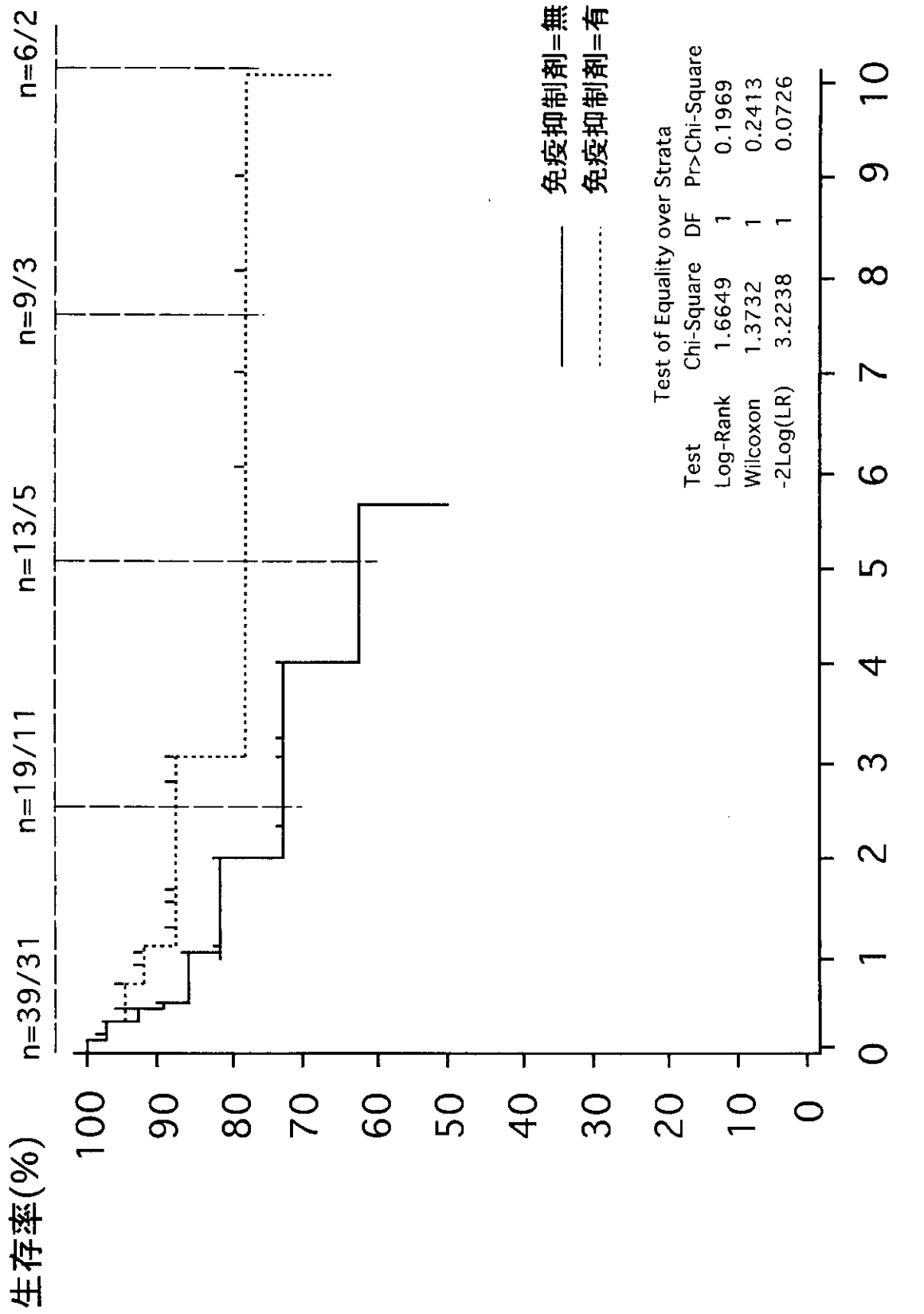


# 悪性関節リウマチの免疫抑制剤治療の有無による生存率曲線 (Kaplan-Meier法)

生存者数：免疫抑制剤有/無



### 3. 血管炎病態に関与する MPO-ANCA および好中球機能動物モデルを用いた解析

分担者 鈴木 和男 国立感染症研究所生物活性物質部

**研究要旨：**血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究が必須である。血管炎に伴い血中に MPO-ANCA が上昇するモデルマウスにおいて、血管炎の発症に関連する血清中の MPO-ANCA 値、その対応分子 MPO の性状および好中球機能を解析した。腎炎や血管炎を有する NZB/WF1、MRL、SCG、IRF-8/ICSBP マウスや *Candida albicans*-derived substances (CADS)によって誘発する冠状動脈炎マウスにおいて解析した。血管炎に MPO-ANCA がどの様に関与しているかを解明するため、MPO 遺伝子欠損マウスを作製した。その解析から、MPO-ANCA が血管炎進行に関わり、また、MPO-ANCA 産生に MPO が主要な抗原の一つになっていることを示した。この結果から、MPO が MPO-ANCA 抗原になり、また、血管炎進行に関与することを明らかにした。また、好中球異常を示す転写因子 IRF-8/ICSBP の欠損マウスでも MPO-ANCA が加齢とともに上昇し、好中球異常が MPO-ANCA 産生にも関与することを認めた。一方、血管炎、腎炎の発症への好中球の関与を明らかにする目的で、半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する SCG/Kj マウスを用い解析し、腎炎の発症、進行の初期段階（尿たんぱく 300mg/dl 以下）の末梢好中球が無刺激で MPO の易放出性を示し、活性化状態になっていることを示した。また、ヒト好中球ライソゾーム酵素 MPO 放出を阻害するアセアノスタチンをマウスの好中球に作用させたところ無刺激 MPO 放出を阻害したことから、腎炎の治療評価として応用できる可能性が示唆された。尚、これらのモデルマウスにおける MPO および MPO-ANCA の役割を解明するため、マウスリコンビナント MPO(rmMPO)およびマウス MPO(mMPO)特異的抗体を作製した。rmMPO は、ヒトと同様マウス MPO(mMPO)を *E. coli*に発現・精製し、native mMPO もマウス腹腔より調整した。尚、本研究は、大川原明子（国立感染研）、橋本ゆき（同）、松岡俊行（同）、Keiko Ozato(NIH-USA)、直江史郎（東邦大・医・大橋病院）、高橋啓（同）、大原関利章（同）、岡崎富男（広島市民病院）、武曾恵理（北野病院）、猪原登志子（京都大学院医）、小野孝彦（同）、大野尚仁（東京薬大）、三浦典子（同）の各博士の協力のもとに行なわれた。

