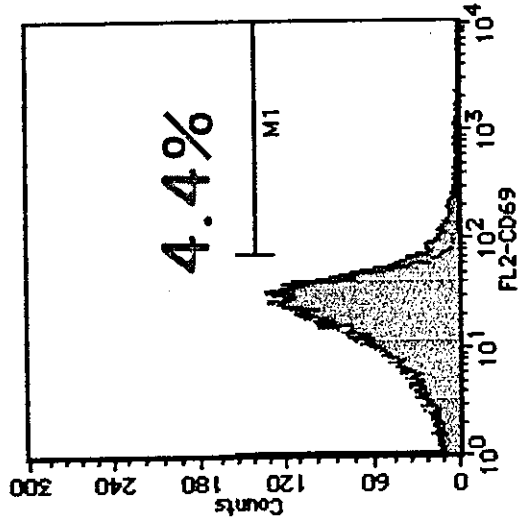
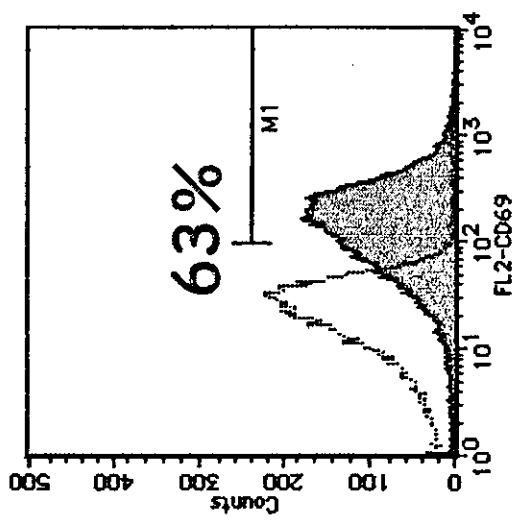
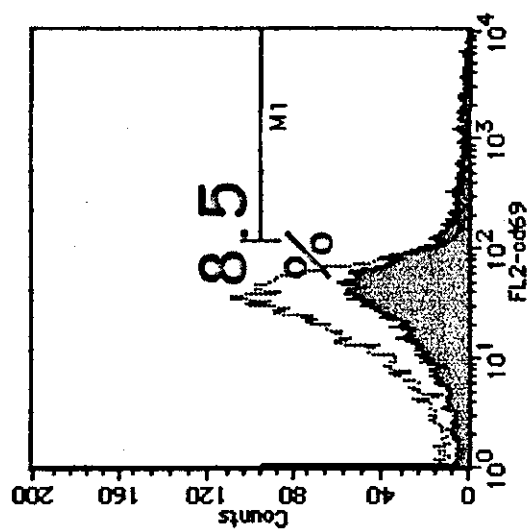
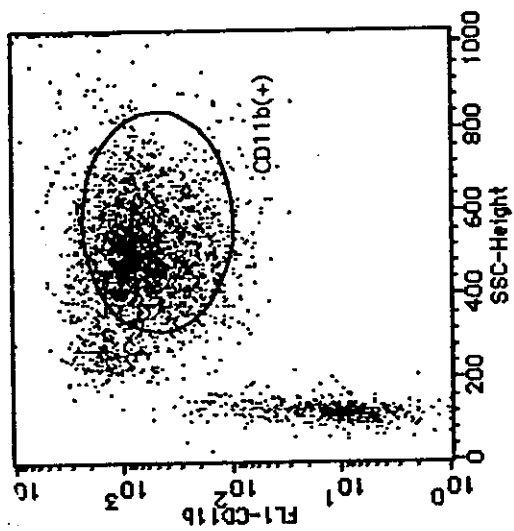
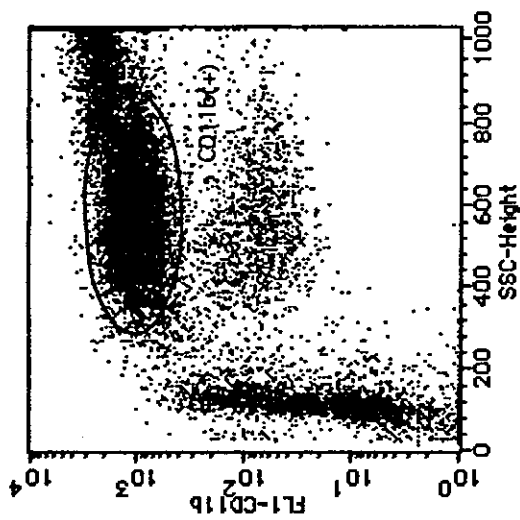
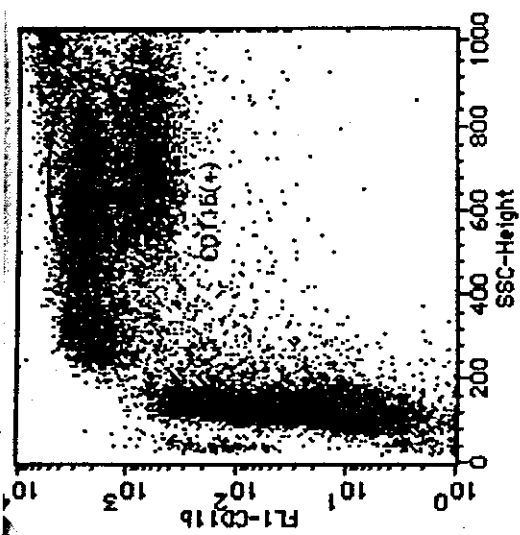


