)	(—)
18 T.A. 41 ♀	FANA	(—)	49 Y.M. 36 ♀	(—)	(—)
19 A.M. 29 ♀	FANA	(—)	50 N.T. 67 ♀	(—)	(—)
20 Y.K. 41 ♀	FANA	(—)	51 K.S. 61 ♀	(—)	(—)
21 K.K. 59 ♀	FANA	(—)	52 H.Y. 58 ♀	(—)	(—)
22 S.N. 51 ♀	FANA	(—)	53 M.E. 67 ♀	(—)	(—)
23 T.N. 50 ♀	FANA	(—)	54 Y.T. 53 ♀	(—)	(—)
24 T.M. 25 ♀	FANA	(—)	55 T.T. 59 ♀	(—)	(—)
25 H.H. 36 ♀	FANA	(—)	56 O.M. 58 ♀	(—)	(—)
26 F.H. 41 ♀	FANA	(—)	57 W.K. 29 ♀	(—)	(—)
27 K.N. 57 ♀	FANA	(—)	58 O.T. 36 ♀	(—)	n.d.
28 O.S. 20 ♀	FANA	(—)	59 A.J. 56 ♀	(—)	n.d.
29 O.M. 67 ♀	FANA	(—)	60 A.T. 59 ♀	(—)	(—)
30 Y.K. 52 ♀	FANA	(—)	61 I.R. 38 ♀	(—)	n.d.
31 A.S. 40 ♀	FANA	(—)			

表3. ANCAとSLEとの関係

	ANCA陽性例 (n=12)	ANCA陰性例 (n=49)
検査時年齢	38.4±12.2 歳 (19~55)	46.3±13.7 歳 (19~69)
発症時年齢 *	23.6±10.7 歳 (12~44)	30.7± 9.5 歳 (15~48)
罹病期間	14.8± 7.9 年 ( 2~24)	14.7± 9.3 年 ( 1~37)
臨床所見		
蝶形紅斑 **	9 例	18 例
強膜炎	1 例	11 例
中枢神経・精神障害	4 例	5 例
腎症 *	10 例	24 例
合併症		
シェーグレン症候群	4 例	9 例
慢性関節リウマチ	1 例	5 例
検査所見		
抗核抗体陽性例	12 例	43 例
抗DNA抗体陽性例	9 例	22 例
赤沈	43.8±36.4 mm/h	26.3±21.7 mm/h
蛋白尿	5 例	14 例

\* p=0.03 , \*\* p=0.02

表4. 各ANCAにおけるSLEとの関係

	間接蛍光抗体法		ELISA法
	P-ANCA (n=6 9.8%)	C-ANCA (n=3 4.9%)	MPO-ANCA (n=4 6.6%)
検査時年齢	39.7±12.5 歳	43.0± 8.7 歳	31.8±12.8 歳
発症時年齢	25.0±13.2 歳	23.3± 8.3 歳	20.0± 8.9 歳
罹病期間	14.5± 8.5 年	20.0± 6.1 年	11.8± 6.7 年
臨床所見			
蝶形紅斑	6 例 *	1 例	3 例
強膜炎	0 例	1 例	0 例
中枢神経・精神障害	4 例 **	0 例	1 例
腎症	4 例	3 例	4 例
合併症			
シェーグレン症候群	3 例	0 例	2 例
慢性関節リウマチ	0 例	0 例	1 例
検査所見			
抗核抗体陽性例	6 例	3 例	4 例
抗DNA抗体陽性例	5 例	2 例	3 例
赤沈	49.7±35.5 mm/h	23.0±6.7 mm/h	48.5±42.2 mm/h
蛋白尿	2 例	2 例	1 例

\* p=0.02 , \*\* p<0.01



## 21. 抗好中球細胞質抗体 subsets の EIA 法による基礎的検討

中林公正 (杏林大学第一内科)

有村義宏 (杏林大学第一内科)

大藤弥穂 (杏林大学中央検査室)