#### A. 研究目的

Microscopic polyangiitis (MPA)などの顕微鏡所見では多くの好中球浸潤が認められることがあるなど、血管炎の病態に炎症細胞が関与していることが病理所見から観察されている。しかし、これらの細胞がどのように関与しているかについては、ほとん

ど推定の範囲を越えていない。血管炎の組織には、マイクロファージ、好中球、リンパ球の炎症細胞の浸潤が観察される。本来、炎症細胞は外来異物などを排除する生体防御機能として作用するが、血管傷害も引き起こしていると推定されている。これと関連して、血管炎患者には血清中に好中球抗

体 ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody)が上昇することや、好中球抗体と好中球が血管炎に関与していることが明らかになっている。したがって、好中球がその抗体 ANCA とともに血管炎に関与していることが容易に想像できるようになってきた。

これまで、血管炎の病因がかかわるリスク因子としては、ANCA および、それ以外の自己抗体、IL-8 や TNF $\alpha$ などの炎症性サイトカイン、内皮細胞の活性化、接着分子、内膜・中膜・外膜あるいは細胞外マトリックスの反応系などがあり、それらの因子がトリガーとして連鎖していると推定されている。一方、血管炎の患者の血中には、高い MPO の酵素活性とともに、活性化された好中球が血液中を循環していることが明らかになっている。その活性化好中球が、血管炎の発症と病態の進行に関与していると推定されている。この時、好中球は、Fc $\gamma$ レセプターを介して活性化されていることが示されており、Fc $\gamma$ レセプターが関与して自己抗体 MPO-ANCA 抗体が好中球を活性化しているのではないかと考えられている。この様にして、生体側に不利な細胞傷害を引き起こす好中球の活性化には、その抗体 ANCA が深く関わっていることが報告されてきている。特に、MPO-ANCA の関与についての解析が進んでいる。

MPO-ANCA を筆頭に、好中球抗体 ANCA が疾患誘導にかかわっていることが推定されているが、血管炎疾患の患者の血清中の MPO-ANCA の抗体価変動は、必ずしも疾患の病態と連動していないことがわかってきており、病態と密接に関与する MPO-ANCA につ

いて検討することが重要になってきていた。MPO-ANCA は、その抗原分子 MPO と抗体の反応つづく免疫複合体によって、好中球を活性化する。その状態が持続することによって、病態の重篤化を招くのではないかと考えられている。この病態と関連した MPO-ANCA の関与を解明するには、抗体による MPO 分子との反応部位 (エピトープ) を特定することと、反応性、血管傷害に関わる抗体を特定することが重要であった。このため、我々は、血管炎の病態を判定するための MPO-ANCA エピトープ解析用パネルを作成して本研究班員の協力を得て検討してきた。特に、PN および MPA 患者の血清は、H鎖の N および C 末端に単独で反応するエピトープをもつモノ (あるいはオリゴ) クロナル抗体が関わっており、他の血管炎の血清の MPO-ANCA は、末端ではない部位のエピトープ、2つ以上、すべてに反応するエピトープを示した。以上から、MPO-ANCA のクロナリテイは、血管炎疾患および病態と関連があることを示唆している。これらの結果は、治療による病態の評価基準作成や血管炎の重症度の評価に重要であると考えられる。

一方、血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究が必須である。腎炎や血管炎を有する NZB/WF1、MRL、SCG、IRF-8/ICSBP マウスや *Candida albicans*-derived substances (CADS)誘導の冠状動脈血管炎マウスなど血管炎モデルマウスを用いて血管炎発症に関与する MPO-ANCA や好中球機能について解明する必要がある。

そこで、これまで検討してきた CADS の接種によって誘発される冠状動脈炎を発症するモデルマウスで、血管炎発症と好中球抗体 MPO-ANCA の誘導との関係を調べた。さらに、CADS 誘導の血管炎に高値に認められる MPO-ANCA の抗原が MPO であるかや血管炎発症に MPO および MPO-ANCA が関与しているかを MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS を接種することで検討してきた。また、半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する SCG/Kj マウスを用い、腎炎の発症、進行への好中球機能および MPO-ANCA の関与について解析した。さらに、好中球異常を示す転写因子 IRF-8/ICSBP の欠損マウスでの好中球異常が MPO-ANCA 産生に関与するかを検討した。尚、これらのモデルマウスにおける MPO および MPO-ANCA の役割を解明するため、マウスリコンビナント MPO およびマウス MPO 特異的抗体を作製した。リコンビナント mMPO (rmMPO) は、ヒトと同様マウス MPO (mMPO) を *E. coli* に発現・精製し、native mMPO もマウス腹腔より調整することにした。

## B. 研究方法

### 1) 血管炎モデルマウス

1-1) CADS 誘導の冠状動脈血管炎マウス：4 週齢オス C3H/HeN マウスに 5 週齢と 9 週齢に CADS を 5 日連投した。

1-2) 半月体形成性糸球体腎炎発症の SCG/Kj マウス：20 週齢までの本マウスの尿たんぱく質を検出し 0 mg/dl (腎炎発症前)、300 mg/dl 以下 (腎炎初期段階)、それ以上 (腎炎後期段階) に分け、血清

