

に走化性、MMP2, 9 産生、管腔形成を誘導した。一方、RNAi による Id1 の抑制により、VEGF によって誘導される HUVEC 活性化と血管新生はほぼ完全に抑制された。このことから、Id は HUVEC における VEGF 応答に必須であり、将来的な創薬標的分子となりうることを示された。

詳細な結果については、各委員の分担研究者報告を参照。

#### D 考察

血管炎誘導モデルにおいては、*Candida albicans* 由来糖ペプチドか、MPO および MPO-ANCA 産生と発症誘導に不可欠であることから、CAWS などの真菌由来分子がサイトカインと連動する活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる。特に、TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 が重要であることが明らかになってきている。このことは、これらサイトカインに連動した MPO と MPO-ANCA がこの発症の原因になっていることが強く示唆される。また、MPO は MPO-ANCA の直接の抗原になっていることをすでに MPO 遺伝子欠損マウスを用いて明らかにしている (Inflammation 25 381, 2001)。一方、CAWS によって、冠状動脈炎が誘導され、その頻度は、100%近い値を示しており、これらに関与した mannan-protein-glucan が強力に炎症を惹起していることから、今後は、好中球の活性化との

関連について検討する必要性がある。

血管炎の発症初期に関与すると推定される血小板凝集について *in vivo* イメージング解析を行った。特に、CD69 分子が SLE 患者血清中に存在し (X Yu, et al J Immunol 166 1360-1369, 2001)、また、MPO-ANCA 増加に関連した活性化 T 細胞の発現に着目し、CD69 欠損マウスを用いて解析した。その結果、生体内の血小板血栓形成において、CD69 が重要な役割を果たしていることが示唆された。CD69-KO マウスにおいても、照射部位において血小板凝集自体は形成されていた。しかしながら、その凝集が強固な血栓とはなりにくいことから、CD69 は血小板凝集における役割よりも、血栓をより強固にする二次血栓形成における役割を担っているものと考えられる。

一方、チオレトキシン 2 に対する自己抗体は各種自己免疫疾患において、血管炎の存在と相関し、治療により、その抗体価は速やかに減少したことは、疾患活動性のモニタリングにも有効である可能性が考えられた。今後は、チオレトキシン 2 に対する自己抗体の簡便検出系を確立し、大規模検定を試みる。また、チオレトキシン 2 自己抗体の病因論的意義を内皮細胞抗原の同定と内皮細胞に対する作用によって検証する。

さらに、土屋は、HLA-DQB1\*0303 の有意な関連が検出され、HLA 領域の MPA 関連遺伝子は、DRB1\*0901, DQB1\*0303 のいずれか、あるいはこれらと連鎖不平衡にある遺伝子であることが強く示唆された。HUVEC における Id の強制発現による、HUVEC の走化性、MMP2, 9 産生、管腔形成を誘導し、

Id1 の抑制により、活性化と血管新生はほぼ完全に抑制されことから、Id が HUVEC における VEGF 応答に必須であることが示された。今後は、HLA 以外の候補遺伝子として、これまでにヒトあるいは動物モデルにおいて種々の血管炎との関連が示唆されたことのある遺伝子群(CD72, KIR など)との関連を検討する必要がある。

## **E 結論**

本基礎研究分科会では、3名の委員（鈴木、加藤、および土屋に加え、高橋および葛城の各研究協力者とともに基礎研究を重点として研究し、目標に沿った成果が得られた。鈴木および高橋は、血管炎モデルの作製と病理評価を担当し、加藤は、抗内皮細胞抗体(AECA)の病因論的役割について解析した。また、土屋は、HLA 領域における一義的な疾患感受性遺伝子として HLA-DQB1 および HLA-B 遺伝子を検討した。

## **F 健康危険情報**

各委員の分担研究報告を参照。

## **G 研究発表**

各委員の分担研究報告を参照。

## **H 知的財産権の出願・登録状況**

各委員の分担研究報告を参照。

[IV]

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
研究報告書

ANCA 関連血管炎患者末梢血における治療前後での遺伝子発現解析

主任研究者 尾崎 承一

聖マリアンナ医科大学内科学（リウマチ・膠原病・アレルギー内科）

研究要旨

ANCA 関連血管炎の病因・病態を明らかにする目的で、ANCA 関連血管炎患者末梢血における治療前後での遺伝子発現解析を行った。ANCA 関連血管炎の治療後、死亡に至る患者と軽快する患者では、治療前後の血液中の遺伝子発現に明確な差異が存在することか明らかになった。さらに ANCA 関連血管炎の治療予後を、治療後 1 週間目の遺伝子発現の状態を用いて、早期予測するための判定遺伝子として 3 種類の遺伝子を抽出した。今後さらに症例数を重ね、血管炎の発症と進展に関わる因子の検索を進める予定である。

研究協力者

永俣裕子 聖マリアンナ医科大学内科学  
（リウマチ・膠原病・アレルギー内科）

山本直弘 聖マリアンナ医科大学内科学  
（リウマチ・膠原病・アレルギー内科）

山田秀裕 聖マリアンナ医科大学内科学  
（リウマチ・膠原病・アレルギー内科）

西村訓弘 シェネティノクラホ

白田勝利 シェネティノクラホ

いて採血をおこなった。検体はシェネティノクラホに郵送し、RNA 抽出後、癌や免疫関連の約 1300 種類の既知の遺伝子を搭載した血管炎プロジェクト用マイクロアレイフィルターを用いて遺伝子発現の解析を行った。得られた良好な画像結果を画像解析ソフトを用いて数値化し、治療前と後で比較解析を行った。

