

存例が多く、これらの低力価陽性 ANCA による疾患とは考えにくく、今後の検討課題と考えられた。

文献

1. Short AK, Esnault VLM, Lockwood CM : Antineutrophil cytoplasmic antibodies and antiglomerular basement membrane antibodies: two coexisting distinct autoreactivities detectable in patients with rapidly progressive glomerulonephritis. Am J Kidney Dis 1995; 45:439-445.
2. Savige JA, Paspaliaris B, Silvestrini R, Davies D, Nikolontsopoulos T, Sturgess A, Neil J, Pollock W, Dunster K, Hendel M : A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. J Clin Pathol 1998; 51:568-575.

(表 1)

A・MPO Ab 陽性 32 症例の内訳

1. A・MPO Ab 単独 (抗体価>40EU) 14 例	
2. A・MPO Ab と他抗体の併存例 (抗体価<40EU) 18 例	
A・MPO Ab , A・PR ₃ Ab 併存	4 例
A・MPO Ab , BPI・ANCA 併存	6 例
A・MPO Ab , A・PR ₃ Ab , BPI・ANCA 併存	1 例
A・MPO Ab , A・GBM Ab 併存	7 例

(表 2)

A・PR₃ Ab 陽性 5 症例の内訳

A・PR ₃ Ab 単独	1 例
A・PR ₃ Ab , A・MPO Ab , BPI・ANCA 併存	1 例
A・PR ₃ Ab , A・MPO Ab , A・GBM Ab 併存	3 例

(表 3)

BPI・ANCA 陽性 9 症例の内訳

BPI・ANCA 単独	4 例
BPI・ANCA , A・MPO Ab 併存	4 例
BPI・ANCA , A・MPO Ab , A・PR ₃ Ab 併存	1 例

(表 4)

A.S. 63 歳、男

間質性腎炎、間質性肺臓炎、関節痛、HCV Ab (+)

IF 法 : P-ANCA 160x

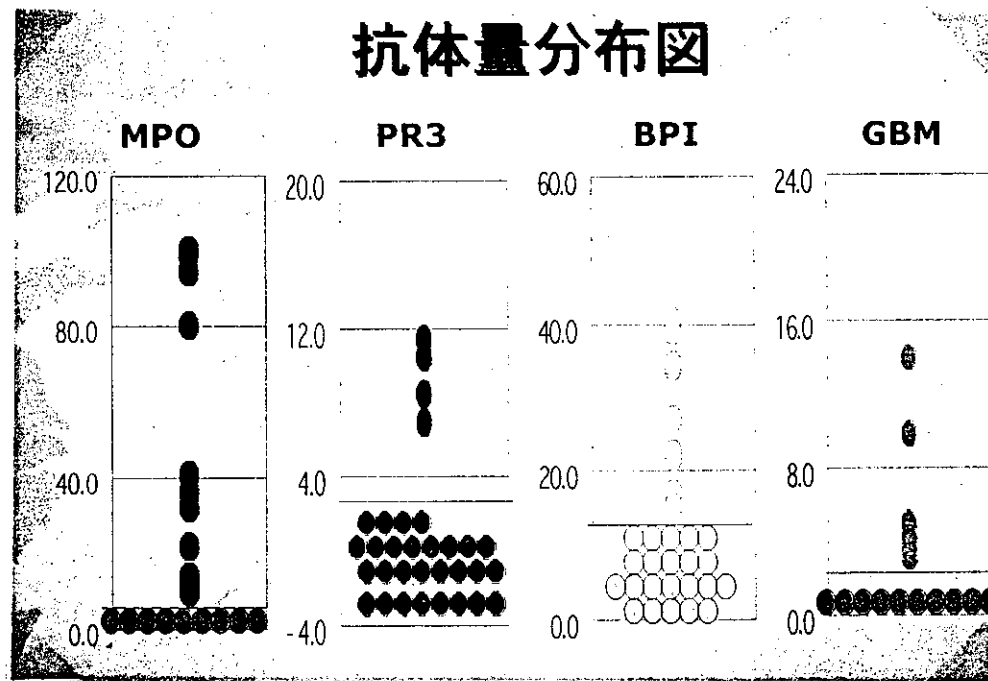
EIA 法 : A・MPO Ab 12.3EU (<9.0)

A・PR₃ Ab 8.4EU (<3.5)

BPI・ANCA 5.5EU (<15.0)

A・GBM Ab 5.0EU (<3.0)

图 1



22. プロテナーゼ3/好中球エラスターゼキメラ蛋白を用いたウエゲナー肉芽腫症患者抗プロテナーゼ3自己抗体の解析

鈴木登 (聖マリアンナ医科大学免疫学)
武半優子 (聖マリアンナ医科大学免疫学)
太田伸男 (山形大学耳鼻科学)
青柳優 (山形大学耳鼻科学)
坂根剛 (聖マリアンナ医科大学免疫学)

EKY WORDS=Wegener肉芽腫, c-ANCA, プロテナーゼ3, 好中球エラスターゼ, キメラ蛋白

[目的]Wegener肉芽腫患者c-ANCA血清のプロテナーゼ3(PR3)の認識エピトープを同定する目的で, PR3と好中球エラスターゼ(HLE)とのキメラ蛋白を作成しPR3自己抗体のエピトープ決定を試みた。

[方法]真核細胞発現ベクターを用いPR3分子とHLEのキメラ蛋白をCOS細胞に発現させた。患者血清との反応性は免疫細胞染色で行った。

[結果と結論]PR3分子とHLE分子はその構造が類似しており, これらのキメラ蛋白も自己抗体に認識されうる高次構造をとる。発現ベクターにPR3cDNAとHLEcDNAを様々な組み合わせで8種類のキメラ蛋白発現ベクターを作成した。患者c-ANCAの反応するキメラ蛋白のパターンは大きくは2種類に分類された。特定のエピトープを認識する一部の患者のc-ANCAはPR3の酵素活性に影響し、患者の臨床症状とエピトープの関連が示唆された。

Reactivities with recombinant human proteinase (PR)3/human leukocyte elastase (HLE) chimeric proteins of anti-PR3 autoantibodies in patients with Wegener's granulomatosis

Noboru Suzuki (Departments of Immunology and Medicine, St.Marianna University School of Medicine), Yuko Takeba (Departments of Immunology and Medicine, St.Marianna University School of Medicine), Nobuo Ohta (Department of Otolaryngopharyngology, Yamagata University School of Medicine), Masaru Aoyagi (Department of Otolaryngopharyngology, Yamagata University School of Medicine), Tsuyoshi Sakane (Departments of Immunology and Medicine, St.Marianna University School of Medicine).