MPO-ANCA 値、好中球機能を解析した。

1-3) 好中球機能分化異常を示す ICSBP-KO マウス：48 週齢までの血清中 MPO-ANCA 抗 DNA 抗体を測定した。また、好中球機能は、16 週齢オスマウスの脾臓および末梢血から好中球を分離した。バックグラウンドには C57BL/6 を使用した。

### 2) 尿たんぱく質検出

SCG/Kj において腎炎発症と病期を尿たんぱく質検出により判定した。尿生化学検査用スティックで尿たんぱく、潜血を経時的に測定し腎炎の発症、病態の指標とした。

### 3) 好中球の分離

3-1) SCG/Kj マウス：雌 SCG/Kj マウス、C57BL/6 マウス (コントロール) の腹部大動脈よりヘパリン採血し、比重法によって抹消好中球画分を単離した。

3-2) ICSBP-KO マウス：抗 Gr-1 抗体 (granulocyte differentiation marker) と Magnetic cell sorting system (MACS) を用いて、末梢血および脾臓よりそれぞれ分離した。

### 4) 好中球機能解析

4-1) MPO 放出活性：終濃度  $10^{-6}$  M の FMLP および  $5 \mu\text{g/ml}$  の サイトカラシン B で好中球を刺激して脱顆粒し、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を基質として細胞外への MPO 放出率を求めた。

4-2) 活性酸素産生：活性酸素産生は、チトクローム c の還元能により求めた。

### 5) 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 と同様に作製した。

#### 6) 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。ヒト MPO はヒト MPO-III を抗原とした。マウス MPO は、rmMPO を使用した。

#### 7) 血管炎発症の検討

屠殺後、病理標本を作製し血管炎の評価をした。

#### 8) ICSBP-KO マウス脾臓好中球の形態観察

脾臓より分離した好中球を 0.001% BSA 存在下で 15 分間、37°C で加温し、スライドグラスに接着させた後、Peroxidase activity stain を行い、1% サフランインで後染色し、好中球を同定し細胞形態を観察した。

#### 9) ADVIA による ICSBP-KO マウス脾臓好中球の細胞あたりの MPO 値の測定

血球のプロファイルおよび細胞あたりの MPO 活性を算出するために、ADVIA を用いて解析した。

### C. 研究結果

1) 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、血管炎の発生率は、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、ワイルド対照群と比較して有意に

抑制されていた (図 1、表 1)。

2) 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 1、表 1)。

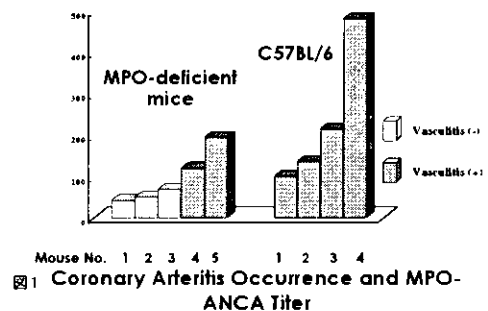


図 1. Coronary Arteritis Occurrence and MPO-ANCA Titer

Mouse	N	MPO-ANCA (hEE/ml)	anti-dsDNA (IU/ml)	CA (%)
CADS injection				
C57BL/6	4	11.1 ± 6.0	37.1 ± 33.5	100
MPO-KO	5	4.8 ± 2.2	22.3 ± 3.8	40
PBS (-) injection				
C57BL/6	10	3.5 ± 4.5	23.4 ± 8.4	0

表 1. MPO-KO 群とワイルド対照群における冠状動脈炎発症、MPO-ANCA および抗 DNA 抗体値

また、抗 DNA 抗体値は、MPO-KO 群とワイルド対照群では差がなかった (表 1)。

4) SCG/Kj マウスによる糸球体腎炎の発症と進行における活性化好中球の役割の解析  
腎炎の発症、進行のすべての時期を通じて FMLP 誘導の MPO 放出が亢進し、差が見ら

れなかったが、無刺激の好中球からの MPO 放出は、尿たんぱく 300mg/dl 以下の腎炎発症初期で高値を示し MPO の易放出性を示した (図 2)。一方、同時期の好中球活性酸素産生能、血清中 MPO-ANCA 値はむしろ低値であった。さらに、ヒト好中球ライソゾーム酵素 MPO 放出を阻害するアセアノスタチンをマウスの好中球に作用させたところ無刺激好中球の MPO 放出を阻害したことから、腎炎の治療薬の開発に応用できる可能性が示唆された。また、抹消血中の好中球数の有意の増加が認められた。さらに、腎臓障害において好中球浸潤、無刺激 MPO 放出が有意に相関した。

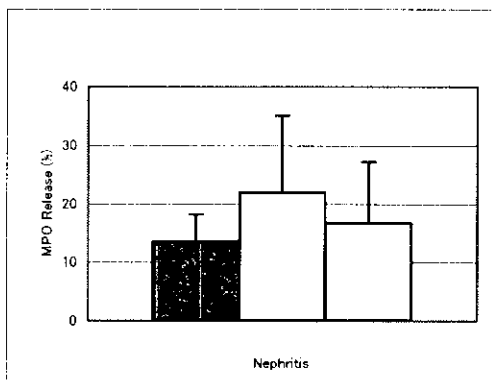


図 2. SCG/Kj マウスの好中球無刺激 MPO 放出活性

#### 4) ICSBP マウスの加齢にともなう MPO-ANCA の上昇

ICSBP knock-out マウスの 16, 32, 48 週齢の血清中の MPO-ANCA titer を測定した。その結果、wild type、heterotype に比べて高値を示し、加齢により増加した。以上から、加齢による MPO-ANCA 値の増加を誘導し