C 研究結果

A. 研究目的

ANCA 関連血管炎の病因・病態を明らかにする目的で、ANCA 関連血管炎患者末梢血における治療前後での遺伝子の発現解析を行った。

B 研究方法

聖マリアンナ医科大学病院において未治療の血管炎患者および一部の再燃患者で、血管炎と診断した後、治療開始前と治療開始 1 週間後の 2 回、PAXgene Blood RNA tube を用

- 1) 平成 14 年 12 月から平成 15 年 12 月までの 1 年間で 14 症例の血管炎患者を経験した。14 ペアの症例のうち、治療開始 1 週間を経ずに死亡した症例や治療を開始しなかったアレルギー性紫斑病の症例などを除く、9 症例が解析に成功した。
- 2) 9 症例のうち、6 症例は ANCA 関連血管炎で、残り 3 症例はその他の血管炎であった。初発か 8 症例、再発はウエケナー肉芽腫の 1 症例であった。この 9

ペアで遺伝子発現の比較解析を行った。発現の低いところでの比較を避ける目的で、変動のある遺伝子として、バックグラウンドより十分高い値を示す遺伝子の中で、上位5%において倍以上差のある遺伝子 (ratio 2.0以上) を増加, 下位5%において倍以上の変化のあった遺伝子を減少ととらえた。この解析の結果, これら9症例で共通する因子は検出されなかった。

- 3) そこで, これらの発現遺伝子と予後との関連を検索した。その結果, 血管炎の治療中に死亡した症例と軽快した症例の間に差異が存在することか示唆された。すなわち, 治療開始1週間後の遺伝子発現は3つの遺伝子A, B, Cのいずれも増加していた。治療により軽快したANCA関連血管炎患者においては, 治療開始1週間後には, 1症例においてはこれらの遺伝子3つとも, また他の3症例においては1つないし2つの遺伝子の発現が減少していた。大動脈炎症候群や側頭動脈炎など他の血管炎症例においては, これら遺伝子の発現は認められないものや減少した症例があった。

#### D 考察

今回の予備解析の結果からANCA関連血管炎の治療後, 死亡にいたる患者と軽快する患者とでは, 治療前後の遺伝子の発現に明確な差異が存在することか示唆された。ANCA関連血管炎に治療予後を, 治療後1週間目の血中遺伝子の発現状態を解析することで, 早期予測する可能性が示唆された。今回治療予後を予測するための判定遺伝子として3つの遺

伝子が抽出された。ただし, 検討した症例数が少ないため, 個体差を含む可能性があり, 一方で, 血管炎の発症と進展に関わる因子について検索を進めるためにも, 今後さらに症例数を重ねることか重要と考えられた。また治療前後での遺伝子発現の比較解析方法は血管炎関連遺伝子の同定に有用であると考えられた。

#### E 結論

血管炎患者の治療予後に関連する遺伝子の抽出に成功した。

#### F 健康危険情報

該当なし

#### G 研究発表

##### I 英文原著論文

- 1 Kawabata D, Tanaka M, Fujita T, Umehara H, Fujita Y, Yoshifuji H, Mimori T and Ozaki S Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36 on joint inflammation in a mouse model of arthritides *Arthritis Rheum* 50 (2) 660-668,2004
- 2 Tanaka M, Ozaki S, Kawabata D, Kishimura M, Osakada F, Okubo M, Murakami M, Nakao K. and Mimori T Potential preventive effects of follistatin-related protein / TSC-36 on joint destruction and antagonistic modulation of its autoantibodies in rheumatoid arthritis *Int Immunol* 15(1) 71-77,2003
- 3 Akamizu T, Ozaki S, Hiratani H, Uesugi H, Sobagima J, Hataya Y, Kanamoto N, Saijo M,