[Purpose] To characterize c-ANCA autoantibodies in patients with Wegener's granulomatosis.

[Methods] Parts of human PR3 cDNA were combined with the complementing parts of HLE c-DNA to construct various PR3/HLE chimeric

protein expression vectors. COS cells were transfected with one of the vectors to express the chimeric proteins, each of which were expected to uniquely express restricted sets of conformational epitopes of PR3. [Results and Discussion] We tested totally 8 c-ANCA positive sera for this study. We found that c-ANCA recognizes conformational epitopes of PR3, and the deletion mutant PR3 was not suitable for the characterization of recognizing epitopes of c-ANCA. We thus constructed PR3/HLE chimeric protein expression vectors, because PR3 and HLE share similar tertiary structures, and the chimeric molecules are expected to express original or almost original conformation of the molecule. We found that reaction pattern of the c-ANCA to the panel of chimeric PR3/HLE can be categorized into two patterns. There seemed some variation of c-ANCA recognizing epitopes among patients with distinct clinical symptoms of Wegener granulomatosis.

[はじめに]

Wegener肉芽腫をはじめとする血管炎症候群の一部では抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody; ANCA)が検出され、その病態形成に関わると考えられている(1-4)。Wegener肉芽腫ではc-ANCAが認められその対応抗原としてプロテナーゼ(PR)3が知られている。欧米からの報告ではc-ANCAに多様性があることや認識エピトープが報告されているが(1,2)、本邦Wegener肉芽腫患者におけるc-ANCAについての報告はない。我々の検討からc-ANCAにはPR3の酵素活性に抑制作用を示すものと示さないものがあり抗PR3自己抗体に多様性が認められること、ウエスタン法では抗PR3自己抗体は全く反応しないことから、抗PR3自己抗体がPR3の高次構造を認識することを報告した。

今回、抗PR3自己抗体が認識する高次構造の存在部位を明らかにする目的で(1,2)、PR3と好中球エラスターゼ(human leukocyte elastase: HLE)とのキメラ蛋白を発現させ、c-ANCAとの反応性を検討した。

[方法]

真核細胞発現用ベクター

ヒトPR3 cDNAとHLE cDNAとを用いて図1に示すようなchimeric cDNAを作成した。真核細胞発現ベクターpME18S (東京医科歯科大学 丸山博士より供与)にPR3 cDNA、HLE cDNAあるいはchimeric cDNAを組み込み、精製しそのシーケンスを確認した。

トランスフェクションと免疫染色

サル腎細胞由来COS細胞に電気穿孔法を用いて遺伝子導入し、ガラスプレート(チャンバースライド; Falcon社)上で2日間培養した。患者血清あるいは正常者血清を用いてDAKO社LSABキットを用いて免疫組織染色を行った。対比染色にはヘマトキシリン法を用いた。

PR3酵素活性の測定

peptidyl-MCA基質に患者血清1 μ l存在下で精製PR-3を加え37 $^{\circ}$ C 12~24時間反応させ、

上清中に放出されたAMC濃度をその蛍光強度を測定することで評価した。

[結果と考察]

一群のPR3とヒト好中球エラスターゼとのキメラ蛋白を作成し、それらとの反応性からc-ANCAの認識するPR3のエピトープの同定を行った。その結果、反応のパターンは2タイプに大きく分類された(図2,図3)。パターン(I)は最も多くの患者c-ANCA血清が示したパターンで、c-ANCAの認識エピトープはPR-3全体にスプレッドしていた。パターン(II)では、c-ANCAの認識エピトープはPR-3の前半部分に収束していた。

同時にpeptidyl-MCA基質を用いて患者c-ANCA抗体のPR3酵素活性に対する影響を観察した。パターンAの患者血清(c-ANCA抗体)存在下の精製PR3の酵素活性は、影響を受けないか、あるいは酵素活性は抑制されていた。パターンBのc-ANCA抗体では、PR-3の酵素活性は影響を受けないか、あるいは増強する症例が含まれていた。

Wegener肉芽腫症患者で経時的な反応パターンの検討を行った(図3)。検討した症例(III)では発症時のエピトープはPR-3全体にスプレッドしており、このときにはPR-3酵素活性は強く抑制された。治療後も反応パターンはほとんど同じで、かつ酵素活性は抑制されたままであった。この成績から、PR-3に対する反応性は単に力価の差異を見ているのではなく患者c-ANCAの本来の特性を反映すると考えた。

以上の成績から、c-ANCA或いは抗PR3抗体の反応エピトープは複数存在し、患者により差異を認めることが確認された。さらにc-ANCAの認識エピトープはPR-3全体にスプレッドするものとPR-3の前半部分に収束しているものの2種類に分類された。c-ANCAはPR-3の酵素活性を抑制する症例があり、エピトープはPR-3全体におよび、これらは上気道症状の患者に多い。c-ANCAはPR-3の酵素活性を増強する症例があり、エピトープはPR-3の前半部分に収束し、これらは腎・血管炎症状の患者に多い。

今回の検討は、少数例での検討であり、今後多数例での検討が必要と考えられる。

[文献]

1. Griffith ME, Coulthart A, Pemberton S, George AJ, Pusey CD. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) from patients with systemic vasculitis recognize restricted epitopes of proteinase 3 involving the catalytic site. Clin Exp Immunol. 2000;123:170-177.
2. Van Der Geld YM, Simpelaar A, Van Der Zee R, Tervaert JW, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG. Antineutrophil cytoplasmic antibodies to proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: epitope analysis using synthetic peptides. Kidney Int. 2001;59:147-59.
3. Specks U. What you should know about PR3-ANCA: Conformational requirements of proteinase 3 (PR3) for enzymatic activity and recognition by PR3-ANCA. Arthritis Res. 2000;2:263-267.
4. van der Geld YM, Oost-Kort W, Limburg PC, Specks U, Kallenberg CG. Recombinant proteinase 3 produced in different expression systems: recognition by anti-PR3 antibodies. J Immunol Methods. 2000;244:117-31.