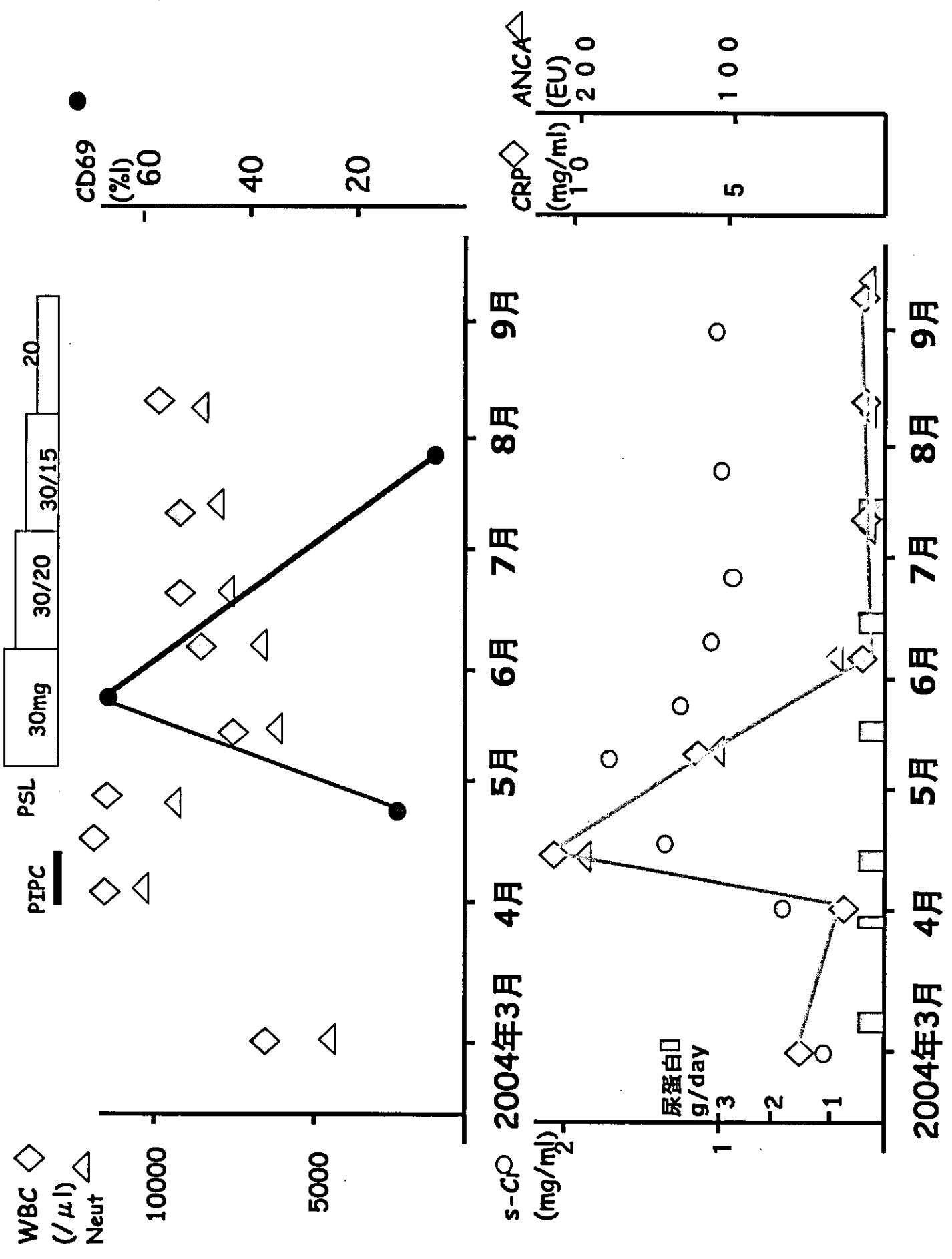
症例1 CD69の推移



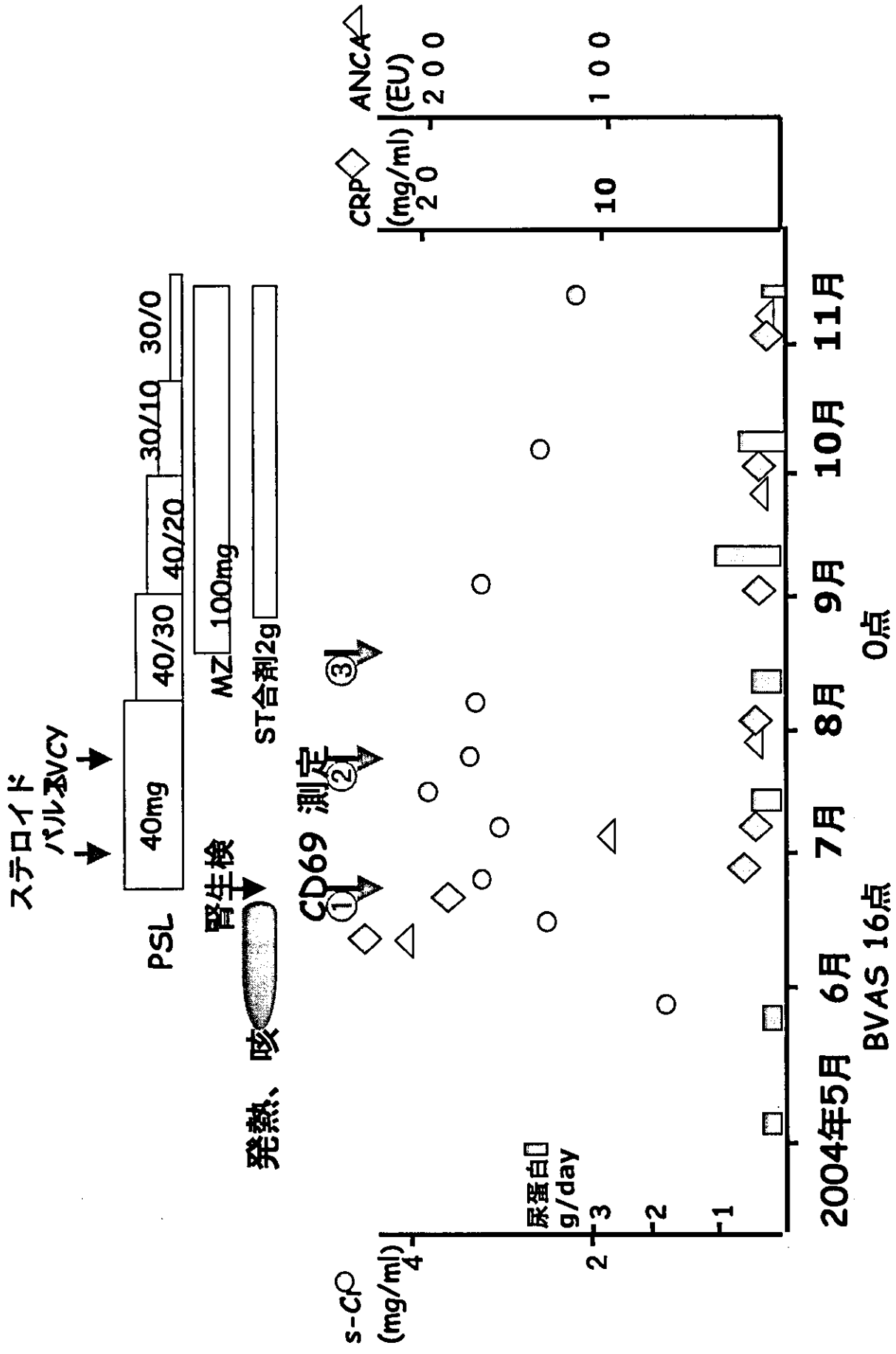
治療前
17日後

治療

治療開始3ヵ月後



症例 2 69歳 女性



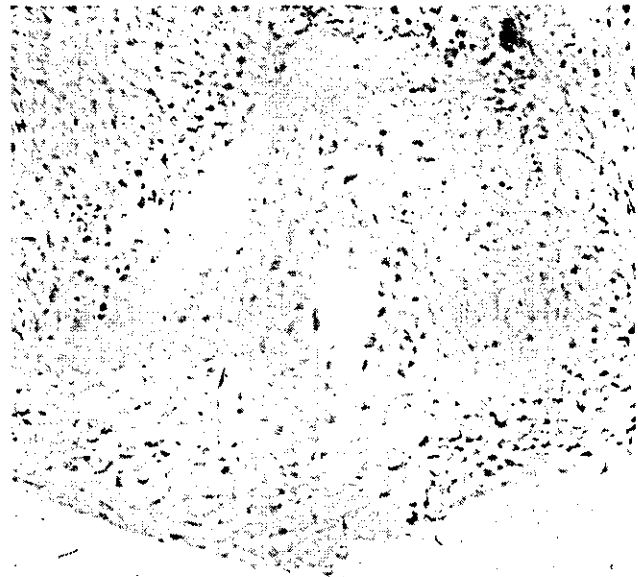
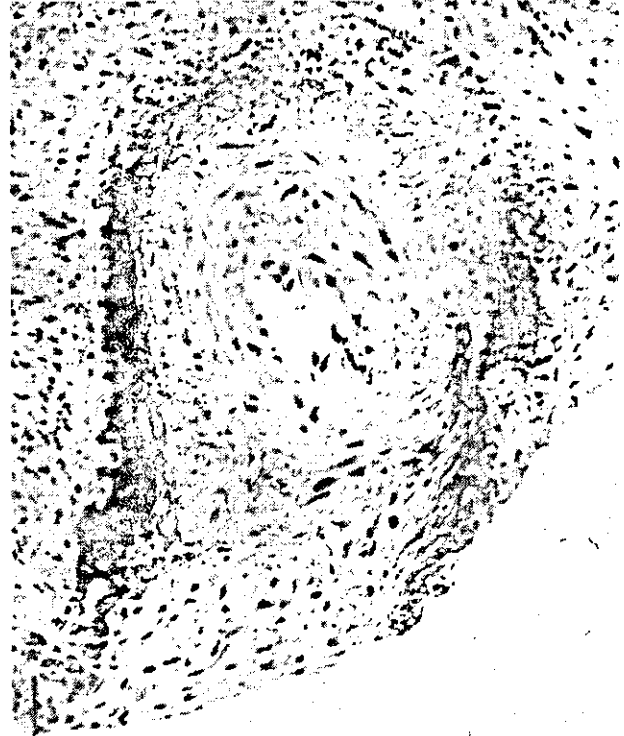
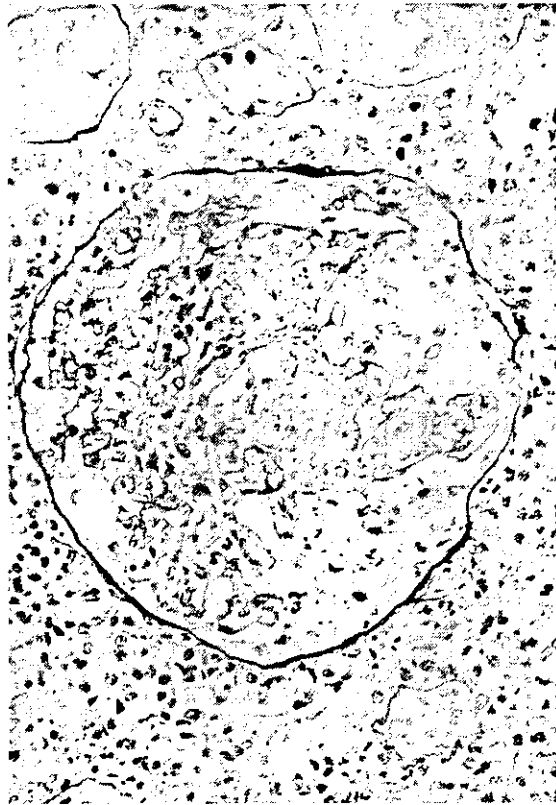
症例2 臨床症候とBVASの経過

	初発時	治療開始1ヵ月後	治療開始2ヶ月後
1)全身症状	発熱(38度):1 体重減少(4kg/月):3	なし	なし
2)皮膚症状	なし	なし	なし
3)粘膜・眼症状	なし	なし	なし
4)耳鼻咽喉頭病変	なし	なし	なし
5)胸部	間質性肺炎:2	なし	なし
6)心血管	なし	なし	なし