- Hattori Y, Monyama K., Ohmon K and Nakao K. Drug-induced neutropenia associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) possible involvement of complement in granulocyte cytotoxicity Clin Exp Immunol 127 92-98,2002
- 4 Fujita Y, Murakami M, Ogawa Y, Masuzaki H, Tanaka M, Ozaki S, Nakao K and Mimori T Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes Clin Exp Immunol 128 21-26,2002
- 5 Fida S, Myers A.M, Whittingham S, Rowley J M, Ozaki S, and Mackay R.I .Autoantibodies to the transcriptional factor SOX13 in primary biliary cirrhosis compared with other diseases J Autoimmun 19 251-257,2002
- 6 Okazaki T, Ozaki S, Nagaoka T, Kozuki, M, Sumita S, Tanaka M, Osakada F, Kishimura M, Kakutani T and Nakao K. Antigen-specific Th1 cell as direct effectors of Propionibacterium acnes-primed lipopolysacchande-induced hepatic injury Int Immunol 13 (5) 607-613, 2001
- II 邦文著書
- 1 尾崎承一 治療学 (免疫療法)。「内科学」(杉本恒明、小俣政男、水野美邦、総編集) 朝倉書店 (東京) P240-243, 2003
- 2 尾崎承一 結節性多発動脈炎。「新・膠原病 — 診断と治療の最新ポイント — 皮膚から内臓へ」(竹原和彦、桑名正隆、宮地良樹編) 診断と治療社 (東京)、PP 100-105, 2002
- 3 尾崎承一 ANCA と血管炎。「新・膠原病 — 診断と治療の最新ポイント — 皮膚から内臓へ」(竹原和彦、桑名正隆、宮地良樹編) 診断と治療社 (東京)、PP・216-219, 2002
- 4 尾崎承一 血管炎症候群の診断と病態把握 免疫血清学的検査。「血管炎」(長澤俊彦監修・橋本博史編集)、朝倉書店 (東京)、PP・113-118, 2001
- 5 尾崎承一 慢性関節リウマチ。「知っておきたい骨 関節疾患の新たな診療」(西岡久寿樹監修) 真興交易 (東京)、PP・46-73, 2001
- III 学会発表
- a 国際学会 (一般演題)
- 1 Ozaki S, Karasawa R, Ooka S, Sekine T, Nishimura H, Mitsui K, Nukuna N, Nishioka K. and Kato T Novel Autoantigen for Anti-Endothelial Cell Antibodies (AECA) Identified by Proteomic Surveillance 11th International Vasculitis and ANCA Workshop Kidney & Blood Pressure Research 2003 10, Prague, Czech Republic
- 2 Yamasaki Y, Yamada H, Okubo M, Yamasaki M, Azuma K., Ogawa H and Ozaki S Major organ involvement and long term survival in 16 patients with amyopathic dermatomyositis,

- dermatomyositis and polymyositis An 18-year experience The 67th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2003 10 , Orlando, Florida, U.S.A.
- 3 Azuma K, Yamasaki Y , Ogawa H , Yamasaki M , Okubo M , Yamada H and Ozaki S Immunosuppressive agents for the treatment of interstitial pneumonia associated with amyopathic dermatomyositis and polymyositis Prognostic factors of the clinical outcome The 67th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2003 10 , Orlando, Florida, U.S.A.
- 4 Karasawa Rie , Sekine T , Ooka S , Nishimura H , Nukina N , Mitsui K., Ozaki S , Nishioka K. and Kato T Targets of anti-endothelial cell antibodies in patients with systemic vasculitis Identification by the proteomic approach The 67th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2003 10 , Orlando, Florida, U.S.A.
- 5 Fujita Y , Fujii T , Ozaki S and Mimori T Isolation of CD4+abTh1 clones that reactive with vascular smooth muscle antigens and induce Pulmonary vasculitis In MRL/Mp-Fas+/+Mice The 66th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2002, , New Orleans, Louisiana, U.S.A.
- 6 Kawabata D , Tanaka M , Fujita T , Umehara H , Mimori T and Ozaki S Ameliorative effects of follistatin-related protein on joint inflammation in arthritis model mice The 66th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2002, New Orleans, Louisiana, U.S.A.
- 7 Yamasaki Y , Yamada H , Ohkubo M , Yamasaki M ,Hama N and Ozaki S Stimulation of PGE2 receptor subtype, EP4, regulates progression of interstitial lung disease The 66th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2002, New Orleans, Louisiana, U.S.A.
- 8 Yamasaki M , Yamada H , Yamasaki Y , Ohkubo M , Tomohiko Yoshida , Hama N and Ozaki S Lung histopathological analysis is useful to predict the outcome of interstitial pneumonia in patients with polymyositis (PM)/dermatomyositis(DM) The 66th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2002, New Orleans, Louisiana, U.S.A.
- 9 Tanaka M , Fujii T , Umehara H , Mimori T and Ozaki S Cloning of a novel RBP1-like protein as a New Autoantigen in Rheumatoid arthritis The 66th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2002, New Orleans, Louisiana, U.S.A.
- 10 Takahama H, Yamasaki E, Minami K,

- Hosaka E, Matsuoka A, Haga T, Kawase A, Shibata T, Shimajo S, Yamada H, Soma Y, Ozaki S and Mizoguchi M Three Cases of sweet's syndrome with central nervous system manifestations The 7th China-Japan Joint Meeting of Dermanology 2002, Guangzhou, China,
- 11 Akaogi J, Yamada H, Azuma K., Hama N, Kikukawa T, Mori T and Ozaki S Suppression of pannus formation by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 is mediated through induction of apoptosis of synovial vascular endothelial cells and fibroblast-like synoviocytes The 65th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2001, San Francisco, California, U S.A.
- 12 Akaogi J, Yamada H, Hama N, Kikukawa T, Mori T, Kawai S and Ozaki S Prostaglandin E2 receptor Subtype EP4 Mediated suppression of pannus formation in rheumatoid arthritis The 65th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2001, San Francisco, California, U S.A.
- 13 Yamasaki Y, Azuma K., Yamasaki M, Hama N, Yamada H and Ozaki S Pulmonary fibrosis dose not progress during long-term follow-up in most of the patients with systemic sclerosis without cyclophosphamide treatment The 65th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2001, San Francisco, California, U S.A.
- 14 Yamasaki Y, Azuma K., Yamasaki M, Hama N, Yamada H and Ozaki S Small airway disease as an important complication of systemic sclerosis The 65th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2001, San Francisco, California, U S.A.
- 15 Yamasaki Y, Azuma K., Yamasaki M, Hama N, Yamada H and Ozaki S Lipidmicrosphere-incorporated prostaglandin E1 for the treatment of pulmonary fibrosis in patients with systemic sclerosis The 65th National Scientific Meeting of the American College of Rheumatology 2001, San Francisco, California, U S.A.
- b 国内学会 (シンポジウム)
- 1 尾崎承一 ANCA関連血管炎。「シンポジウム - 膠原病関連病態」第54回日本皮膚科学会中部支部学術大会。2003年11月8-9日。大阪。
- 2 岡寛 尾崎承一、西岡久寿樹 関節リウマチにおける生物学的製剤のクリニカルパス～診療の標準化と最適化。「シンポジウム 2 関節リウマチの抗サイトカイン療法 展望と問題点」第18回日本臨床リウマチ学会総会。2003年10月2-3日。札幌。