ている可能性を示唆された (図 3)。また、auto-antibody production が MPO-ANCA 特異的か否かを検討するために、auto-antibody として使用される anti dsDNA antibody titer との比較も行ったが、すべての mice は陰性であった。

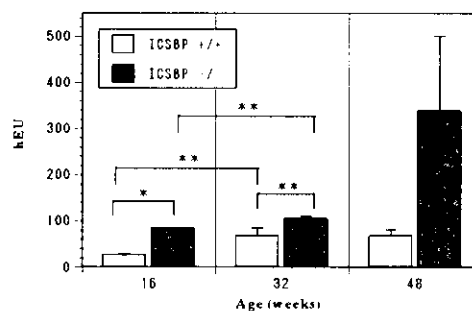


図 3. ICSBP knock-out マウスの加齢にともなう血清中の MPO-ANCA 値の上昇

#### 5) ICSBP knock-out マウスの好中球機能異常

ICSBP-KO マウスでは、好中球の異常増加が見られ、また本研究から脾臓における CD35 遺伝子の発現が低下していることから、好中球の機能異常が考えられた。そこで、MPO release、活性酸素産生を指標として、好中球機能を解析した。

##### 5-1) 好中球の MPO 放出と FMLP 感受性

ICSBP-KO マウスの脾臓から分離した好中球は、ICSBP-KO マウスの末梢血から分離した好中球に比べて約 55%、ワイルドの末梢血から分離した好中球に比べて約 64%、MPO release が有意に低下していた。さらに、FMLP に対する感受性 (CB と FMLP 刺激時の MPO release/無刺激時の MPO release) を算

出したところ、ICSBP-KO マウスの脾臓から分離した好中球は、FMLP に対する感受性が低下していた。

#### 5-2) 活性酸素産生

ICSBP-KO マウスの脾臓から分離した好中球は、ICSBP-KO の末梢血から分離した好中球に比べて約64%、ワイルドの末梢好中球に比べて約53%、活性酸素産生が有意に低下していた。

#### 5-3) 形態観察

ICSBP-KO マウス脾臓の好中球の形態を観察した。スライドグラス上に末梢好中球を接着させると、ワイルドでは丸形から著しく細胞の形態を変化させて、スライドグラスに接着したのに対し、ICSBP-KO マウス脾臓の好中球は、末梢好中球に比べて、細胞の形態変化が小さく丸い細胞の割合が非常に多いことがわかった (図4)。

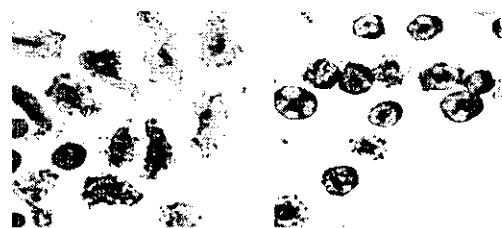


図4. ICSBP-KO マウスの末梢および脾臓好中球の形態

左：末梢好中球、右：脾臓好中球

#### 5-4) ADVIA による細胞あたりの MPO 活性の比較形態観察

血球のプロファイルを解析するために、ADVIA により解析した。ICSBP-KO マウスの好中球を示す細胞集団が左にシフトしていることから、MPO 活性が低下していた。また、細胞あたりの MPO 活性を示す MPXi 値を比較

しても、ICSBP-KO マウスでは低下していた。

#### 6) マウスリコンビナント MPO の作製

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

7)。また、コンビナント mMPO 分子は作製により抗 mMPO 特異的抗体を作製できた。これにより抗体の標準化が確認した。

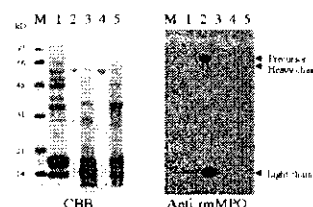


図5. Western Blotting by Anti-rmMPO Antibody  
M: Marker, 1: Mouse PMN, 2: Purified mouse MPO,  
3: Human PMN, 4: Purified human MPO, 5: Human lymphocytes

図5. マウスリコンビナント MPO

#### D. 考察

##### 1) CADS 誘発の冠状動脈血管炎発症への MPO の関与

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。

## 2) 糸球体腎炎の発症 SCG/Kj マウスにおける活性化好中球の役割

腎炎の発症に無刺激の好中球からの MPO 放出が関与していた。特に、尿たんぱく 300mg/dl 以下の腎炎発症初期で高値を示し MPO の易放出性を示した。また、抹消血中の好中球数の有意の増加が認められ、腎臓障害において好中球浸潤、無刺激 MPO 放出が有意に相関した。以上のことから腎炎の発症、進行への好中球の活性化が関与している可能性が示された。また、ヒト好中球ライソゾーム酵素 MPO 放出を阻害するアセアノスタチンを SCG/Kj マウスの好中球に作用させたところ無刺激好中球の MPO 放出を阻害したことから、腎炎の治療薬の開発に応用できる可能性が示唆された。

## 3) 好中球分化異常を示す ICSBP-KO マウス

ICSBP-KO マウスでは、myeloid cell の成熟異常が観察されていることから、顆粒球の機能異常について解析し、好中球の機能異常に関連した ANCA の産生についても検討した。脾臓には好中球が 50%程度存在し、機能的には、末梢血のそれに比べ、MPO release が約 64%、活性酸素産生では、約 53%とそれぞれ有意に低下していた。また、細胞の形態変化が小さく丸い細胞が多く、TEM 観察では、細胞内顆粒が白く抜けて見える細胞が多かった。また、好中球機能異常の結果より自己抗体は、anti dsDNA antibody titer は陰性であったが、MPO-ANCA 抗体産生は、