7)腹部	なし	なし	なし
8)腎	蛋白尿(0.19g/day) 血尿(RBC 5-9) Cre増加10%以上:12	蛋白尿(1.3g/day) 血尿(RBC 5-9) Cre 3.75mg/dl:0	蛋白尿(0.7g/day) 血尿(RBC 5-9) Cre 3.0mg/dl:0
9)神経系	なし	なし	なし
BVAS	16	0	0

腎生検像

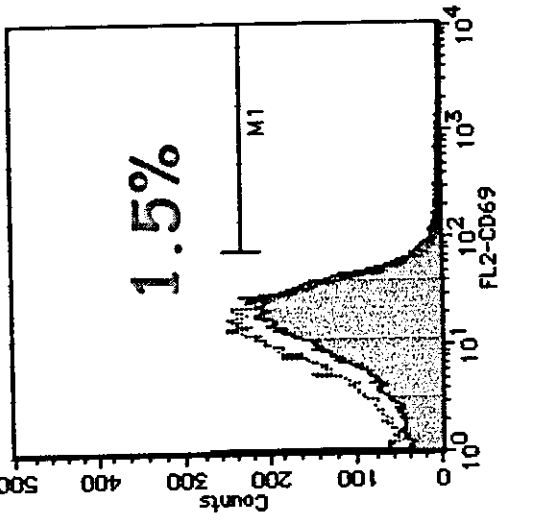
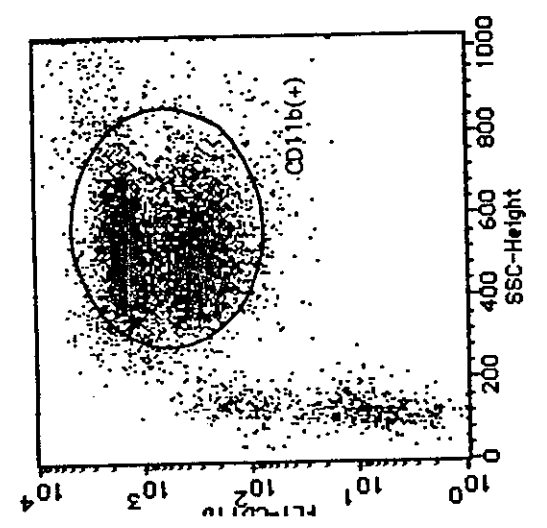
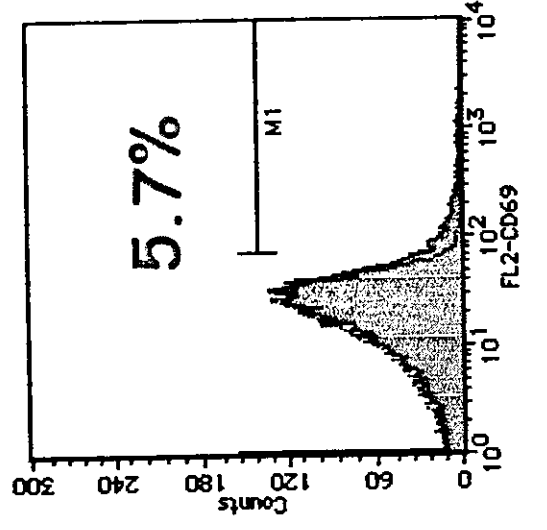
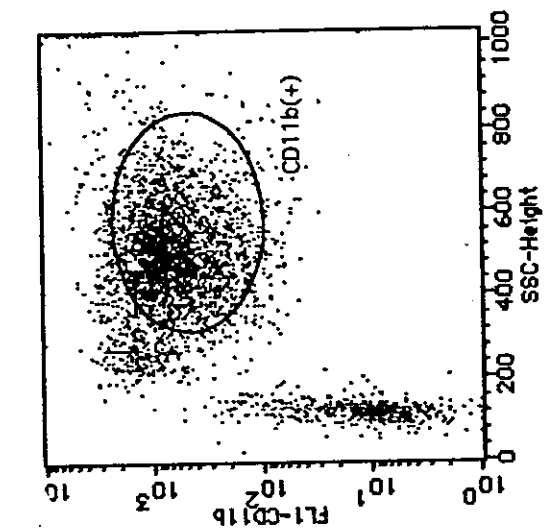
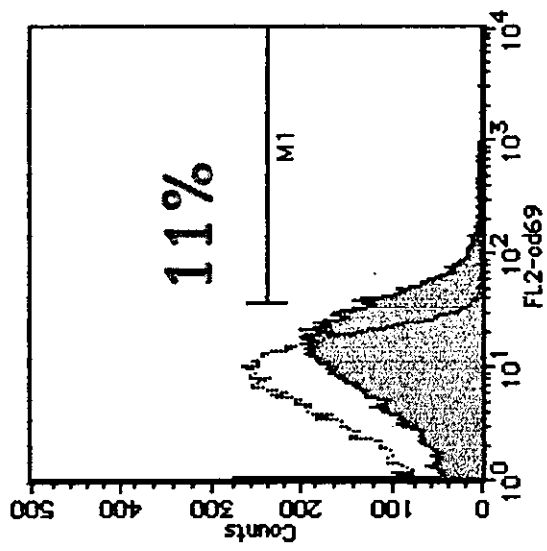
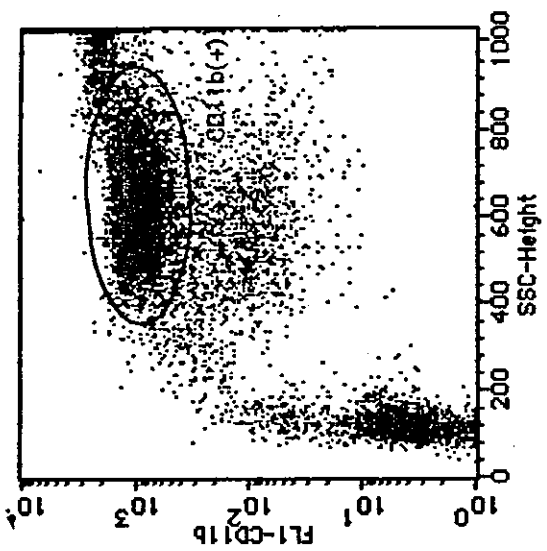