前川博行 (杏林大学中央検査室)

長澤俊彦 (杏林大学第一内科)

KEY WORDS = 抗好中球細胞質抗体、抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体、  
BPI-ANCA、抗 GBM 抗体、血管炎

### 【研究主旨】

目的：EIA 法と IF 法を用いて、ANCA の陽性・陰性に関する基礎的検討を行った。

対象と方法：ANCA 関連疾患、膠原病疾患を対象症例とした。EIA 法で測定した ANCA は、MPO-ANCA, PR3-ANCA, BPI-ANCA である。尚、抗 GBM 抗体も同時に測定した。これら総ての症例は、IF 法でも検討した。使用した EIA は、Binding Site 社製である。成績：MPO-ANCA 陽性例は、顕微鏡的 PN、半月体形成性腎炎、SLE で認められた。低値例では、PR3-ANCA, BPI-ANCA が併存していた。PR3-ANCA 陽性例は、MPO-ANCA の低値例との併存例であった。BPI-ANCA は、MPO-ANCA との併存例や間質性肺炎を伴う Sjs 症例で認められた。抗 GBM 抗体は、MPO-ANCA 低値例との併存例が多かった。IF 法では、高力価では型判定が容易であったが、低力価は困難であった。

結語：各々の測定に於ける低力価陽性症例の取り扱いは、今後の検討課題と考えられた。

The Detection Issues of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Subsets by  
Enzyme-linked Assay.

Kimimasa Nakabayashi (First Department of Internal Medicine, Kyorin University School of Medicine)

Yoshihiro Arimura (First Department of Internal Medicine, Kyorin University School of Medicine)

Miho Ohfuji (Department of Central Laboratory, Kyorin University School of Medicine)

Hiroyuki Maekawa (Department of Central Laboratory, Kyorin University School of Medicine)

Toshihiko Nagasawa (First Department of Internal Medicine, Kyorin University School of Medicine)

**【Purpose】** The detection issues of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) subsets were evaluated by enzyme-linked assay (EIA) as well as immunofluorescence (IF) staining.

**【Method】** Sixty-four cases including patients with MPO-ANCA vasculitis, rheumatoid arthritis, non-MPO-ANCA vasculitis, systemic lupus erythematosus, idiopathic interstitial pneumonitis, Sjogren syndrome, and other collagen diseases were studied for the detection of ANCA with the EIA and IF method. EIA were for the detection of MPO-ANCA, PR3-ANCA, BPI-ANCA in addition to antiGBM antibody. IF staining is the confirmation of ANCA detection. EIA and IF were the products of Binding Site LTD.

**【Results】** The high titer positivity of antiMPO antibody was only found in patients with typical MPO-ANCA vasculitis. These cases had antiMPO antibody in high titer and were not associated with other ANCA subsets. In contrast, low titer positivity of antiMPO antibody was found in patients with other diseases and was always accompanied by other ANCA subsets. As for antiPR3 antibody and BPI-ANCA, only low titer positivity of these antibodies were found in this study. These cases were also associated with low titers of other ANCAs. AntiGBM antibody was almost always associated with antiMPO antibody. BPI-ANCA was found in patients with interstitial pneumonitis complicated by recurrent infection. IF study showed that the cases with high antiMPO antibody revealed typical perinuclear pattern but other cases with low antiMPO, antiPR3, or BPI-ANCA antibody disclosed unclear staining pattern not to be clarified.

**【Conclusion】**

ANCA subsets with low titer positivity remained unclear to the pathogenesis of certain specific ANCA-related diseases and are needed to be clarified their significance in future.