予想どおり加齢によって上昇した。一方、血球のプロファイルを解析から、驚くべきことに、ICSBP-KO マウスでは eosinophil を示す細胞集団が欠落し、その原因が EPO gene expression の極度な低下によるものであった。以上から、ICSBP-KO マウスの脾臓中の好中球は、末梢血中の好中球より機能低下していることが示唆された。この異常が MPO-ANCA titer の加齢による上昇に関与すると推定される。また、MPO、CD11b、CD35 の遺伝子発現を RT-PCR によって半定量した結果では、正常好中球には全く検出されない MPO の mRNA の発現が、ICSBP-KO マウスの脾臓や末梢血で強く検出された。これらのことから、ICSBP-KO マウスの脾臓には形態的には成熟しているが機能的に未成熟か、機能が抑制・低下している好中球が多数が存在すること、また未成熟 MPO が存在する可能性が考えられる。

以上から ICSBP 欠損(KO)マウスでは、MPO-ANCA 産生が加齢にともない上昇したが、活性化好中球の関与がなかったことから、発症には 1) MPO-ANCA 産生と、2) 活性化好中球の 2 ステップからなることが示唆された。

## 4) リコンビナント MPO 分子は作製

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。

## E. 結論



血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究が必須であり、本研究において、3系統の血管炎発症モデルマウスを用いて、血管炎の発症機構を解析した。1) CADSによって誘発する冠状動脈炎マウス、2) 半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する SCG/Kj マウスを用い解析し、腎炎の発症、進行の初期段階(尿たんぱく 300mg/dl 以下)の末梢好中球は無刺激でMPOの易放出性を示し、活性化状態になっていることを示した。3) また、好中球異常を示す転写因子 IRF-8/ICSBPの欠損マウスでもMPO-ANCAが加齢とともに上昇し、好中球異常がMPO-ANCA産生にも関与することを認めた。尚、これらのモデルマウスにおけるMPOおよびMPO-ANCAの役割を解明するため、マウスリコンビナントMPOおよびマウスMPO特異的抗体を作成した。リコンビナントmMPOは、ヒトと同様マウスMPOを*E. coli*に発現・精製し、native mMPOもマウス腹腔より調整した。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Yuki Hashimoto, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to

coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation*. 25, 381-387, 2001.

2) K. Suzuki Neutrophil functions of patients with vasculitis related to MPO-ANCA. *International Journal of Hematology* 74, 134-143, 2001.

3) Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda, 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) Y. Kameoka, S. Yamagoe, Y. Hatano, T. Kasama, K. Suzuki: Val581Ile polymorphism of the neutrophil chemoattractant LECT2 and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis and Rheumatism* 43, 1419-1420, 2000.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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"

9) 鈴木和男 特集「6)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) Toshiyuki Matsuoka, Yuki Hashimoto, Akiko Ishida-Okawara, Keiko Matsuo, Takuro Iwasaki, Hideki Kajiwara, Takao Arai, Keiko Ozato, and Kazuo Suzuki. Genetic inactivation of interferon

consensus sequence-binding protein (ICSBP/IRF-8) is associated with a marked suppression of neutrophil and eosinophil function Gordon Research Conference-Phagocytes, 2001.

2) Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Yuki Hashimoto, 3) Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associate with MPO-ANCA production induced by *Candida albicans*-derived substances Gordon Research Conference-Phagocytes, 2001.

4) K. Suzuki. Arteritis related with Myeloperoxidase. Geneva Biology of Ageing Workshop 2001-Cardiac ageing, heart failure and cell therapy Geneva, Switzerland Coronary. Sept. 27-29, 2001, Geneva, Switzerland.

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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：真菌感染成立に関与する好中球機能」第74回日本感染症学会、4月20日—21日

9) 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

10) 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

11) 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

12) 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

13) 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

14) 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

15) 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「Lgn1r 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

16) 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

33) 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

17) 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

19) 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

20) 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

21) 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

22) 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

23) 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

24) 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~16日、仙台

25) 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—56) 第30回日本免疫学会、11月14日~16日、仙台

26) 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

27) 亀岡洋祐、Amanda Persad、安谷屋正明、  
鈴木和男 新規 MP0 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

特許申請：

- 1) ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス
- 2) LECT2 欠損マウス

## 4. ANCA 関連血管炎における病態とサイトカインとの関連についての検討

主任研究者 橋本博史

研究協力者 木田一成、木村 桂、田村直人、小林茂人、津田裕土、高崎芳成

順天堂大学医学部膠原病内科

### 研究要旨

ANCA 関連血管炎とサイトカイン等の生理活性物質との関連について検討する。MPO-ANCA 陽性血管炎患者で腎障害、間質性肺炎、多発性単神経炎の症状を認めた 18 名の患者血清において MPO-ANCA、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、sCD40L を ELISA 法により測定し、治療前後での値を 8 症例について比較した。18 症例の平均は MPO-ANCA が 290.1  $\pm$  309.8 U/ml と高値で、IL-6 が 55.1  $\pm$  123.8 pg/ml と上昇を認めた。治療前後では TNF- $\alpha$  が 12.7 pg/ml から 6.3 pg/ml、IL-6 が 43.1 pg/ml から 13.1 pg/ml、sCD40L は 14.0 ng/ml から 2.5 ng/ml へと低下を認めた。病態の違いによるサイトカインの有意な差は認められなかった。ANCA 関連血管炎の病態により特異なサイトカインの影響は認められなかったが、症状改善と共にサイトカインの低下が認められ、血管炎活動性の指標になる可能性、及び抗サイトカイン療法の可能性が示唆された。

### A. 研究目的

抗抗中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎の病態は ANCA などの刺激により T 細胞、好中球などの炎症細胞浸潤と血管内皮の障害、その結果もたらされる血栓形成、組織障害と考えられ<sup>(1-3)</sup>、その発症機序として ANCA-サイトカイン連鎖説が提唱されている<sup>(4)</sup>。なんらかの感染を契機とし、単球、好中球、マクロファージを含む炎症細胞や免疫担当細胞が活性化し、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$ 、IL6 などのサイトカイン産生をもたらし、接着分子の発現により炎症細胞の血管内皮細胞との接着、浸潤が促進する。刺激を受けた好中球は表層にプロテアーゼを過剰発現し、ANCA 産生に寄