症例 2



小葉間動脈のフィブリノイド壊死

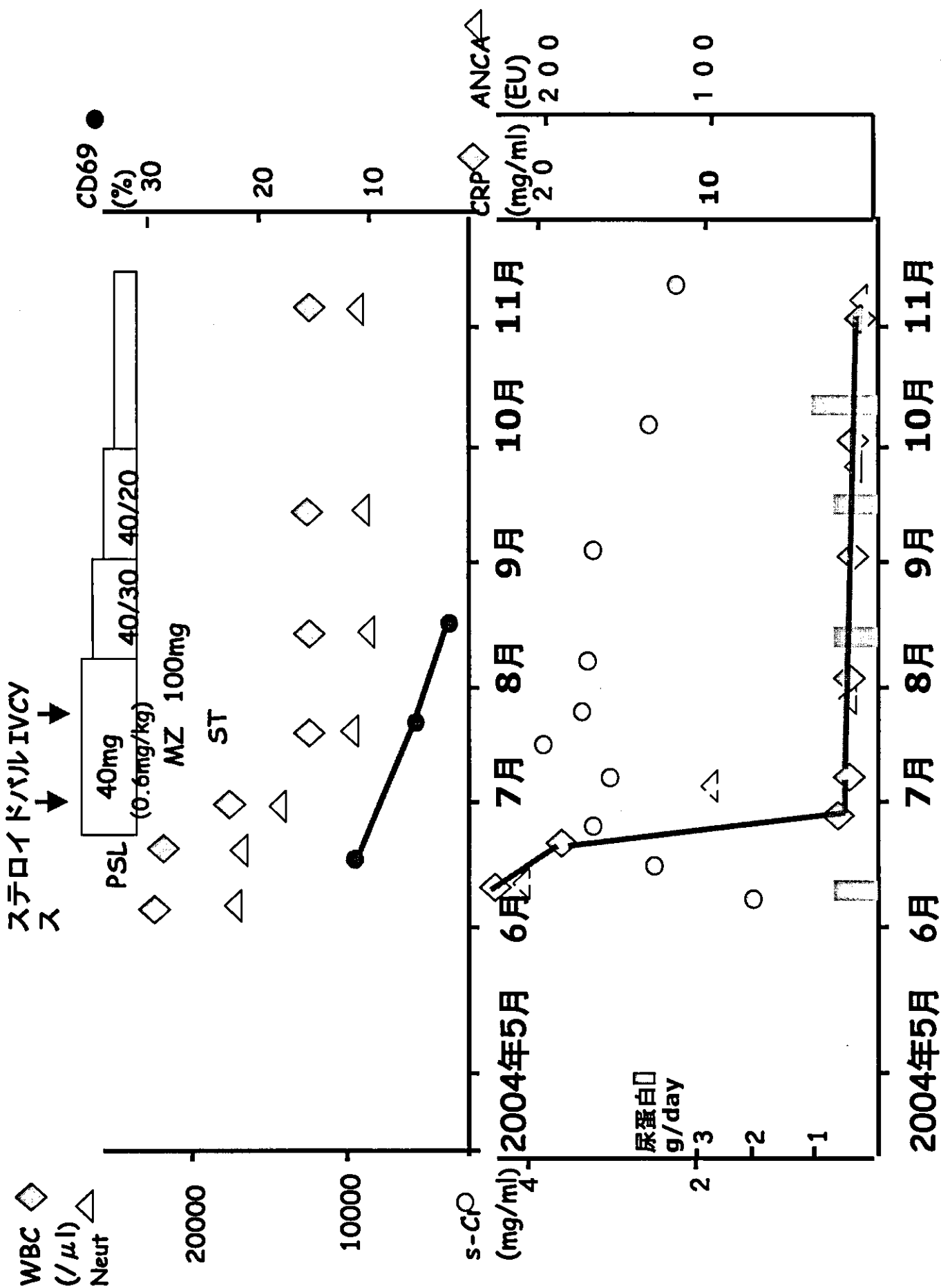
症例2 CD69の推移



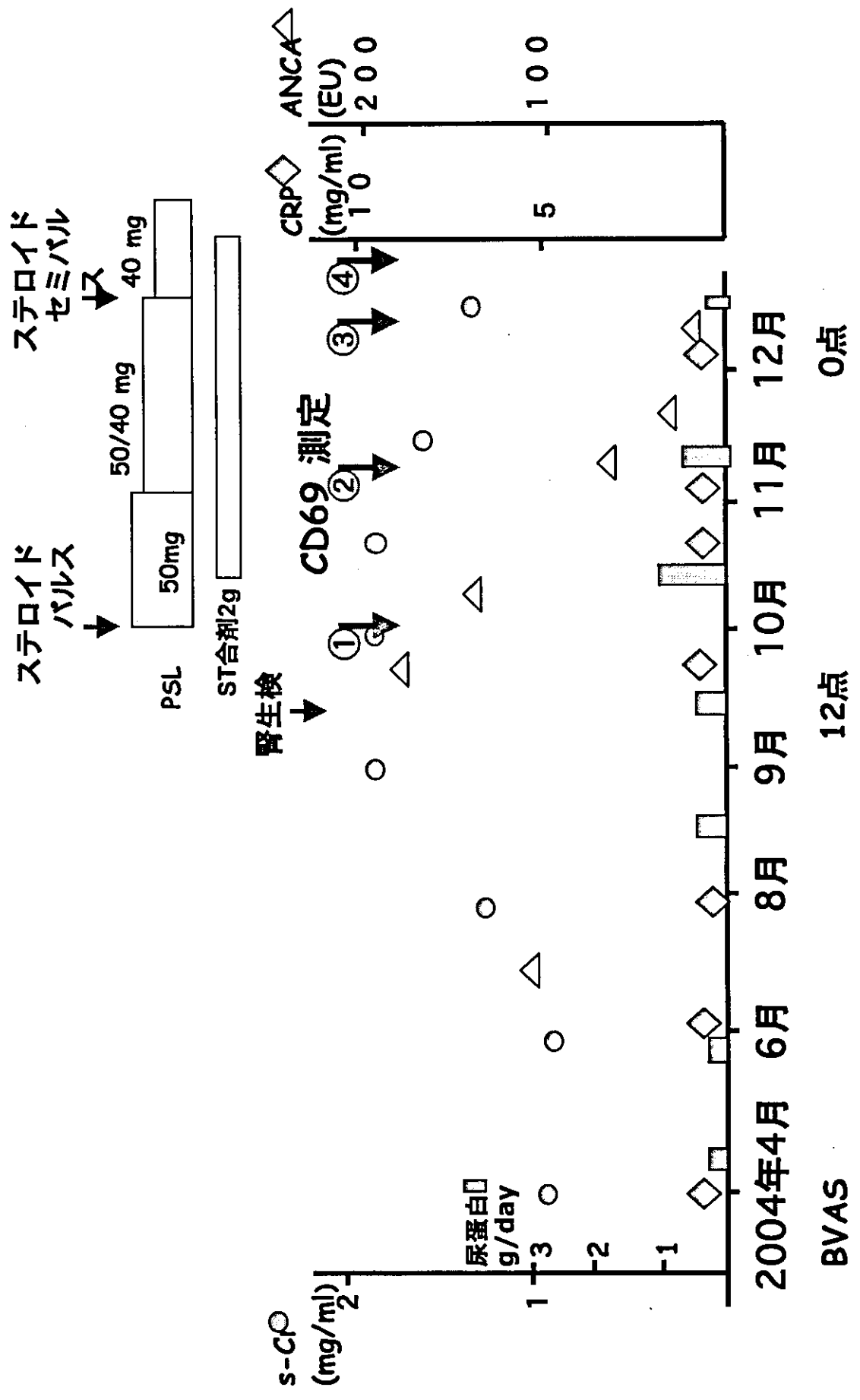
治療前
(8月17日)

1ヵ月後 (7月27日)