- 3 三森経世、田中真生、村上雅朗、尾崎承一 慢性関節リウマチの病原的自己抗体と対応抗原。  
「シンポジウム13 新しい自己抗体と臨床的意義」第45回日本リウマチ学会総会・学術集会。  
2001年5月14-16日。東京。

#### H 知的財産の出願・登録状況

- 1 出願取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

肺腎症候群を呈する疾患群の臨床、検査成績、病理組織像に関する研究

分担研究者 中林公正 杏林大学 第一内科教授

研究協力者 福岡利仁、有村義宏、山田 明

#### 研究要旨

目的 肺腎症候群を呈した 24 の症例を、MPO や抗 GBM 抗体、免疫複合体 (IC) の観点から subsets に分け、臨床像・腎組織所見について検討した。方法 MPO や抗 GBM 抗体の測定は EIA による。MPO-ANCA 単独陽性例 (MPO 群) は 13 例、抗 GBM Ab 単独陽性例 (GBM 群) 4 例、MPO-ANCA と抗 GBM Ab の併存症例 (併存群) は 3 例、IC 型症例 (IC 群) は 3 例であった。成績 男女比、平均年齢、診断時平均 Cr 値、発症から腎不全迄の期間は、夫々以下のことくであった。MPO 群は 4/9、71 歳、53 mg/dl、26 週間であった。GBM 群は、2/2、61 歳、100 mg/dl、4 週間であった。併存群は、2/1、60 歳、113 mg/dl、8 週間であった。IC 群は 3/1、43 歳、15 mg/dl、35 週間であった。腎組織所見は、MPO 群は限局性半月体形成から全周性半月体形成迄の症例が存在した。TI 病変は全例に認められた。GBM 群と併存群は、全例に全周性半月体と TI 病変が認められた。IC 群は限局性の半月体形成であった。IF 所見は、MPO 群では pauci immune であり、GBM 群と併存群は IgG linear であった。IC 群は IgG と C3 が granular に沈着していた。考案と結語 MPO 群は高齢者に多く発症から腎不全迄の期間が長期であることから、smolding で発症する症例が多いことを示していた。半月体の程度も様々であった。これに対し、GBM 群は 4 週間で腎不全になり、全周性半月体を形成していた。併存群は 8 週間で腎不全になり、やはり全周性半月体を主としていた。

#### 研究目的

MPO-ANCA 関連血管炎で肺腎型を呈する症例は、生命予後が悪いことが知られている。<sup>1)</sup> ところで、肺腎に同時に障

害を来す疾患は MPO-ANCA 関連血管炎 (MPO-ANCA 群) 以外に Goodpasture 症候群 (抗 GBM Ab 群) や IC 型の血管炎 (IC 群) の存在も知られている。<sup>2)</sup> そこ

て、今回はここ 18 年間に当教室で経験した肺腎症候群の 24 例を、MPO-ANCA 群、抗 GBM Ab 群、抗 GBM Ab・MPO-ANCA 併存群、<sup>3)</sup> IC 群に分けて、臨床像、検査成績、腎病理組織像について検討した。

#### 研究方法

肉眼的な肺出血を認め同時に腎機能障害を来した症例を対象症例とした。MPO-ANCA と抗 GBM 抗体の測定は、EIA 法によった。MPO-ANCA 単独陽性の MPO-ANCA 群は 13 例、抗 GBM Ab 単独陽性例の抗 GBM Ab 群は 4 例、抗 GBM Ab と MPO-ANCA の併存群（抗 GBM Ab・MPO-ANCA 併存群）は 3 例、IC 型血管炎群（IC 群）は 4 例であった（表 1）。これ等の症例の臨床、検査成績、腎病理組織像について検討した。

#### 研究結果

##### 1 臨床像・検査成績について（表 2）

MPO-ANCA 群では女性の比率が多かったか、他の疾患では性差を認めなかった。年齢では、平均年齢で見ると、MPO-ANCA 群が 71.5 歳と最も高く、逆に IC 群は 43 歳と若年であった。抗 GBM Ab 群と抗 GBM Ab・MPO-ANCA 併存群は、61 歳、60 歳と上記疾患の中間の年齢であった。診断時の血清 Cr 値は、抗 GBM Ab 群と抗 GBM・ANCA 併存群が夫々 10.0 mg/dl、11.3 mg/dl と著明な高値を呈し