与するとともに、ANCA の標的となり活性化し脱顆粒を惹起する。それらにより血管内皮細胞が傷害され血栓形成や、組織障害が引き起こされると考えられている<sup>(5)</sup>。

このように ANCA 関連血管炎の病態にサイトカインが大きく関与している。今回我々は MPO-ANCA 陽性顕微鏡的多発血管炎 (MPA) の患者において、サイトカインと各臨床病態との関連があるかを各種サイトカインを測定し検討した。

MPA 患者で腎障害、間質性肺炎、多発性単神経炎の症状を認めた患者血清中の MPO-ANCA、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  を ELISA 法により測定した。また、自己抗

体産生、自己免疫疾患の病態形成に関与すると考えられる可溶性 CD 40 リガンド(sCD 40L)についても ELISA 法により測定した<sup>(6)(7)(8)(9)</sup>。また、治療により症状の軽快が得られた 8 症例において治療前後でのサイトカインの値を比較した。

## B. 研究方法

MPO-ANCA 陽性を認め、腎障害、間質性肺炎、多発性単神経炎などの臨床症状を呈し、その臨床症状から、あるいは組織学的に MPA と診断された患者 18 症例。その内訳は男性 9 名、女性 9 名で、平均年齢は 64.9 才であった。臨床症状は腎症を呈したのが 16 名、間質性肺炎が 10 名、多発性単神経炎が 5 名で、他脳梗塞、胸膜炎、虹彩炎などを認めた。

(表 1)

18 症例の MPA 患者において、ステロイド治療などの治療により、病態の改善が認められ、その前後でのサイトカインの測定比較が可能であった 8 症例の内訳は、腎障害を認めた症例が 7 例、間質性肺炎を認めた症例が 4 例、腎障害、間質性肺炎、神経障害を共に認めた症例が 2 症例であった。治療はステロイドパルス療法が施行された症例が 8 例中 5 例。プレドニゾロンは 30~80mg/day で投与された。免疫抑制剤としてアザチオプリン、サイクロフォスファミド、シクロスポリンが 5 症例にステロイドに併用使用された。血液透析が 1 例に、血漿交換療法が 2 症例に施行された。(表 2) これらの治療により 1~3 カ月後にはすべての症例で CRP、ESR 等の炎症所見の改善が認められ、腎障害、間質性肺炎等の病態も改善し、治療の有効性が確

認された。

18 症例の MPA 患者から得られた血清血清において、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の各サイトカインを ELISA 法により測定した。MPA 患者 18 症例のなかで、治療により臨床症状の改善が認められ、その前後での血清が得られた 8 症例において、治療前後において各サイトカインを測定し比較した。可溶性 CD40 リガンド(sCD40L)については MPA 患者 32 名の血清を ELISA 法により測定した。また、治療前後での血清が得られた 8 症例において、その sCD40L を測定比較した。

## C. 研究結果

18 症例の MPO-ANCA の平均値は  $281.1 \pm 303.0$  EU/ml であった。TNF- $\alpha$   $10.1 \pm 8.4$  pg/ml、IFN- $\gamma$   $3.9 \pm 2.2$  pg/ml、IL-1 $\beta$   $1.4 \pm 1.5$  pg/ml、IL-6  $55.1 \pm 123.6$  pg/ml と IL-6 のみが上昇を認めた。(表 3) 病態の違いによるサイトカインとの関連を検討したが、特に明らかな関連は認められなかった。腎症の有無での比較は、腎症のない症例は 2 症例のみで、共に間質性肺炎を呈した肺型の病態であったが、腎症の有無による各サイトカインに有意差は認めなかった。(図 1)

腎症と間質性肺炎とを共に認めた肺腎型の症例と、それ以外の症例で比較してみると、IL-6 が肺腎型でない症例において有意に高い結果が出た。しかし、1 症例 500pg/ml と高い症例があったため、それを除くと有意差は認められなかった。TNF- $\alpha$  は肺腎型の症例で高値の症例を多く認めたが、低値の症例もあり有意差はなかった。(図 2)

間質性肺炎の有無においては、肺腎型と同様 TNF- $\alpha$  で高い症例が認められたが、有意差は認めなかった。(図3) 多発性単神経炎をはじめとする神経障害の有無による比較においても、各サイトカインにおいて有意な差は認められない。

各サイトカインと MPO-ANCA との間には有意な相関は認められず、各病態別にも検討したが有意な相関は認められなかった。

18 症例の MPA 患者のうち、治療により病態の改善が認められ、その前後でのサイトカインの測定比較が可能であった 8 症例においては、治療後には MPO-ANCA は  $341.1 \pm 280.6$  EU/ml から  $43.9 \pm 38.0$  EU/ml まで有意な低下を認めた。TNF- $\alpha$  は  $13.5 \pm 10.2$  pg/ml から  $5.5 \pm 4.8$  pg/ml へと低下を認めたが、有意な差は認めなかった。しかし、すべての症例で低下を認めた。IL-6 は  $44.4 \pm 42.2$  pg/ml から  $11.9 \pm 6.6$  pg/ml へと有意の低下を認めた。特に高値例における低下が著明であった。(図4)

IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  は治療前より低値であり、治療前後では変化を認めなかった。