2ヵ月後



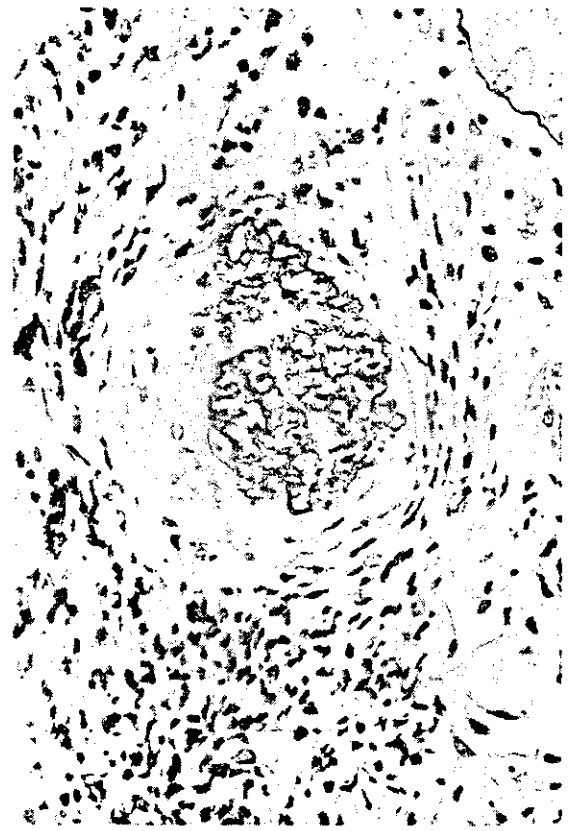
症例 3 60歳 男性

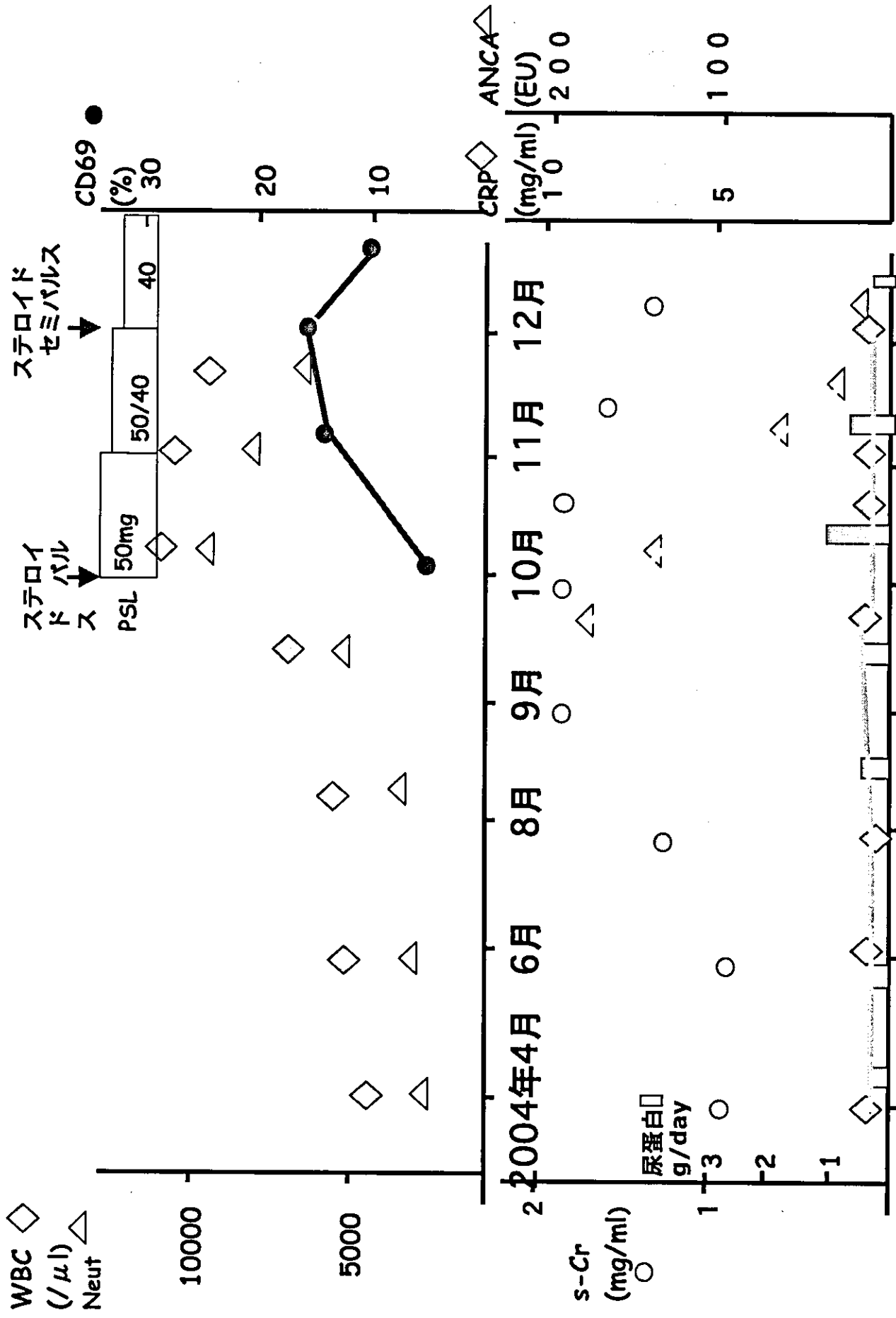


腎生檢像
症例 3



細胞性半月体





2004年4月 6月 8月 9月 10月 11月 12月

まとめ

- 1、ANCA関連血管炎において、CD69⁺好中球の出現を認めた。
- 2、CD69⁺好中球は治療前後で変動したが、その意義は不明であった。
- 3、CD69⁺好中球は全好中球数の推移とは無関係であり、CRPやMPO-ANCAの推移との関連が予想された。
- 4、CD69⁺好中球は好中球の活性化指標になりうる可能性がある。

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

難治性血管炎に関する研究

高安動脈炎における抗内皮細胞抗体の免疫細胞化学的検討

分担研究者 吉田俊治 藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科教授
研究協力者 玉熊桂子 藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科

研究要旨

我々は、抗内皮細胞抗体 (AECA) のうち抗 74KDa 抗体が高安動脈炎患者血清に高率に検出されることを報告してきた。今回、間接蛍光抗体法による免疫細胞化学的検討を試みた。対象は高安動脈炎、膠原病関連疾患、対照として健常人血清を用いた。正常ヒト細胞の human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)、単核球とヒト血球系腫瘍細胞 U937、Jurkat、HL60、K562 を培養し、被検血清を反応させた。2 次抗体を反応させた後、3% Para-formaldehyde で固定し DAPI 核染色を行なった。

高安動脈炎患者血清では細胞膜表面に強い顆粒状の染色像が見られた。膠原病関連疾患でも同様に膜表面に染色像が見られた。そして、HUVEC の染色像と高安動脈炎患者血清に見られる抗 74KDa 抗体陽性患者との間に強い相関が見られた。以上より、高安動脈炎患者血清に細胞膜表面に対する抗体の存在が確認された。

A. 研究目的

抗内皮細胞抗体 (AECA) は、血管炎症候群で抗好中球細胞質抗体 (ANCA) に次いで高率に認められる自己抗体である。昨年度までの検討で、Western blot 法などを用いて、AECA の中で抗 74KDa 抗体が高安動脈炎に高率に検出されることを報告してきた¹⁾⁶⁾。

今回、正常ヒト細胞の human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) をはじめ、単核球とヒト血球系腫瘍細胞を用いて間接蛍光抗体法による免疫細胞化学的検討を試みた。

B. 研究方法

(1) 対象

高安動脈炎 23 例、他の血管炎症候群 4 例、膠原病関連疾患 9 例そして健常人 5 例の血清を用いた。

(2) 細胞培養

HUVEC は、ヒト血管内皮細胞完全増殖培地 HEC-C1 (機能性ペプチド社)、血球系細胞の U937, Jurkat, HL60, K562 は、10% fetal bovine serum (FBS) を添加した DMEM 培地 (SIGMA 社) を用いて 37 度, 5% CO₂ 培養した。