【目的】：抗好中球細胞質抗体（ANCA）の subsets について、EIA 法と IF 法を用いて、ANCA の陽性・陰性に関する基礎的検討を行った。

【対象症例と方法】：対象症例は、MPO-ANCA 血管炎症例 20 例、RA/PMR 症例 12 例、non-MPO-ANCA 血管炎 11 例、SLE 8 例、特発性間質性肺臓炎 2 例、Sjogren 症候群 2 例、強皮症 2 例、その他の膠原病疾患 7 例の計 64 例である。これらの症例の血清中の ANCA の測定は、Binding Site 社製の抗 MPO 抗体 EIA キット、抗 PR3 抗体 EIA キット、抗 BPI-ANCA EIA キットによった。又、抗 GBM 抗体 EIA キットも同時に使用して測定した。さらに、ANCA の存在の確認を、Binding Site 社製の蛍光抗体 ANCA 検出用試薬を用いて行った。尚、正常値は A・MPO Ab<9.0U/ml、A・PR3 Ab<3.5U/ml、A・BPI-ANCA<15U/ml、A・GBM Ab<3.0U/ml である。これらの正常値は健常人 100 例を測定し、その平均値+3SD より設定された。

【成績】：測定結果を図 1、表 1,2,3 に示す。

#### 1. EIA 法による成績（図 1）

##### 1) 抗 MPO 抗体（陽性 $\geq$ 9EU/ml）（表 1）

抗 MPO 抗体陽性血清は 32 例に認められた。MPO-ANCA 血管炎症例は治療後の 4 例を除き 16 例が陽性を示した。残りの 16 陽性例は、RA 3 例、SLE 5 例、特発性間質性肺臓炎 2 例、強皮症 2 例、その他の膠原病 4 例であった。この内、抗 MPO 抗体が 40EU/ml 以上を示した 14 例は、抗 MPO 抗体が単独陽性であった。この 14 例は総て MPO-ANCA 血管炎症例であった。これに対し、抗 MPO 抗体が 40 単位以下を示した 18 症例は、いずれも他の抗体が併存して認められた。即ち、抗 PR3 抗体が併存していた症例が 4 例、BPI-ANCA が併存していた症例が 6 例、抗 PR3 抗体と BPI-ANCA が併存していた症例が 1 例、抗 GBM 抗体が併存していた症例が 7 例であった。これらの併存例は、MPO-ANCA 血管炎 2 例と上記の RA 3 例、SLE 5 例、特発性間質性肺臓炎 2 例、強皮症 2 例、その他の膠原病 4 例であった。併存抗体の抗体価も、著明高値例はなく低値陽性例のみであった。

##### 2) 抗 PR3 抗体（陽性 $\geq$ 3.5EU/ml）（表 2）

今回の対象症例の中に Wegener 肉芽腫症が含まれていなかったことから、抗 PR3 抗体が著明に高値を示した症例は存在しなかった。いずれも 15EU/ml 以下の症例であった。陽性症例は 5 例に認められ、その内訳は抗 PR3 抗体単独陽性例が 1 例、BPI-ANCA との併存例が 1 例、抗 GBM 抗体との併存例が 3 例であった。抗 PR3 抗体単独陽性症例は MPO-ANCA 血管炎の治療後の症例であり、BPI-ANCA との併存例は SLE 症例であり、抗 GBM 抗体との併存例は特発性間質性肺臓炎 1 例と RA 1 例、MPO-ANCA 血管炎治療後症例 1 例であった。いずれの症例も、併存抗体価は低値であった。

##### 3) BPI-ANCA 抗体（陽性 $\geq$ 15EU/ml）（表 3）

BPI-ANCA が陽性を示した症例が 9 例存在した。その内訳は、BPI-ANCA 単独陽性例が 3 例、抗 MPO 抗体との併存例が 5 例、抗 MPO 抗体・抗 PR3 抗体との併存例が 1 例であった。単独陽性例は Sjogren 症候群に間質性肺臓炎を合併していた 2 例と RA に間質性肺臓炎を合併していた 1 例である。しかし、その抗体価も 50EU/ml 以下であり、著明高値例ではなかつ