MPA 患者における MPO-ANCA と TNF- $\alpha$ 、IL-6 の経過を追えた 1 症例の推移を示す。(図5) 症例は間質性肺炎、RPGN の病態で発症し、ステロイド、免疫抑制剤、血漿交換療法などの治療で症状軽快と共に ANCA、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の低下を認めた。97 年に ANCA の上昇と共に IL-6 が上昇を認め、同時に間質性肺炎の急性増悪を認め、再度ステロイド増量、シクロスポリンの投与が開始され軽快した。しかし、ANCA の高値は持続を認め、98 年間質性肺炎に感染症を合

併し死亡した。このように間質性肺炎の病態の増悪に先行して ANCA、IL-6 の上昇が認められる症例が認められた。

可溶性 CD40L (CD154) の血管炎患者血清での値は MPA 患者においては  $5.22 \pm 11.39$  ng/ml と健常人  $0.29 \pm 0.34$  ng/ml と比較し高値であった。(図6) 治療前後の血清で比較すると、soluble CD40L は  $13.97 \pm 21.00$  ng/ml から  $2.53 \pm 2.15$  ng/ml へと有意に低下を認め、高値である症例において治療後に大きく減少を認めた。(図7) sCD40L と ANCA、サイトカインとの間において有意な相関は認めなかった。

#### D. 考案

血管炎の病態としては、T 細胞を介する抗原特異的免疫反応により誘導される血管、血管周囲の炎症、T 細胞、好中球、血小板や血管内皮細胞との接着・凝集とそれらの細胞の血管外への遊出、組織内における T 細胞と抗原提示細胞間の細胞相互作用によって産生される炎症メディエーターによる血管・組織障害と考えられている<sup>(2)(10)(11)</sup>。これらの病態の誘導に ANCA の関与が考えられ、他に抗内皮細胞抗体、免疫複合体の沈着、補体の活性化等も関与すると考えられている。病態形成の過程においてはサイトカインが接着分子とともに大きな役割を果たしている。

ANCA 関連血管炎においては、ANCA-サイトカイン連鎖説が提唱され<sup>(9)</sup>、ANCA が直接血管内皮細胞を刺激しサイトカイン産生・分泌を促進するように、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8、IFN- $\gamma$  等のサイトカインの関与が指摘されている。MPO-ANCA 陽性の MPA に



においては、血管炎の病巣において単球、好中球などの炎症細胞浸潤が認められ、ANCA やこれらの炎症細胞から誘導産生されたサイトカイン類などの生理活性物質が病態形成に関与することが考えられる。

今回、MPO-ANCA 陽性 MPA 患者において各サイトカインを測定し、その臨床症状との関連を検討したが、腎症、肺症状、神経症状において特異的に上昇しているサイトカインは認められなかった。間質性肺炎患者において IL-6 の上昇が認められ、その病態形成への関与が考えられているが、今回の検討では、間質性肺炎を認めた患者血清において高い症例は認められたが、有意な差は認められなかった。間質性肺炎を伴わない症例においても重篤な腎症を伴うなど、IL-6 の上昇を伴う他の病態の存在があったためと考えられる。

MPA の治療前後での各サイトカインの検討においては、治療により臨床病態の改善と共に、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の低下が認められた。IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  は治療前での値が低く、治療後も変化は認められなかった。MPO-ANCA は治療後著明に低下し、ANCA とともに TNF- $\alpha$ 、IL-6 の低下が認められ、炎症所見病態の改善が認められたことから、この患者における血管炎の病態形成への関与が考えられ、疾患活動性の指標になることが考えられた。ANCA と共にサイトカインの経過が追えた症例においても、疾患活動性と共に、あるいは病態の悪化に先行して上昇が認められたことも、このことを支持すると考えられる。また、今後の治療法として、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の高値の症例に対して、抗サイトカイン療法が効果を認めることが示唆された。

CD40L は TNF family の一つであり、抗原刺激を受けた CD4 陽性 T 細胞上に発現する分子で<sup>(12)(13)</sup>、B 細胞上のレセプターである CD40 を介して、B 細胞の増殖、免疫グロブリンのクラススイッチを誘導するなど、自己抗体産生に関与するとされ、また、細胞表面の接着分子の発現増強や炎症性サイトカインの産生に関与することが考えられている。この CD40L が刺激依存性に細胞内で切断されたものが soluble CD40L であり、これまでに SLE の患者血漿中で高値であり<sup>(14)</sup>、慢性関節リウマチで血管炎を伴う症例で高値で、リウマチ因子と相関することが報告されるなど<sup>(8)</sup>、自己免疫疾患との関与が指摘されている。この sCD40L が MPA 患者血清にて正常人と比較し、上昇が認められたことから、自己抗体である ANCA の産生になんらかの関与が考えられたが、ANCA との相関は認められなかった。しかし、治療前後で測定した 8 症例では、sCD40L は治療後低下を認め、高値であるほど大きく低下を認めた。このことから sCD40L が症例によっては、その病態発現に関わっていることが示唆され、疾患活動性のマーカーとなる可能性が考えられた。また、現在抗 CD40L 抗体による SLE 疾患モデルマウスへの治療が試験的に行われているが<sup>(15)(16)</sup>、今回認められた sCD40L 高値の血管炎患者にも、効果が期待できることが示唆された。

MPA 患者における、サイトカイン、sCD40L の測定を行い、各病態に特異的に上昇するサイトカインは認めなかったが、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の高値である症例は認められ、sCD40L が高値である症例もあり、MPA の病態発現・病態形成になんらかの関与が考え

られた。これらのサイトカイン、sCD40Lの  
高い症例では、疾患活動性の指標となること  
が考えられる。また、それらの産生を抑制す  
ることや、それらの生体内での働きを阻害す  
ることが、疾患活動性の抑制につながり、治  
療に大きく貢献するであろうことが示唆され  
る結果であった。

#### E. 結論

MPO-ANCA 陽性 MPA 患者においてサ  
イトカインを測定したが、病態によって特異  
的に上昇するサイトカインは認められなかつ  
たが、疾患の活動性の指標となり得ることが  
示唆された。また、TNF- $\alpha$ 、IL-6、sCD40L  
が治療により改善を認められ、より高値であ  
るほど大きく低下を認めることから、これら  
に対する抗体や、阻害物質等の治療への可能  
性が期待できる。