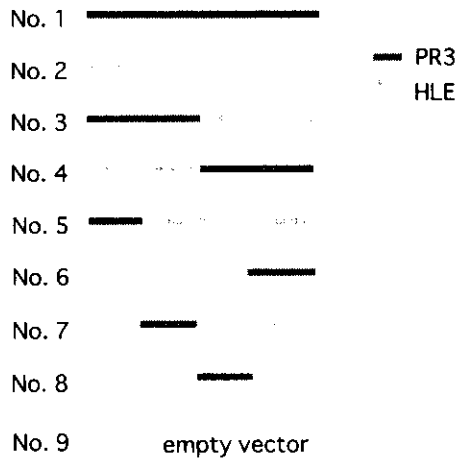


図1. 作成したプロテナーゼ(PR3)/好中球エラス

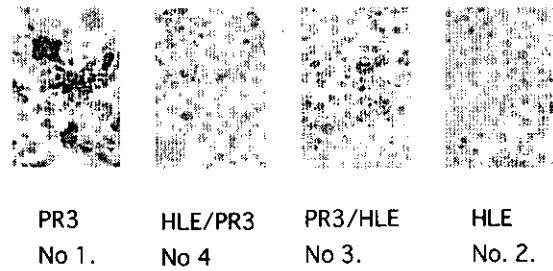
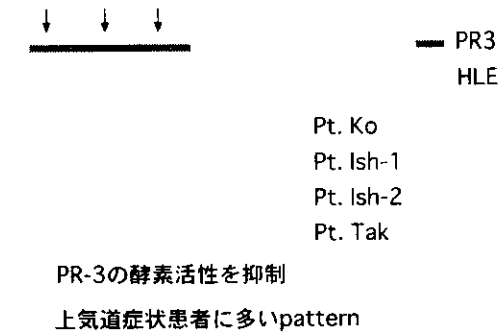
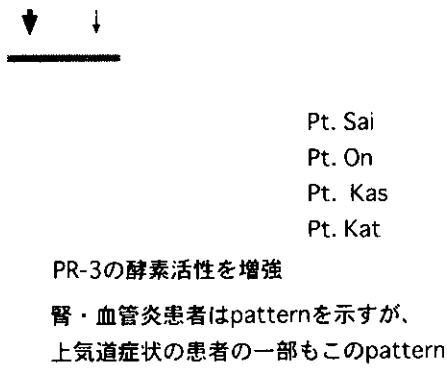


図2. 作成したキメラ蛋白に対するc-ANCA陽性血清の反応性 (代表的な一例を示す)

Reaction pattern of c-ANCA to the PR-3 (I)



Reaction pattern of c-ANCA to the PR-3 (II)



Reaction pattern of c-ANCA to the PR-3 (III)

No.	PR3 HLE	Pt. Ishi	
		At onset	After successful treatment
c-ANCA (IIF) x 8			
No. 1	PR3	+	+
No. 2	HLE	-	-
No. 3	PR3/HLE	+	+
No. 4	HLE/PR3	±	+
No. 5	PR3	+	±
No. 6	HLE	-	-
No. 7	PR3	+	+
No. 8	HLE	±	-
No. 9	empty vector		
Effects on PR-3 enzymatic activity		0 %	30 %

図3. キメラ蛋白に対する反応パターン

23. ANCA 測定法に関する小委員会報告

市販 ANCA 測定試薬の精度に関する検討

- 小委員長 有村義宏 (杏林大学医学部第一内科)
委員 尾崎承一 (京都大学医学研究科臨床生体統御医学臨床免疫学)
委員 吉田雅治 (東京医大八王子医療センター腎臓科)
委員 中林公正 (杏林大学医学部第一内科))

KEY WORDS : MPO-ANCA、PR3-ANCA、ELISA kit

〔研究要旨〕

抗好中球細胞質抗体(ANCA)は、顕微鏡的多発血管炎などの壊死性血管炎の診断や疾患活動性の指標として実地臨床に用いられている。しかし、測定試薬により単位や基準値が異なるため、測定値の評価には適切な対応が求められる。そこで、本邦での市販 ANCA 測定試薬 7 種類 (MPO-ANCA 試薬 3 種類、PR3-ANCA 試薬 4 種類) につき精度、臨床的有用性について検討した。その結果：1) MPO-ANCA 試薬、PR3-ANCA 試薬の各試薬ともに、同時再現性、希釈試験、日差再現性の結果はほぼ良好であった。2) 定性完全一致率は、MPO-ANCA については、各 88% から 90% で、陽性率は 50% から 62% であった。また、PR3-ANCA の定性完全一致率は、87% から 95%、陽性率は 5.3% から 15.8% であった。定性完全一致率、陽性率は、血管炎の活動期にともに 95-100%、非活動時期は一致率 72%-88%、陽性率 39-43% であった。3) MPO-ANCA 値は、各試薬ともに疾患活動性に相関し変動した。

市販 ANCA 試薬、特に MPO-ANCA 試薬は、さらなる精度の改良が必要であるが、いずれの 7 試薬も ANCA 関連血管炎の診断や疾患の活動性の指標に有用と思われた。

ACCURACY OF COMMERCIAL ANCA-ELISA

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

Ozaki S (Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine)

Yoshida M (Department of Nephrology, Hachioji Medical Centet of Tokyo Medical University)

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

Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) is increasingly used as serologic markers for Wegener's granulomatosis and for rapidly progressive glomerulonephritis due to small vessel vasculitis. Many Japanese laboratories use commercial enzyme immunosorbent assay (ELISA) kits to detect ANCA. The accuracy and clinical usefulness of commercial ANCA-ELISA kits (3 MPO-ANCA kits, 4 PR3-ANCA kits) authorized in Japan were examined in 4 laboratories. Eighty two sera samples of 49 patients with ANCA associated vasculitis were examined

The intra-assay and inter-assay CV obtained by the 3 MPO-ANCA ELISA kits were 3.8 to 13.8% and 1.5 to 13.6%, respectively. The intra-assay and inter-assay CV obtained by the 4 PR3-ANCA ELISA kits were 3.2 to 10.7% and 2.7 to 10.9%, respectively.

Correlation of MPO-ANCA titer, excepting that which is out of range, was shown among these ELISAs. MPO-ANCA positivity ranged from 50% to 62%. An absolute concordance among the 3 MPO-ELISA kits was noted in 88 to 90%. This ratio was 95 to 100% in the active stage, and 72 to 88% in the inactive stage of vasculitis. MPO-ANCA titer in each ELISA changed in parallel with disease activity. PR3-ANCA positivity ranged from 5.3 to 15.8%. An absolute concordance among the 4 PR3-ANCA ELISA kits was noted in 87 to 95%.