ていたが、IC 群は 1.5 mg/dl と低値であった。MPO-ANCA 群は 5.3 mg/dl と上記疾患の中間の値を呈していた。詳細に検討すると、抗 GBM Ab 群は 5.4 ~ 14.0 mg/dl に、抗 GBM Ab・MPO-ANCA 併存群は 3.2 ~ 16.1 mg/dl に、IC 群は 1.0 ~ 1.8 mg/dl に、MPO-ANCA 群は 1.3 ~ 9.6 mg/dl に分布していた。発症から腎不全・腎機能障害迄に至る平均期間は、抗 GBM Ab 群は 4 週間、抗 GBM Ab・MPO-ANCA 併存群は 12 週間、IC 群は 3.5 週間、MPO-ANCA 群は 28 週間であった。即ち、抗 GBM Ab 群と IC 群は発症してから短期間で腎不全・腎機能障害に至るが、MPO-ANCA 群は長期間に亘って腎不全に至る症例が多く、かつその血清 Cr 値も多様であることか、示された。抗 GBM Ab・MPO-ANCA 併存群は、抗 GBM Ab 群と MPO-ANCA 群の中間に位置する疾患の性質を有していた。

2 腎病理組織像について（表 3）半月体形成に関しては、抗 GBM Ab 腎炎群では、全例に全系球体での全周性の半月体形成が認められた。これに対し、MPO-ANCA 群では、全例に半月体形成が認められたか、その半月体は全周性から限局性のものが存在した。IC 群では、1 例のみの腎生検であったか、限局性の半月体であり、その形成率も僅かであった。抗 GBM Ab・MPO-ANCA 併存群は、抗 GBM Ab 群と MPO-ANCA 群の中間に位置する

半月体の性状と形成率であった。急性間質性病変は、いつれの疾患でも認められたが、抗 GBM Ab 群を除いてはいつれの症例も尿細管間質部の毛細血管炎による leukocytoclastic vasculitis の所見によるものと考えられた。これに対し、抗 GBM Ab 群では Bowman 嚢の破綻（半月体形成による）から波及した間質病変であった。血管炎（毛細血管炎を除く細・小動脈炎）所見は、MPO-ANCA 群の 1 例を除き、認められなかった。免疫グロブリン・補体の沈着は、抗 GBM Ab 群の 4 例と抗 GBM Ab・MPO-ANCA 併存群の 2 例に IgG の糸球体係蹄に沿う linear deposit が認められ、IC 群では 1 例に IgG と C3 の granular deposits が糸球体係蹄に沿って認められた。即ち、抗 GBM Ab 群では一時期に急性に全周性の半月体形成が発症するが、MPO-ANCA 群では種々の程度の半月体か長期間に亘って形成されると考えられた。

#### 考察

肺腎症候群を呈する疾患を、抗 GBM Ab 群、抗 GBM・MPO-ANCA 併存群、MPO-ANCA 群、IC 群に分けて、臨床、検査成績、腎病理組織所見について、検討した。臨床像の特徴として、抗 GBM Ab 群、IC 群は初期の感染徴候から腎不全・腎機能障害迄の期間がいずれも 4 週間と短い期間であった。これに対し、MPO-

ANCA 群は 28 週と長い期間であった。抗 GBM Ab・MPO-ANCA 併存群は、上記 2 疾患の間であった。腎機能障害の程度は、抗 GBM Ab 群と抗 GBM Ab・MPO-ANCA 群が著明であったが、IC 群は軽度であり、MPO-ANCA 群は、両者の中間にあった。半月体形成率は、抗 GBM Ab 群が著明であったか、IC 群は軽微であり、MPO-ANCA は著明から軽度迄の様々な症例が存在した。抗 GBM Ab MPO-ANCA 併存群は、抗 GBM Ab と MPO-ANCA 群の中間に位置していた。急性間質性病変は、抗 GBM Ab 群と他の疾患とには、その所見に差異が存在した。即ち、抗 GBM Ab 群は Bowman 嚢の破綻によるものであったが、その他の疾患は尿細管間質部の毛細血管炎によるものと考えられた。尚、MPO-ANCA 群は MPO-ANCA による毛細血管炎であり、IC 群は IC 沈着による毛細血管炎と考えられた。細・小動脈の血管炎は、僅かに MPO-ANCA 群の 1 例に認められたのみで、その他は総じて陰性であった。免疫グロブリン・補体の沈着は、抗 GBM Ab が検出された抗 GBM Ab 群と抗 GBM Ab・MPO-ANCA 併存群に糸球体係蹄に沿う IgG の linear deposit と IC 群のやはり糸球体係蹄に沿う IgG・C3 の granular deposits のみか陽性に認められた。MPO-ANCA 群はほぼ陰性であった。

以上から、抗 GBM Ab 群と IC 群は発症より短期間で病状が形成されて、肺出血と共に腎不全や腎機能障害に陥る。これ

に対して MPO-ANCA 群は、8~48 週を経て肺出血・腎不全を呈する。又、抗 GBM Ab 群は全周性の半月体を形成すが、MPO-ANCA 群の半月体は様々の程度のものか存在していた。抗 GBM Ab・MPO-ANCA 群は両者の中間に位置するものであった。

#### 結語

肺腎症候群を呈する症例を、抗 GBM Ab 群、抗 GBM AB・MPO-ANCA 群、MPO-ANCA 群、IC 群に分けて、その臨床、検査成績、腎病理組織像について、検討し、その特徴を明らかにした。此れ等の特徴の差異を念頭に置くことが、早期診断や早期治療に重要と考えられた。