た。抗 MPO 抗体や抗 PR3 抗体と併存していた症例も、その BPI-ANCA の抗体価は低力価陽性のみであった。又、併存抗体の抗 MPO 抗体や抗 PR3 抗体の力価も低値陽性であった。

#### 4) 低力価抗体併存の具体的症例 (表 4)

症例は 64 歳、HCV Ab(+)の男性である。2 年前より間質性肺臓炎の陰影を認めていた。今回尿蛋白増悪のため入院して腎生検を施行し、ANCA や抗 GBM を検索した。腎組織には、leukocytoclastic vasculitis を伴う間質性腎炎像が認められた。血清中には抗 MPO 抗体 12.3EU/ml、抗 PR3 抗体 8.4EU/ml、BPI-ANCA 5.5EU/ml、抗 GBM 抗体 5.0EU/ml が認められた。抗 MPO 抗体が間質性肺臓炎や間質性腎炎の成因に関与していることが考えられたが、抗 PR3 抗体や抗 GBM 抗体の陽性の意義は不明であった。

#### 2. 蛍光抗体法による成績

血清を 20×以上に希釈して検討した。160×以上陽性症例は、perinuclear pattern や cytoplasmic pattern と判定が可能であったが、160×以下の症例では陽性・陰性の判定に困難があった。尚、抗 MPO 抗体は perinuclear pattern と、抗 PR3 抗体は cytoplasmic pattern と、BPI-ANCA の単独陽性例は cytoplasmic pattern として認められた。

【考察】：従来より、ANCA と抗 GBM 抗体の併存例の存在や、ANCA の IF 法による判読の問題点が指摘されている(1,2)。そこで、抗好中球細胞質抗体 (ANCA) subsets を EIA 法と IF 法を用いて、ANCA の陽性・陰性に関する基礎的検討を行った。その結果、抗 MPO 抗体に関しては抗 MPO 抗体が高値陽性に認められた症例と、低値陽性に認められた症例が存在した。抗 MPO 抗体が 40EU/ml 以上を示した高値陽性症例では、抗 MPO 抗体が単独陽性で他の抗体の併存は認められなかった。これに対し、抗 MPO 抗体が 40EU/ml 以下の低値陽性症例では、他の抗体の併存が認められた。その併存抗体は、抗 PR3 抗体、BPI-ANCA、抗 GBM 抗体のいずれかであったが、抗 GBM 抗体か BPI-ANCA のことが多かった。これらの併存抗体の抗体価は低値であった。抗 MPO 抗体単独陽性症例は典型的な MPO-ANCA 血管炎の症例であったが、混在例は他の種々の疾患であった。抗 PR3 抗体に関しては、今回は対象症例に Wegener 肉芽腫症の症例が含まれていなかったことより、著明高値例は存在しなかった。陽性症例は 5 例のみであり、かつその抗体価も低値陽性症例のみであった。1 例は抗 PR3 抗体単独陽性であったが、他の 4 例では BPI-ANCA か抗 GBM 抗体が陽性に検出された。併存抗体の力価は、やはり低力価陽性のみであった。BPI-ANCA に関しては、単独陽性症例は感染症の間質性肺臓炎を伴っていた Sjogren 症候群や RA の症例であったが、その抗体価も著明高値ではなかった。抗 MPO 抗体や抗 PR3 抗体と併存していた症例も、BPI-ANCA の抗体価は低値陽性で、併存抗体も低力価であった。蛍光抗体法 (IF 法) による ANCA の検討では、抗体価が 160×以下の症例では、陽性・陰性及び染色パターンの判定は困難であった。以上から、高力価陽性症例は EIA 法及び IF 法から、確実に ANCA の subsets が同定されたが、低力価陽性症例では他の ANCA の subsets と併存していることが多く、その ANCA の同定には問題があると考えられた。今後の検討課題と考えられた。

【結語】：抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体、BPI-ANCA を EIA 法で測定する時、高力価陽性症例はその ANCA による疾患と考えられていた。しかし、低力価陽性症例は他の ANCA との併