Although more improved accuracy of commercial ANCA ELISA, especially for MPO-ANCA, is needed, 7 commercial ANCA-ELISA kits authorized in Japan were acceptable equipments used to detect ANCA associated vasculitis and for disease activity monitoring.

[研究目的]

血管炎に関連の深い抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody: ANCA) には、好中球細胞質アズール顆粒中にある proteinase 3 (PR3) に対する抗体 (PR3-ANCA) と myeloperoxidase (MPO) に対する抗体 (MPO-ANCA) がある。これらの ANCA 検査は、他に特異的な血清学的指標がなく、重篤な病状を呈することが多い壊死性血管炎の診断に重要な検査項目である^{1) 2) 3)}。PR3-ANCA は、1993 年に Wegener 肉芽腫症の診断・活動性の血清学的指標として、MPO-ANCA は 1998 年、ANCA 関連血管炎で高頻度に見られる急速進行性腎炎の血清学的指標として保険適用検査となった。以来、本邦での ANCA 測定件数は年々増加している。

一方、本邦では 1998 年から 1999 年にかけて、7 種類の酵素抗体法 (enzyme immunosorbent assay: ELISA) による ANCA 測定の市販試薬が、相次いで認可された。これらの試薬は、試薬ごとに単位や基準値が異なっている。このため、臨床現場では、測定値の評価に関し適切な判断と対応が求められる。そこで、2000 年 4 月の時点で、本邦で市販されている ELISA による ANCA 測定試薬について、

各試薬の精度、測定値の相関、互換性、臨床的有用性などにつき検討を行った。

[研究方法]

対象：厚生科学特定疾患対策研究「難治性血管炎に関する調査研究班」の依頼により、全国各施設より集積された ANCA 関連血管炎 49 症例、血清 82 検体を対象とした。対象症例の診断名の内訳は、顕微鏡的多発血管炎 22 例、Churg-Strauss 症候群 4 例、Wegener 肉芽腫症 3 例、ANCA 関連血管炎 14 例、PTU 関連血管炎 2 例、その他 4 例。なお、健康成人 5 例を対照として用いた。

方法：市販 MPO-ANCA 試薬 3 種類 (A、B、C)、市販 PR3-ANCA 試薬 4 種類 (D、E、F、G) を用い、同一検体を同時期に測定し以下の検討を行った。測定は、杏林大学第一内科、エスアールエル、住友バイオサイエンス、ピーエムエルの 4 施設にて行った。なお、PR3-ANCA 試薬の基礎的検討は、このうちの 3 施設で施行した。

各試薬製造元が規定した ANCA 陽性値および測定範囲は、それぞれ試薬 A が 20 EU 以上、10 ~1000 EU、試薬 B が 9 U/ml 以上、3.1~ 100 U/ml、試薬 C が 6 U/ml 以上、0.23~100 U/ml、試薬 D が 10 EU 以上、10~300 EU、試薬 E が 3.5 U/ml 以上、3.1~100 U/ml、試薬 F が 2 U/ml 以上、1.04~100 U/ml、試薬 G が 10U/ml 以上、0~160 U/ml である。ANCA 陰性試料は、各試薬に添付されている正常コントロール標準品を用いた。

- 1) 標準曲線の作成：各試薬において、ANCA 力価をそれぞれ設定した試薬添付の標準品を用い 2 重測定し、標準曲線を作成した。
- 2) 同時再現性：抗体値の異なる ANCA 陽性 3 検体 (PR3-ANCA は 2 検体) を用い、同時に 10 回(10 ウエル) 測定し検討した。尚、検体希釈は一度に 10 ウエル分以上量を希釈し、同一希釈検体を 10 回測定した。
- 3) 希釈直線性：ANCA 陽性 2 検体を用い、2 倍連続希釈を行い測定した。
- 4) 日差再現性：日内再現性に用いた検体を使用。日内再現性の 1 番の測定値を 1 回とし、計 5 回、測定日を変え 2 週間以内に測定した。
- 5) 試薬間における測定値の相関性、測定値の互換性：各試薬で得られた標準曲線を用い、患者血清の ANCA 値を測定した。
- 6) 測定値と疾患活動性、臨床経過との関連性を MPO-ANCA 測定例について検討した。

なお、ANCA 関連血管炎の疾患活動期は、血管炎によると考えられる臨床症状があり、CRP が陽性の時期とした。

統計学的検討は、 κ^2 検定、Student's T test、Welch's test、Pearson's correlation coefficient を用いた。

[結果]

A) MPO-ANCA 測定試薬

1) 同時再現性 (表 1) : 3 試薬の変動係数(coefficient of variation : CV)は 3.8-13.8% であった。なお、試薬 B, C では測定範囲の上限が 100U/ml であったため、希釈し推測値を検討した。参考値であるが、希釈した結果は B, C の試薬ともに変動係数は 10%以下であった。なお、試薬 A による測定値は、施設により若干の相違を認めた。

2) 日差再現性 (表 2) : 施設 I では、各試薬ともに他施設での測定に比べ、CV がやや高かった。他の施設での測定では、各試薬共に CV は 10%以下であった。尚、施設 III で試薬 A を用いて測定した血清 No.3 の CV が高かったが、他の施設における同血清の CV は 7.4-10.1%であった。また、試薬 B、試薬 C を用いた血清 No.3 の測定値は、試薬の測定範囲を越えていた。参考値であるが、血清 No.3 を希釈し測定した結果では、試薬 B、試薬 C ともに CV は 10%以下であった。なお、試薬 A では高値例 (血清 NO.3)を測定できるものの、施設間での測定値に差を認めた。

3) 希釈試験 : 図 1 に示すように各試薬ともに、ほぼ 0 点に収束する直線が得られた。使用した検体が ANCA 高力価であり、試薬 B、試薬 C では 8 倍希釈以下の希釈では測定値が 100 U/ml 以上と測定範囲を越える値であった。