(3) 細胞染色

培養細胞は Collagenase Type 1 (GIBCO 社) で剥離し採取後、2% Normal Donor Goat Serum で Blocking を行ない、各疾患患者と健常人の希釈血清を反応させた。

2次抗体は、Alexa 546 goat anti-human IgG antibody (Molecular Probes 社)を用いて反応させ、洗浄を経た後、Optilyse B (Immunotech 社)で細胞を固定した。その後、DAPI/H₂Oにて反応停止、核染色を行なった。

C. 研究結果

単核球や血球系腫瘍細胞のU937, Jurkat, HL60, K562細胞では、高安動脈炎に限らず、他の血管炎症候群、膠原病関連疾患でも染色され、その染色像に大きな違いはなかった。

HUVECでは、高安動脈炎や他の血管炎症候群、膠原病関連疾患で幅広い染色像が見られた。且つ、高安動脈炎患者の抗74kDa抗体の有無を見ると、同抗体陽性患者血清では膜表面に強い染色像が見られ(図1)、陰性患者血清には膜表面に染色が見られなかった(図2)。そこで、HUVECに注目し、疾患ごとに検討を行なうこととした。まず、細胞膜表面の染色具合をスコア化した。(-)は、核だけが染まり、細胞膜表面は全く染まっていないもの、(+)は、膜表面が薄くモヤがかかった程度や数個の顆粒状に染まった程度のもの、(2+)は、膜表面が明らかに染まっているもの、(3+)は、膜表面がかなり強く染まっている程度のものとした。HUVECを用いると、高安動脈炎患者の抗74kDa抗体の有無と本法によるスコアとは高い相関が見られた(図3)。

D. 考察、結論

種々の細胞を用いて、抗内皮細胞抗体を間接蛍光抗体法で検討し、細胞膜表面上に染色像を確認できた。高安動脈炎患者血清では、細胞膜表面にモヤ状や顆粒

状など幅広い染色像が見られた。他の血管炎症候群や膠原病関連疾患でも、種々の頻度と程度で膜表面に染色像が見られた。しかしHUVECでは抗74kDa抗体陽性血清で輝度の強い広範囲な染色像が見られ、本抗体の対応抗原が大量に表出していることが推測された。今後、HUVECを用いて、引き続き対応抗原の同定を進めていきたい。

E. 参考文献

1. 吉田俊治、片山雅夫、水谷昭衛、大島久二、鳥飼勝隆：高安動脈炎における抗内皮細胞抗体の検討。厚生省特定疾患免疫疾患調査研究班難治性血管炎に関する調査研究班平成10年度研究報告書、1999；118-121.
2. 吉田俊治、片山雅夫、深谷修作、大島久二、鳥飼勝隆：血管炎症候群における抗内皮細胞抗体(抗74kDa蛋白抗体)に関する検討。厚生省厚生科学特定疾患対策研究事業難治性血管炎に関する調査研究班平成11年度研究報告書、2000；107-109.
3. 吉田俊治、田口博章、鳥飼勝隆：高安動脈炎における抗内皮細胞抗体(抗74kDa抗体)の対応抗原の分析。厚生科学研究研究費補助金特定疾患対策研究事業難治性血管炎に関する調査研究平成12年度総括研究報告書、2001；134-136.
4. 吉田俊治、田口博章、吉田秀雄、玉熊桂子、片山雅夫、深谷修作：高安動脈炎における抗内皮細胞抗体(抗74kDa抗体)の対応抗原の同定。厚

生科学研究研究費補助金特定疾患対策研究事業難治性血管炎に関する調査研究平成 13 年度研究報告書、2002 ; 232-234.