#### 文献

- 1 中林公正 中・小型血管炎の疫学、予後、QOL に関する小委員会報告 厚生省特定疾患免疫疾患調査研究班 難治性血管炎分科会平成 10 年度研究報告書 38~48, 1999
- 2 Eaglen JW, et al Pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus *Medicine* 57 546~560, 1978
- 3 Jayne DRW, et al Autoantibodies to GBM and neutrophil cytoplasm in rapidly progressive glomerulonephritis *Kidney Int* 37 965~970, 1990

#### 健康危険情報

腎生検は患者の同意を得て施行してい

るので、特別な倫理上の問題は存在しないと考える。

#### 研究発表

##### 1 論文発表

- ① 関内真紀穂、中林公正、丸茂朋史、有村義宏、山田 明 血球貧食症状群を発症した関節リウマチの 1 例  
リウマチ 2003, 42 696~702
- ② 中林公正 ループス腎炎と免疫抑制療法 *Nephrology Frontier* 2003, 2 83~90
- ③ 中林公正 ANCA 関連血管炎の予後 (特集 ANCA 関連血管炎)  
リウマチ科 2003, 29 255~260
- ④ 中林公正、土岐岳士 ANCA 関連血管炎の臨床像 *医学のあゆみ* 2003, 206 130~132
- ⑤ 藤井裕子、有村義宏、高橋直子、土岐岳士、丸茂朋史、吉原 堅、中林公正、山田 明 コルヒチンとシクロスポリンの併用療法中にニューロミオパシーを呈したヘーチェット病の 1 症例  
リウマチ 2003, 43 44~50
- ⑥ 中林公正 「結節性多発動脈炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎、Wegener 肉芽腫症」*ダイナミックメデシン*(下条文武、斉藤 康編)、2003 年、西村書店 P19 101~19 110
- ⑦ 中林公正 全身性血管炎 (高安動脈炎、結節性多発動脈炎、Wegener 肉芽腫症、アレルギー性肉芽腫性血管炎、顕微鏡的多発血管炎、過敏性血管炎)

内科学 (異川 清、松澤佑次編)、2003、  
P2188~2193

- ⑧ 福岡利仁、中林公正 抗リン脂質抗体症候群 臨床と研究 81 265~270、  
2004

- ⑥ 中林公正 血管炎の臨床一中・小型  
血管炎と抗好中球細胞抗体一、日本内  
科学会北陸支部 第30回生涯教育講  
演会、金沢、2003 9 7

## 2 学会発表

- ① Nakabayashi K, Fukuoka T, Arimura Y,  
Yamada A Prognostic implication of  
clinical subsets in MPO-ANCA associated  
vasculitis 11<sup>th</sup> International Vasculitis and  
ANCA Workshop, Oct 2~5, 2003, Prague,  
Czech Republic
- ② Nakabayashi K, Fukuoka T, Arimura Y,  
Yamada A MPO-ANCA associated  
vasculitis presenting clinical features as  
polymyalgia rheumatica or polymyositis  
ibid
- ③ Arimura Y, Toki T, Nakabayashi K,  
Yamada A, Nagasawa T Serial changes  
of prognosis and clinical features in MPO-  
ANCA related glomerulonephritis in  
Japanese patients ibid
- ④ 中林公正 ANCA 関連血管炎の臨床  
像の多様性とその検査成績・病理組織  
像について、第13回宮崎臨床免疫研  
究会、宮崎、2004 1 23
- ⑤ 福岡利仁、関内真紀穂、神谷康司、  
中林公正、長澤俊彦 腸穿孔を来した  
末梢動脈炎型悪性関節リウマチの一例  
第8回血管病理研究会、秋田、  
2003 10 18

表 1

対象疾患と方法	
杏林大学第一内科で肺出血・腎障害を同時に認め た症例 (1985~2006)	
1. Goodpasture 症候群	
A・GBM A b 単独	4例
A・GBM A b MPO-ANCA 併存	3例
2. MPO-ANCA 関連血管炎	13例
3. IC型血管炎	4例

表 2

Goodpasture症候群、MPO-ANCA血管炎、 IC型血管炎の臨床像				
疾患	M/F	年齢	診断時血清 Cr値 (mg/dl)	発症から腎不全 迄の期間 (週)
A-GBM Ab (n=4)	2/2	61.0	10.0	4
A-GBM Ab + MPO-ANCA (n=3)	2/1	60.0	11.3	12
MPO-ANCA (n=13)	4/9	71.5	5.3	28
IC (n=4)	3/1	43.0	1.5	3.5



表 3

Goodpasture症候群、MPO-ANCA血管炎、 IC型血管炎の腎病理組織像				
疾患	腎糸球体の 半月体形成率	急性間質性 病変	血管炎	IgG沈着
A-GBM A b (n=4)	100% (4/4) (全周性)	(+)~(++) (4/4)	0/4	4/4
A-GBM A b + MPO-ANCA (n=2)	100~60% (2/2) (全周性~ 限局性)	(+) (2/2)	0/2	2/2
MPO-ANCA (n=6)	100~33%(6/6) (全周性~ 限局性)	(+)~(++) (6/6)	1/6	0/6
IC (n=1)	10% (1/1) (限局性)	(+) (0/1)	0/1	1/1