4) 試薬間における MPO-ANCA 測定値の相関性、測定値の互換性 : 試薬により測定範囲が異なり、試薬 B、試薬 C で測定範囲以上の症例を認めた。このため、試薬 A で 500EU 以上の検体および試薬 B、試薬 C で測定範囲以上 (100 U/ml 以上) の検体を除いて相関性を検討した。この範囲においては、各試薬間で図 2 に示すような相関を認めた (試薬 A と試薬 B の間 : $R^2 = 0.735$, $y = 0.239x + 4.61$, 試薬 A と試薬 C の間 : $R^2 = 0.807$, $y = 0.132x + 2.15$, 試薬 B と試薬 C の間 : $R^2 = 0.640$, $y = 0.422x + 2.324$)。しかし、この範囲においても、各試薬の間で臨床的に信頼性のある測定値の互換式は設定し得なかった。

5) 定性完全一致率 : 表 3 に各施設ですべての試薬の定性が一致した検体の割合を示した。88-90%の検体ですべての試薬の定性結果が一致していた。

6) 試薬の相違と MPO-ANCA 陽性率 (表 4) : ANCA 陽性率は、50-62%であった。いずれの施設においても、試薬により陽性率に有意差は認められなかった。なお、健康成人 5 例の MPO-ANCA は、いずれの試薬ともにすべての施設で陰性であった。

7) 定性不一致例と MPO-ANCA 値 (表 5) : 試薬により定性結果が一致しなかった検体について検討したところ、定性不一致パターンは、4 つにわけられた。このうち、不一致例は、試薬 A、C で陽性、試薬 B で陰性のパターンが 5 検体と最も多かった (5/9: 56%)。不一致例のうち、MPO-ANCA 陽性であった検体の ANCA 値は、いずれも低値陽性であった (平均 ANCA 値 ; 試薬 A : 46 EU, 試薬 B: 13 U/ml, 試薬 C: 7.7 U/ml)。

8) 疾患活動性と MPO-ANCA 定性の完全一致率 (表 6) : 疾患活動性を判定できた症例で、活動期と非活動期の全試薬の定性完全一致率を検討したところ、3

施設で活動期に 95-100% と高く、非活動期には 72-88%と活動時期に比べ低い傾向にあった (P<0.05)。

なお、MPO-ANCA 陽性率は疾患活動期には、95-100%、非活動期には 39-44% で、試薬間に有意な差は認めなかった。

9) 疾患活動性と MPO-ANCA 値 (表 7)：すべての施設において、いずれの試薬も ANCA 値は、疾患活動時期には高く、非活動時期には有意に低下していた。

10) 疾患活動性の推移と MPO-ANCA 値：図 3 に疾患活動性の推移を追えた症例における ANCA 値の変動を示した。ANCA 値は異なるものの、各試薬で ANCA 値は疾患活動性に伴い変動しており、変動のパターンもほぼ共通していた。

B) PR3-ANCA 測定試薬

1) 同時再現性：表 8 に示すように、CV は 3.2-10.7% の範囲で、各試薬ともに良好な再現性を認めた。なお、試薬 F では、いずれの施設においても血清 No.1 の測定値が 2 U/ml 以下 と陰性であった。

2) 日差再現性：表 9 に示すように、いずれの試薬でも CV10% 以下とほぼ良好な値であった。

3) 希釈試験：図 4 に示すように、D、E、G の試薬で、いずれもほぼ 0 点に収束する直線が得られた。試薬 F においても測定値は低いものの、ほぼ 0 点に収束する直線が得られた (図 4)。

4) 試薬間における測定値の相関性：PR3-ANCA では陽性例が少なく、試薬間での測定値の相関性の検討は施行し得なかった。

5) 定性完全一致率 (表 3)：各試薬ともに 87-95% と良好な一致率を認めた。

6) 試薬の相違と PR3-ANCA 陽性率 (表 10)：PR3-ANCA 陽性例は 3-6 例と少数であった。試薬 E で他の試薬に比べ、陽性例が多かったが、有意な差は認められなかった。これらの症例の中で、Wegener 肉芽腫症と診断されていた症例は 1 例のみであった。なお、健康成人 5 例の PR3-ANCA は、いずれの試薬ともにすべての施設で陰性であった。

7) 定性不一致例と PR3-ANCA 値 (表 11)：1 例 (症例 1) を除き不一致例における PR3-ANCA 陽性例は、ANCA 値が低値の陽性であった。PR3-ANCA は、試薬 D では、4 例中 1 例が陽性、試薬 E ではすべて陽性、試薬 F、試薬 G では、4 例中 2 例が陽性であった。また、4 例中 3 例で MPO-ANCA が陽性であった。これら 4 例のうち、Wegener 肉芽腫症と診断されていた症例は、症例 3 のみであり、間接蛍光抗体法で C-ANCA が陽性であった。

[考察]

ANCA は、Wegener 肉芽腫症や急速進行性腎炎の診断、疾患活動性の判定に有用な、新しい検査項目である^{1) 2) 3)}。ANCA 測定に関しては、ヨーロッパ^{4) 5) 6)}を中心に標準化が試みられているが標準血清、測定法の標準化など

多くの課題があり実現困難な状況である^{7) 8)}。現状では、より精度が高く臨床的に有用な市販試薬の開発が進められている。多くの国ではこれらの市販試薬を用い ANCA を測定している^{9) 10)}。本邦では、現在7種類の ANCA 測定試薬が認可されているが、これらの試薬は、試薬ごとに単位や基準値が異なるため、測定値の評価に関し適切な判断と対応が必要である。

そこで、今回本邦で認可されている ELISA による ANCA 試薬7種類 (MPO-ANCA 3種類、PR3-ANCA 4種類) について検討を行った。

その結果、MPO-ANCA 試薬、PR3-ANCA 試薬の各試薬ともに、同時再現性、希釈試験、日差再現性の結果はほぼ良好であった。1999年に作成された ANCA 測定の国際的なガイドライン⁷⁾では、同時再現性、日差再現性の CV が20%以下であることとしている。今回検討した試薬は、いずれもこの基準を満たしていた。しかし、MPO-ANCA 試薬は、PR3-ANCA 試薬に比べやや CV が高く、同時再現性、日差再現性に一層の改善が望まれる。また、試薬により MPO-ANCA が著明な高値の場合には、測定範囲を越えていた。一方、他の試薬で測定範囲以上の検体を測定できる試薬の場合でも、抗体高値では施設間の測定値に相違を認めた。今後、ANCA 値が著明な高値の検体の精度改善につき検討が必要であろう。