5. 吉田俊治、田口博章、玉熊桂子：高安動脈炎における抗 heat shock protein 抗体の検討。厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業難治性血管炎に関する調査研究平成 14 年度総括・分担研究報告書、2003 ; 42-44.
6. 吉田俊治、田口博章、玉熊桂子：高安動脈炎における抗 heat shock protein 70B' 抗体の検討。厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業難治性血管炎に関する調査研究平成 15 年度総括・分担研究報告書、2004 ; 77-81 .

F. 研究発表

論文発表

1. 片山雅夫、吉田俊治：副腎皮質ステロイド薬。Current Therapy、22:23-27,2004.
2. 吉田秀雄、吉田俊治：シェーグレン症候群に伴う関節病変。シェーグレン症候群への strategy、4:10-12,2004
3. 深谷修作、小松八千代、吉田俊治：膠原病/血管炎に伴う肺高血圧症。Heart View、8:747-746,2004.
4. 加藤賢一、吉田俊治：ステロイド剤の一般療法とパルス療法。臨床と研究、81:743-746,2004.
5. 吉田俊治：MCTD に合併する肺高血圧

症。リウマチ科、31:600-605,2004.

6. 楠木淳一、桑名正隆、吉田俊治、他：SLE・SLE 疑診例におけるループスアンチコアグラント測定の臨床的意義。日本医事新報、4208:25-28,2004.
7. 高田裕子、吉田俊治：中毒・アレルギー・炎症性浮腫。日本臨床、63:113-116,2005.
8. 吉田秀雄、吉田俊治：関節リウマチの爪／皮膚病変。日本臨床増刊号 1、63:225-228,2005.
9. 加藤浩二、大竹智子、浅野純一郎、西野 譲、吉田俊治：関節リウマチの全人的医療。日本臨床増刊号 1、63:641-643,2005.
10. 吉田俊治：肺高血圧症。リウマチ／膠原病診療チェックリスト、三森経世編、文光堂、72-74,2004.

学会発表

1. 吉田俊治：関節リウマチに対する早期薬物療法の重要性。第 32 回日本臨床免疫学会総会ランチョン教育講演、東京、2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記事項なし。
2. 実用新案登録
特記事項なし。
3. その他
特記事項なし。