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

ANCA 関連血管炎の免疫抑制療法下カリニ肺炎の診断、ST 合剤予防、標的治療の指標としての抗β-グルカン抗体の有用性

分担研究者 吉田雅治 東京医科大学八王子医療センター 腎臓科 助教授  
研究協力者 大野 尚仁 東京薬科大学薬学部免疫学教室 教授、石橋 健一  
東京薬科大学薬学部免疫学教室 大学院

研究要旨 ANCA関連血管炎(AAV)に対する免疫抑制療法中の重篤な合併症であるカリニ肺炎(PCP)の予知、ST合剤の予防、標的治療の予後予測の指標としてβグルカン(BG)に対する抗体(抗BG抗体)の意義について明らかにする事を目的とした。真菌及びPCの細胞壁に存在するβグルカン(BG)を抗原とした特異的抗体(抗BG抗体)を、ELISAにより樹立し、健康人22名、AAV52名(PCP3名を含む)を測定した。抗BG抗体は健康人22名が $2677 \pm 1686$ Uに比較し、未治療期AAV16名は $691 \pm 522$ U、治療後AAV24名は $547 \pm 416$ Uと有意に低値を示した( $P < 0.01$ )。抗BG抗体を経時的に測定するとAAV寛解期11例は $1180 \pm 1304$ Uと上昇するのに比較し、PCP併発時にはBGの上昇に加え抗BG抗体は $369 \pm 441$ Uと有意に低下し( $P < 0.01$ )、抗菌療法によりPCPが回復すると抗BG抗体は速やかに上昇した。PCP2例のBAL中の抗BG抗体を発症時より経時的に測定すると血清中と鏡面的に推移した。マウスによる検討により抗BG抗体はBGに対する中和抗体として作用すると考えられた。AAVに対する免疫抑制療法中ST合剤はPCPの予防、標的治療として有効であり、その際BGはγグロブリン療法及び透析治療の透析膜使用で偽陽性を呈する事があるか、抗BG抗体はそれらの影響を受けなかった。AAVのPCP感染の予知、予測の指標として抗BG抗体は臨床上有用と考えられた。

A 研究目的

ANCA 関連血管炎(AAV)は、副腎皮質ステロイド剤、免疫抑制剤を主体とする免疫抑制療法により寛解へ導入される症例がある一方、深在性真菌症およびカリニ肺炎(PCP)の感染症死が最も多く早期診断含めた対策の確立が急務である<sup>1) 2) 3)</sup>。最近植物、食物など自然界及び真菌及びカリニ原虫の細胞壁に広く存在し、特異的免疫応答が注目されている細胞壁βグルカン<sup>4)</sup>

に対する抗体産生について検討した。一般に、βグルカンは免疫原性が低いと考えられており、これに対する抗体産生については十分に検討されていない。そこで、今回可溶性化したカンシタ細胞壁βグルカンを抗原<sup>5)</sup>とした抗体(抗CSBG抗体)の測定系を酵素抗体法(ELISA)により樹立し、AAVのカリニ肺炎(PCP)感染症の早期診断含めた対策における指標としての臨床的意義について検討した。

B 研究方法

### 1 CSBG の調整

*Candida albicans* IFO1385 のアセトン乾燥菌体を次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)で処理し、引き続き DMSO 抽出して CSBG を調整し、これを NaHCO<sub>3</sub> (PH8.2)で適宜希釈して使用した。

### 2 抗 CSBG 抗体価の測定

CSBG(25ug/ml)を可溶性抗原として用い、一次抗体には検体を、二次抗体としてペルオキシターゼ標識抗ヒト IgG,IgM を、発色試薬には TMB を用い、450nm の吸光度により抗 CSBG 抗体価を比色定量した(ELISA)。

### 3 抗 CSBG 標準抗体精製

健常人血清(ポリグロヒン N)から粒子状βクルカン、OX-CA 担体を用い調整した。

### 4 抗 CSBG 抗体測定対象患者

健常人 22 名、AAV 52 名を対象とした。

## C、研究結果

### 1 抗 CSBG 抗体測定系の樹立(ELISA)

図 1 に示すように精製 CSBG25mg/mL を固相化し、BSA で blocking 処理した ELISA にて抗 CSBG 抗体を測定した。健常者の血清およびポリクロヒン N を用いて各希釈率は 12800 倍以上と非常に高感度で抗 CSBG 抗体が検出され、定量的に測定できることが明らかとなった。抗 CSBG 抗体は、βクルカンの高次構造依存的反応性を示し、直鎖β-1、6 構造に対して高い反応性を示した。

2 抗 CSBG 抗体にβクルカンを添加した競合的 ELISA 測定(交差反応性の検証)

精製 CSBG 250ug/mL を固相化した ELISA に、CSBG を競合剤として添加し、結合阻害を測定した。CSBG の添加により用量依存的に、結合がほぼ 100%と特異的に抑制された。

### 3 各種疾患血清における抗 CSBG 抗体価

図 2 に抗 CSBG 抗体を健常人 22 名と AAV の患者 52 名について ELISA により測定した結果を示す。抗 CSBG 抗体力価は健常人 22 名が  $2677 \pm 1686U$  に比較し、未治療活動期 AAV14 例は  $691 \pm 522U$ 、免疫抑制治療後 AAV24 名は  $547 \pm 416U$  と健常人に比較して有意に低値を示した( $P < 0.01$ )。AAV における抗 CSBG 抗体を経時的に測定すると寛解期 11 例は  $1180 \pm 1304 U$  と上昇した。一方、AAV 治療後 PCP 併発した 3 名の抗 CSBG 抗体は  $369 \pm 441U$  と健常人に比較して有意に低下した ( $P < 0.01$ )。