すべての試薬で ANCA 定性の結果が一致した定性完全一致率は、MPO-ANCA については、各 88%から 90%で、陽性率は 50%から 62%であった。また、PR3-ANCA においても定性完全一致率は、87%から 95%、陽性率は 5.3%から 15.8%であった。1997年、Wang ら⁹⁾は、当時市販されていた ANCA 測定試薬 (MPO-ANCA 測定試薬 8種類、PR3-ANCA 測定試薬 7種類) の比較検討を行い、MPO-ANCA 試薬の完全一致率はわずか 30%、陽性率 25%から 75%、PR3-ANCA 試薬の完全一致率は 56%、陽性率は 44%から 84%であり、試薬により差を認めたと報告している。これに比べ、今回検討した MPO-ANCA、PR3-ANCA 試薬では、試薬の種類は少ないものの完全一致率、陽性率の試薬間差は少なかった。一方、定性の不一致例は、抗体値が比較的低値の陽性例に多く認められた。

疾患活動期と非活動時期の MPO-ANCA 定性完全一致率、陽性率をみたところ、活動時期は一致率、陽性率ともに 95-100%、非活動時期は一致率 72%-88%、陽性率 39-43%であった。これらのことより、いずれの MPO-ANCA 試薬を用いても疾患活動性の高い時期における ANCA 定性は信頼性が高いと思われた。一方、非活動時期で抗体値が低下している場合には、試薬により定性判定に若干の差が認められた。

MPO-ANCA 値と疾患活動性の検討では、いずれの試薬も、抗体値は疾患活動期に高く、非活動期に有意に低下していた。また、経過を追えた症例において、抗体値はいずれの試薬も疾患活動性に相関して変動していた。従って、試薬により単位、測定値は異なるが、いずれの試薬を用いても、同一試薬を用いて抗体値の推移をみることは、疾患活動性の判定に有用と考えられる。

今回の検討で、MPO-ANCA 測定値は、試薬間で各試薬の測定範囲内では相関を認めたが、臨床的に利用可能な試薬間の測定値の互換式は得られなかった。このため、経過観察の途中で試薬を変更する場合には、少なくとも一度は同一血清を変更前後の試薬で測定し、測定値の推移を観察することが大切と思われた。

[結語]

本邦で市販されている市販 ANCA 試薬 7 種類 (MPO-ANCA 3 種類、PR3-ANCA 4 種類) について検討した。今後、市販 ANCA 試薬、特に MPO-ANCA 試薬はさらなる改良が必要と思われるが、いずれの 7 試薬も ANCA 関連血管炎の診断や疾患の活動性の指標に有用と思われた。

謝辞

難治性血管炎に関する調査研究班の諸先生、血清をご提供頂いた以下の各施設の諸先生に深く感謝申し上げます。

岡山大学第三内科、杏雲堂佐々木研究所、杏林大学第一内科、群馬大学医学部付属病院、国立大蔵病院内科、国立療養所志津病院、自治医科大学第三内科、順天堂大学膠原病内科、順天堂大学浦安病院、昭和大学腎臓内科、仙台社会保険病院、天理よろず相談所病院、東京医科大学八王子医療センター腎臓科、東京女子医科大学付属第二病院、東京都老人医療センター、日本医大、兵庫大学第三内科

文献

- 1) van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH: Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 23:425-9, 1985
- 2) Falk RJ, Jennette JC: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 23:1651-7, 1988
- 3) 有村義宏, 簗島 忍, 丸茂朋史, 藤井亜砂美, 吉原 堅, 神谷康司, 中林公正, 長澤俊彦: ANCA 関連腎炎の臨床像—内科. *腎と透析* 47: 37-43, 1999.
- 4) Hagen EC, Andrassy K, Chernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross W, Lesavre P, Ludemann J, Pusey CD, Rasmussen N, et al.: The value of indirect immunofluorescence and solid phase techniques for ANCA detection. A report on the first phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. EEC/BCR Group for ANCA Assay Standardization. *J Immunol Methods* 159:1-16, 1993.

- 5) Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross WL, Hansen B, Heigl Z, Hermans J, Jayne D, Kallenberg CG, Lesavre P, Lockwood CM, Ludemann J, Mascart-Lemone F, Mirapeix E, Pusey CD, Rasmussen N, Sinico RA, Tzioufas A, Wieslander J, Wiik A, Van der Woude FJ :Development and standardization of solid phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). A report on the second phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. *J Immunol Methods* 196: 1-15, 1996.
- 6) Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Ludemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ: Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int* 53:743-53, 1998.
- 7) Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jennette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage CO, Silvestrini R, van der Woude F, Wieslander J, Wiik A:International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Am J Clin Pathol* 111:507-13, 1999
- 8) 有村義宏、長澤俊彦：ANCA 測定の標準化. *Annual Review 腎臓* 2001: 47-52, 2001.
- 9) Wang G, Csernok E, de Groot K, Gross WL:Comparison of eight commercial kits for quantitation of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 27:203-11, 1997.
- 10) Lim LC, Taylor JG, Schmitz JL, Folds JD, Wilkman AS, Falk RJ, Jennette JC: Diagnostic usefulness of antineutrophil cytoplasmic autoantibody serology. Comparative evaluation of commercial indirect fluorescent antibody kits and enzyme immunoassay kits. *Am J Clin Pathol* 111: 363-9,1999.

図1. MPO-ANCA希釈試験 (施設Iでの測定)