#### 参考文献

- (1) Weyland CM, Goronzy JJ : Multisystem interactions in the pathogenesis of vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 9 : 3-11, 1997
- (2) Cohen-Tervaert JW, Kallenberg CGM : Cell adhesion molecules in vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 9 : 16-25, 1997
- (3) van Vollenhoven RF : Adhesion molecules, sex steroids, and the pathogenesis of vasculitis syndromes. *Curr Opin Rheumatol* 7 : 4-19, 1995
- (4) Gross WL, Schmitt WH, Csernok E : ANCA and associated disease : immunodiagnostic and pathogenetic

aspects. *Clin Exp Immunol* 91 : 1-12, 1993

(5) Nowack R, Flores-Suarez LF, van der Woude FJ : New developments in pathogenesis of systemic vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 10 : 3-11, 1998

(6) Koshy M, Berger D, Crow MK : Increased expression of CD 40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J Clin Invest* 98 : 826-837, 1996

(7) Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK : Hyperexpression of CD 40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest* 97 : 2063-2073, 1996

(8) Tamura N, Kobayashi S, Bando H et al : Elevated levels of soluble CD40 ligand in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41 : 312-, 1998

(9) Ranheim EA, Kipps TJ : Elevated expression of CD80(B7/BB1) and other accessory molecules on synovial fluid mononuclear cell subsets in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37 : 1637-1646, 1994

(10) Kevin CG, Bullard DC : Role of leukocyte / endothelial cell adhesion molecules in pathogenesis of vasculitis. *Am J Med* 106 : 677-687, 1999

(11) Hoffman GS : Vasculitis syndromes. *Curr Opin Rheumatol* 11 : 1-2, 1999

(12) Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A et al : Identification of a novel surface

protein on activated CD4+ T cells that induces contactdependent B-cell differentiation. J Exp Med 175 : 1091-1101, 1992

(13) Banchereau J, Banzan F, Blanchard D et al : The CD40 antigen and its ligand. Ann Rev Immunol 12 : 881-922, 1994

(14) Kato K, Santana-Sahagun E, Rassenti LZ et al : The soluble CD40 ligand sCD 154 in systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 104 : 947-955, 1999

(15) Early GS, Zhao W, Burns CM : Anti-CD40 ligand antibody treatment prevents the development of lupus-like nephritis in a subset of NZBxNZW mice. Response correlates with the absence of an anti-antibody response. J Immunol 157 : 3159-3164, 1996

#### F. 健康危害情報

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

	Pt	Gender	age	RPPGN	interstitial pneumonia	Mononeuritis Multiplex	MPO-ANCA EU/ml
1	M. Y.	F	62	+	+	+	44
2	S. T.	F	73	+			146
3	H. T.	F	59		+		33
4	A. H.	M	59	+			801
5	O. A.	M	52	+			314
6	T. K.	F	81	+			244
7	H. T.	M	69	+	+	+	350
8	Y. M.	F	68		+		105
9	T. H.	F	54	+		+	66
10	K. T.	M	66	+	+		58
11	M. T.	M	60	+	+		725
12	S. M.	F	75	+			784
13	T. Y.	M	77	+	+		130
14	W. T.	F	54	+			903
15	M. Y.	F	60	+	+		128
16	M. H.	M	62	+		+	160
17	F. Y.	M	69	+	+		51
18	H. Y.	M	68	+	+	+	18
							281.1±303

RPGN : Rapidly progressive glomerulonephritis

表1 MPA患者プロフィール

Pt	Steroid	Pulse	PSL(/day)	immunosuppressant	HD	Plasmapheresis
1	M. Y.	500mg/day	40mg	AZP 50mg/day, CPA pulse		
2	S. T.	1000mg/day	80mg			
4	A. H.		50mg	CPA 50mg/day		
5	O. A.	1000mg/day	40mg	CPA pulse	+	DFPP
6	T. K.		30mg			
7	H. T.	1000mg/day	50mg			
8	Y. M.	500mg/day	50mg	CPA 50mg/day		
11	M. T.		50mg	CPA 50mg/day, CYA 50mg/day		DFPP, IAPP

PSL : prednisolone      HD : hemodialysis  
AZP : azathioprine      DFPP : doublefiltration plasmapheresis  
CPA : cyclophosphamide      IAPP : immunoadsorption plasmapheresis  
CyA : cyclosporin A

表2 MPA患者にたいする治療

		TNF- $\alpha$ pg/ml	IFN- $\gamma$ pg/ml	IL-1 $\beta$ pg/ml	IL-6 pg/ml
1	M. Y.	3.7	2.9	1.7	7.4
2	S. T.	0.1	2.9	1.5	7.0
3	H. T.	11.3	2.9	1.9	500.0
4	A. H.	9.6	3.1	1.4	27.9
5	O. A.	11.9	3.5	2.4	121.8
6	T. K.	12.9	3.8	3.0	25.8
7	H. T.	30.4	2.8	1.8	69.2
8	Y. M.	13.7	3.2	1.6	83.0
9	T. H.	9.1	5.5	1.7	0.0
10	K. T.	3.4	2.2	0.0	5.7
11	M. T.	25.8	7.3	4.3	13.4
12	S. M.	6.8	4.1	0.0	0.0
13	T. Y.	2.5	5.0	0.0	7.5
14	W. T.	10.3	0.0	0.0	0.0
15	M. Y.	20.7	9.1	4.8	21.4
16	M. H.	3.9	2.4	0.0	0.0
17	F. Y.	2.0	2.0	0.0	-
18	H. Y.	4.2	7.3	0.0	-

表3 MPA患者の各サイトカイン値