### 4 AAV における抗 CSBG 抗体の経時的測定

症例 1)KM 64 歳、男性、AAV(RPGN + カリニ肺炎)

図 3 に臨床経過を示すか、MPO-ANCA が陽性で腎血管炎を呈した病初期は、抗 CSBG 抗体価は 1800U と高値であった。腎血管炎に対して副腎皮質ステロイド中等量 (32 mg/日) および、エントキササン経口 (100mg/日) 併用後、MPO-ANCA の低下、腎血管炎症候が軽快するに伴い、抗 CSBG 抗体力価は 600U まで徐々に低下していった。発症 1 ヶ月目に、発熱、呼吸困難を示し気管支洗浄液よりカリニ原虫を証明し、カリニ肺炎による呼吸不全を併発した。CRP の上昇、βクルカンの上昇に先行して抗 CSBG 力価は 100U まで低下した。S T 合剤及びステロイドパルス療法の治療によりカリニ肺炎の軽快に伴い抗 CSBG 力価は 1300U まで上昇した。同時に測定した BAL 中の抗 CSBG 抗体力価はカリニ肺炎発症早期に 5318U と高値を示したか、軽快すると 585U

まで速やかに低下した。一方、 $\beta$ クルカンはカリニ肺炎発症後一端上昇すると、腎血管炎による腎不全に対するCHDF,HD治療による透析膜の影響も関与してか高値を持続する傾向を示した。

症例 2) W T 56歳 男性 AAV(肺腎症候群) PCP (-)

図4に臨床経過を示すが、浮腫、乏尿に続いて、急激に血清クレアチニン(S Cr)が29mg/dlと上昇し、MPO-ANCAが136Uと高値陽性を示し腎血管炎による急速進行性糸球体腎炎(RPGN)を呈した。CRP23mg/dlと上昇し、同時に肺血管炎(急性間質性肺炎)による呼吸困難を呈し、肺腎症候群を伴うAAVと診断した。未治療活動期に抗CSBG抗体力価は2500Uと高値を示した。副腎皮質ステロイドパルス療法を含むPSL60mg/日投与及びエントキサンプルス療法(700mg/2回)により、MPO-ANCAは10U以下と低下し、肺腎血管炎症候とも改善を示した。抗CSBG抗体力価は徐々に低下したか700Uで維持され、ST合剤(2錠/週)の予防投与を免疫抑制治療初期より行った結果、カリニ併発感染症をきたさず治療できた。一方、 $\beta$ クルカンは経過中 $\gamma$ グロブリン療法の投与により高値を持続し、PCP併発感染症の予知マ-カとしては不相当であった。

5 マウスによる抗CSBG抗体の検討

DBA/2マウス(抗CSBG抗体保持)の尾静脈よりCSBGを投与し、抗CSBG抗体かのような挙動を示すか検討した。図5に示すように、生食水に比しCSBGの添加容量依存的に投与後1-2時間の早期に抗CSBG抗体力価は有意に低下し( $P<0.001, 0.005$ )、速やかに元に復した。

## D、考察

AAV感染症死亡のリスク因子の一つとして、免疫抑制療法中のカリニ肺炎の早期診断が必要である<sup>1) 2) 3)</sup>。最近、植物、食物、カリニ原虫含む真菌など自然界に広く存在し、特異的免疫応答が注目されている $\beta$ グルカン<sup>4)</sup>に対する抗体産生に関して検討した。 $\beta$ グルカンは一般に免疫原性が低いと考えられており、細胞壁 $\beta$ グルカンに対する抗体産生についてはこれまで十分に検討されていない。我々はカンシタ細胞壁 $\beta$ クルカン(CSBG)の可溶化方法を開発し、種々の活性を見出し報告した<sup>5)</sup>。また、カンシタをマウスに免疫すると抗CSBG抗体価が上昇することも見出した<sup>6)</sup>。そこで、可溶化したカンシタ細胞壁 $\beta$ グルカンを抗原とした抗体(抗CSBG)抗体の測定系をELISAにより樹立し、AAVのカリニ肺炎の予知および宿主の免疫能の指標としての臨床的意義について検討した。図1に示すように抗CSBG抗体の測定系をELISAにより樹立し、 $\beta$ グルカン直鎖 $\beta$ -1、6構造を認識し、 $\beta$ グルカンの競合的抑制試験により特異的免疫反応を確認し得た<sup>6)</sup>。抗CSBG抗体力価は図2に示すように、生体内の自然免疫および獲得免疫として機能していると考えられ、健常人では平均2677Uと高かった。一方、AAVの抗CSBG抗体は健常人に比較して発症未治療活動期に平均691Uと低く、さらに免疫抑制療法後は平均547Uとさらに有意に低下した( $P<0.01$ )。抗CSBG抗体をAAVにおいて経時的に測定すると、免疫抑制療法により血管炎の寛解11例は抗CSBG抗体価は1180Uまで上昇する傾向を示した。一方、AAVで免疫抑制療法中に、カリニ肺炎を併発した3例は抗CSBG抗体が369Uまで急激に低下