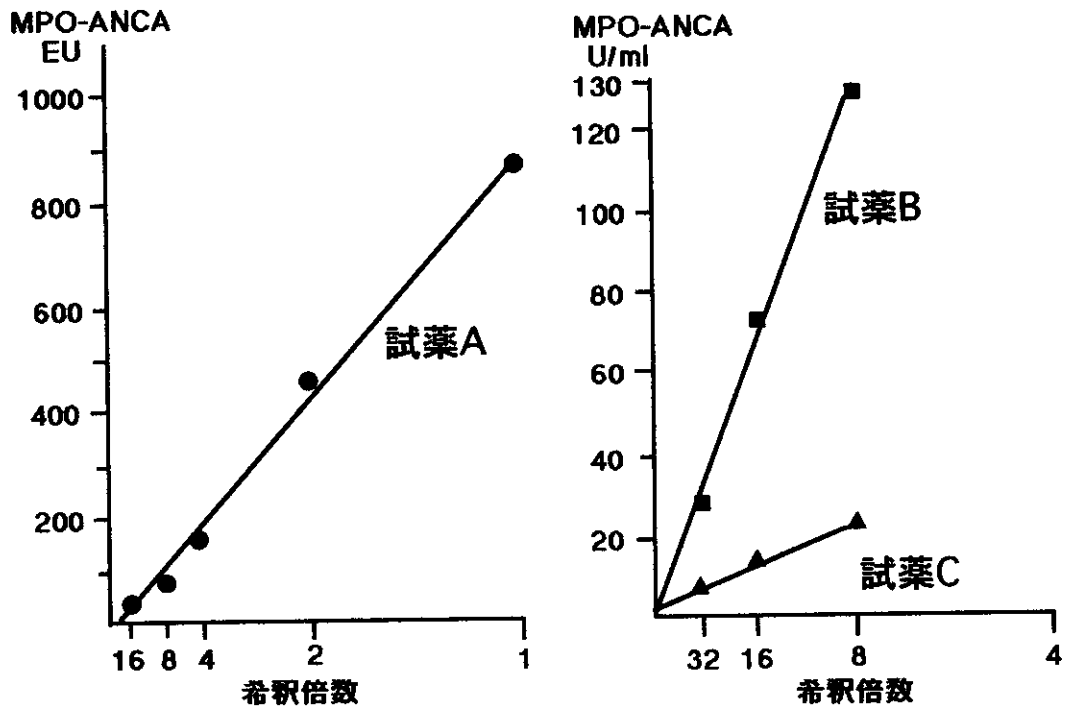


図2. MPO-ANCA値の試薬間相関

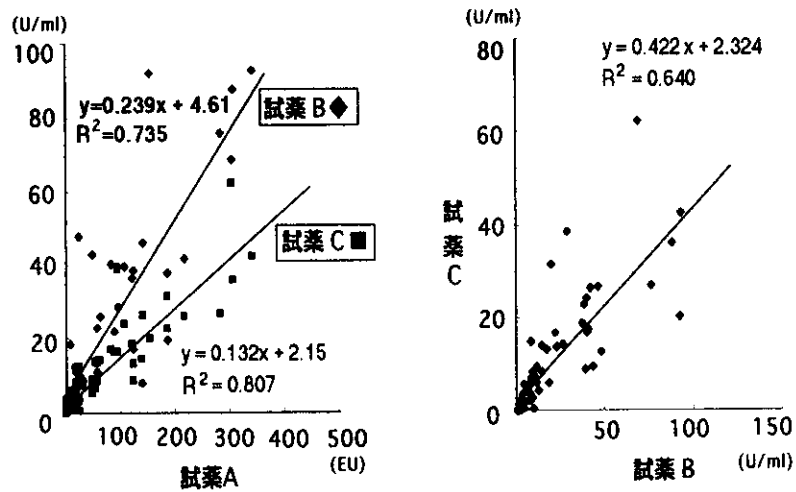


図 3. 臨床経過とMPO-ANCA値の推移 (施設 II)

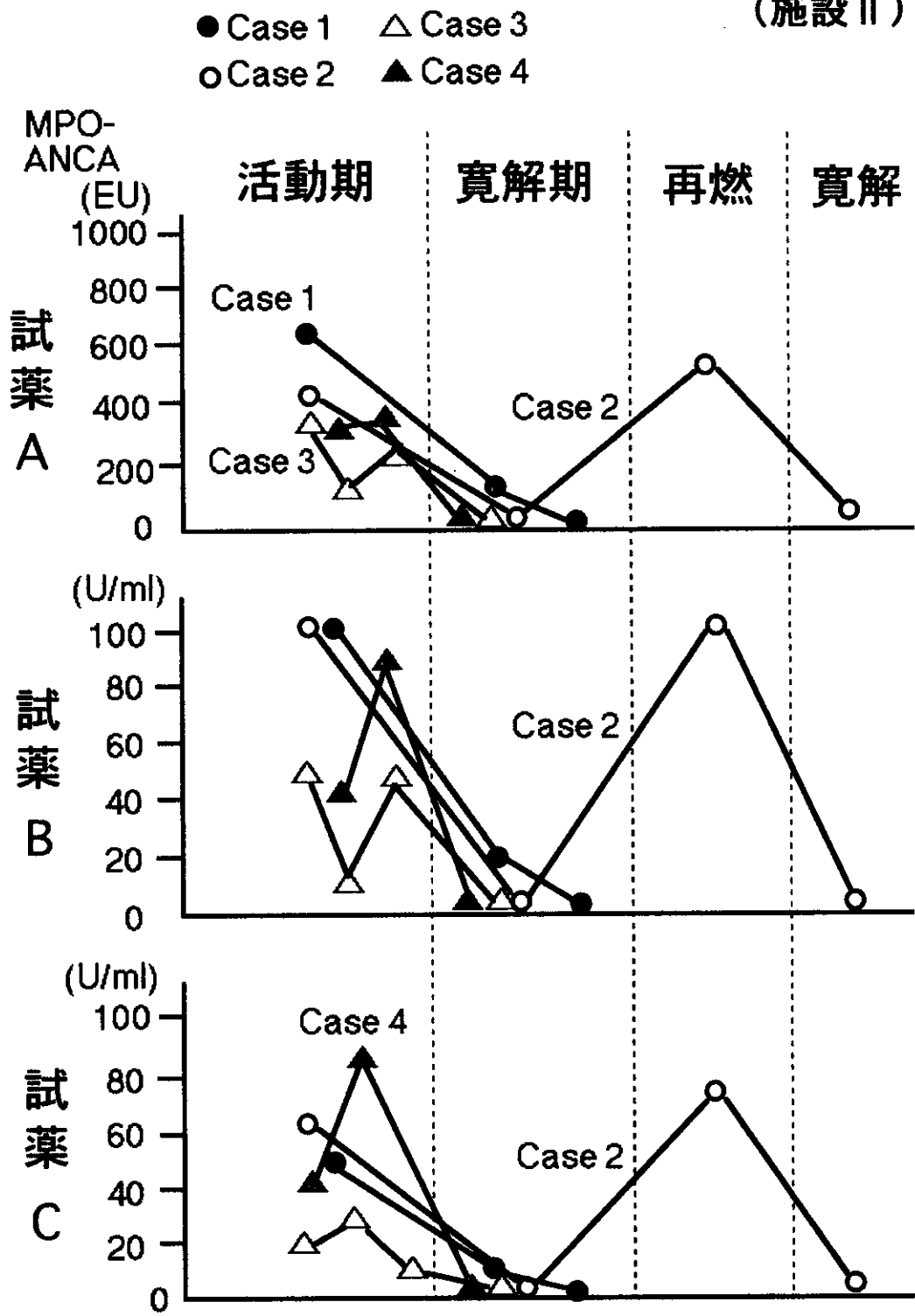


図4 .PR3-ANCA希釈試験（施設Ⅰ）

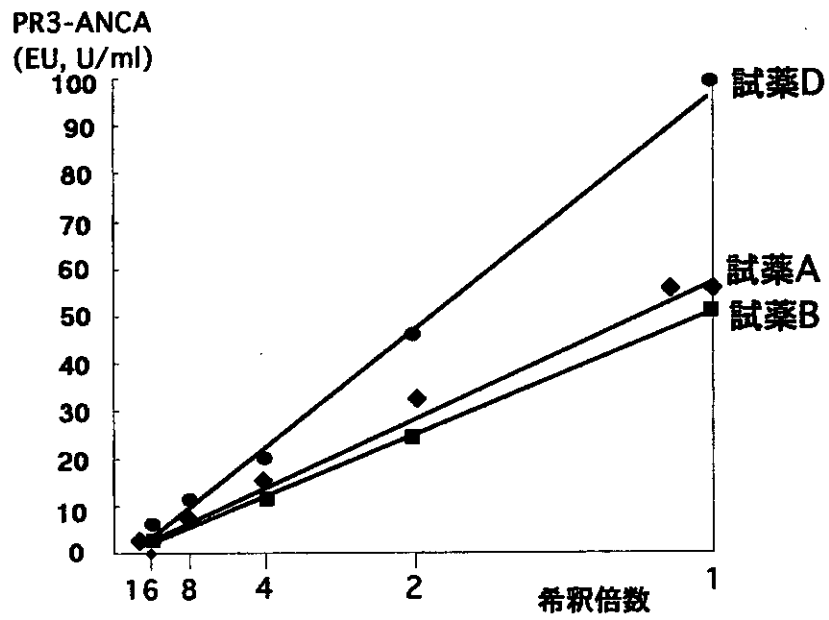


図5. PR3-ANCA希釈試験（施設Ⅱ）

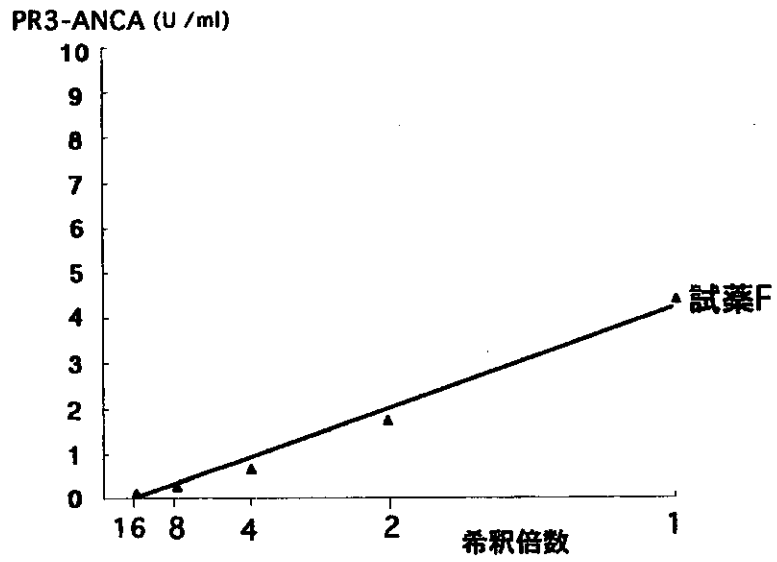


表1. 同時再現性 (MPO-ANCA試薬)

施設		血清No.1			血清No.2			血清No.3		
		試薬A	B	C	A	B	C	A	B	C
I	mean T.	28.9	31.7	12.0	94.5	61.7	40.7	878.2	>100	>100
	SD	2.1	1.2	0.5	13.0	3.4	3.9	88.7		
	CV(%)	7.5	3.8	4.9	13.8	5.6	9.8	10.1		
II	mean T.	64.5	27.8	14.8	157	49.7	60.0	546	>100	>100
	SD	4.1	1.0	1.6	11.8	2.3	4.0	35.3		
	CV(%)	6.4	3.6	11.1	7.5	4.6	6.8	6.4		
III	mean T.	45.0	28.5	9.6	119	51.3	42.6	474	>100	>100
	SD	3.2	1.4	0.5	6.7	2.3	3.2	62.0		
	CV(%)	7.2	5.2	5.7	5.7	4.7	7.7	13.1		
IV	mean T.	54.8	27.9	17.7	142.8	49.3	51.9	768	>100	>100
	SD	3.6	1.4	1.3	13.3	2.7	3.4	48.1		
	CV(%)	6.6	5.2	7.6	9.3	5.5	6.6	6.2		

mean T: mean titer (EU, U/ml)

表2. 日差再現性 (MPO-ANCA試薬)

施設		血清No.1			血清No.2			血清No.3		
		試薬A	B	C	A	B	C	A	B	C
I	mean T	31.5	29.3	11.5	116.5	53.4	36.4	881.2	>100	>100
	SD	4.3	2.0	0.9	14.8	5.8	4.2	89.8		
	CV(%)	13.6	7.0	8.1	12.7	11.0	11.5	10.1		
II	mean T	74.4	28.0	15.4	147.0	52.7	57.6	559.6	>100	>100
	SD	6.3	1.2	1.3	8.9	2.7	3.9	41.4		
	CV(%)	8.5	4.4	8.9	6.0	5.2	6.8	7.4		
III	mean T	49.0	27.8	9.8	122.0	51.7	41.8	558.0	>100	>100
	SD	4.7	2.0	0.4	5.5	0.7	1.6	113.7		
	CV(%)	9.8	7.4	4.9	4.5	1.5	4.0	20.4		
IV	mean T	81.6	28.9	16.5	142.2	53.0	58.8	728.4	>100	>100
	SD	6.9	2.2	1.4	8.6	1.9	5.7	66.6		
	CV(%)	8.5	7.7	8.7	6.0	3.6	9.7	9.1		

mean T: mean titer (EU, U/ml)