図1 HUVECを用いた高安動脈炎患者血清の抗内皮細胞抗体
-----抗 74Kda 抗体陽性血清-----

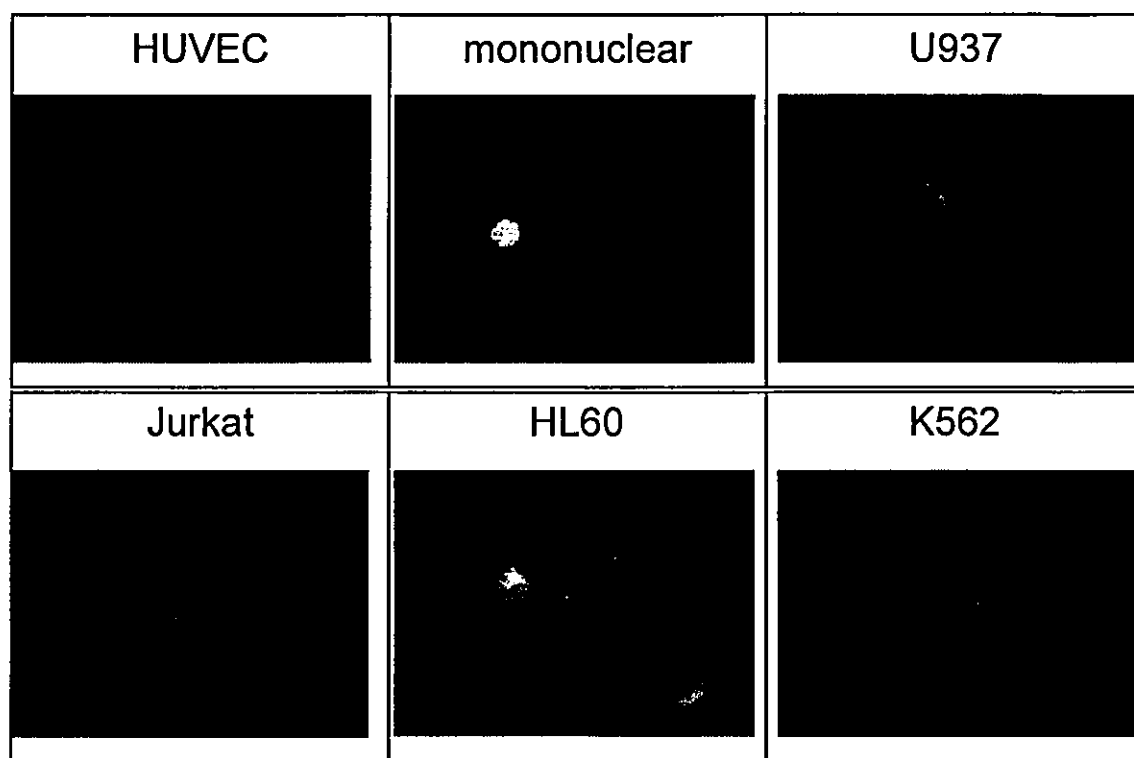


図2 HUVECを用いた高安動脈炎患者血清の抗内皮細胞抗体
-----抗 74Kda 抗体陰性血清-----

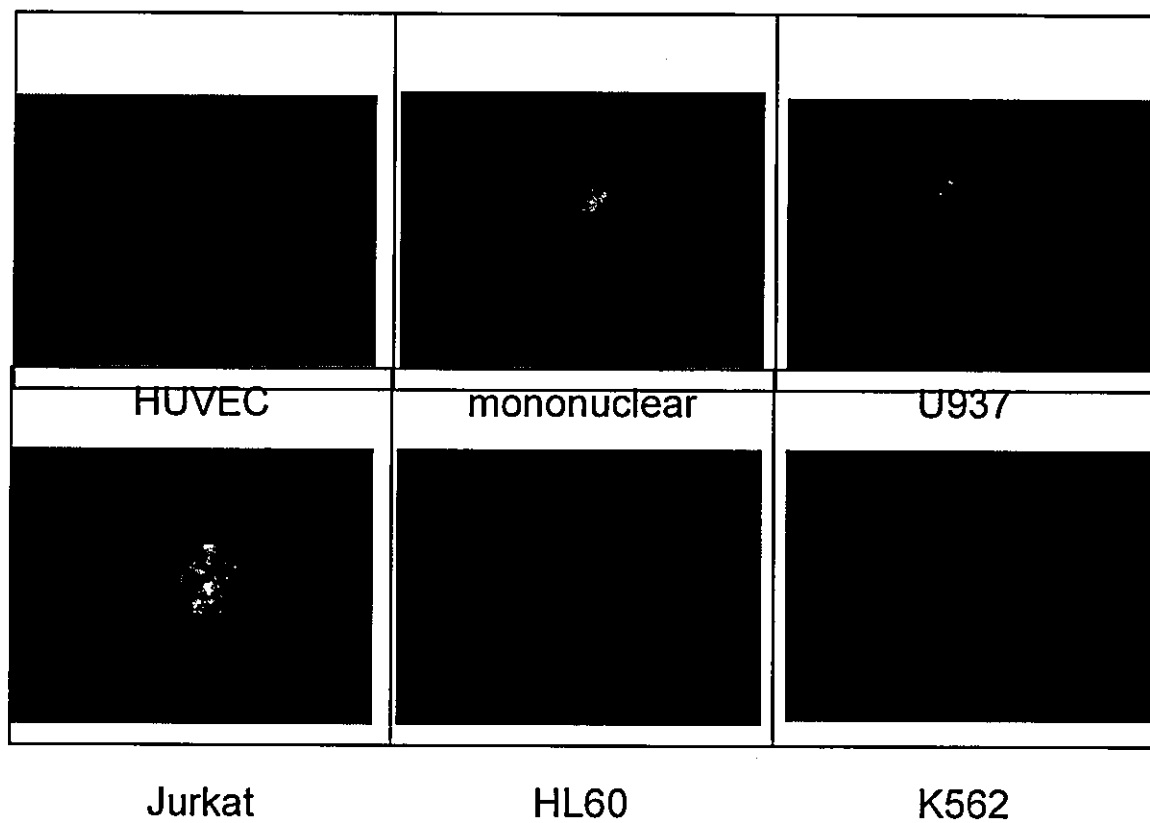
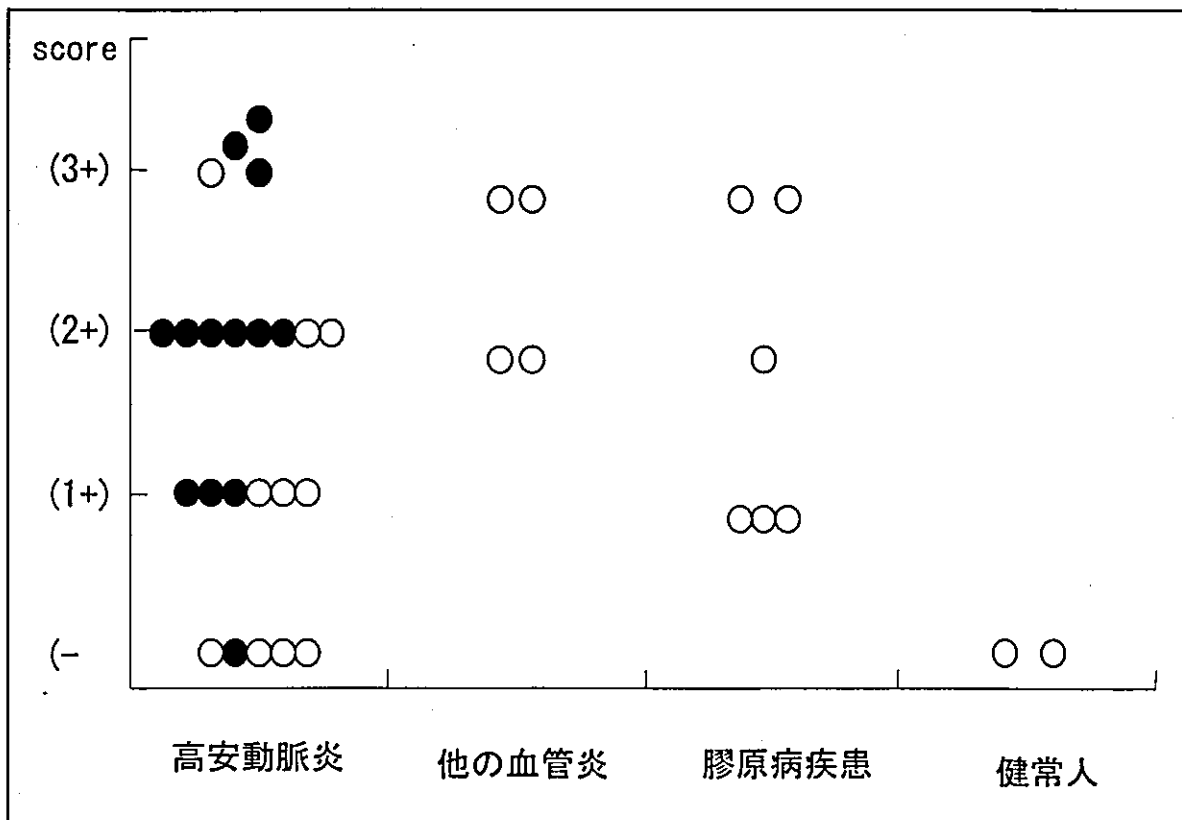


図3 HUVECを用いた抗内皮細胞抗体のスコアと抗74Kda抗体との関連
 (黒丸：抗74Kda抗体陽性、白丸：抗74Kda抗体陰性)



Immunocytochemical examination of anti-endothelial cell antibodies for Takayasu arteritis

Shunji Yoshida (Fujita Health University School of Medicine, Department of Internal Medicine)

Keiko Tamakuma (Fujita Health University School of Medicine, Department of Internal Medicine)

We have been reporting that among all anti-endothelial cell antibodies (AECA), anti-74KDa antibodies are detected at a high rate in blood serum collected from patients with Takayasu arteritis. In this report, we attempted to examine AECA immunocytochemically by means of the indirect immunofluorescent antibody method. Blood serum collected from patients with Takayasu arteritis and connective tissue diseases, and for a control, serum from healthy people were used. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), mononuclear leukocyte, human hemocyte tumour cells such as U937, Jurkat, HL60, and K562 were cultured, which was then put to reaction with the test serum. After the reaction of the secondary antibodies was performed, it was fixed with 3% para-formaldehyde and a DAPI nuclear stain was performed.

With serum collected from patients with Takayasu arteritis, a strong granular stain image was observed on the surface of the cell membrane. Likewise, a stain image was observed on the membrane surface with serum from connective tissue diseases. Moreover, there was a strong correlation between the intensity of the stain of HUVEC and the anti-74KDa antibody positive found in blood serum collected from patients with Takayasu arteritis. From the above, the existence of antibodies against the cell membrane surface was confirmed in serum collected from patients with Takayasu arteritis.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

難治性血管炎に関する調査研究

分担研究報告書

ANCA 関連血管炎及びアスペルギルス感染症の標的治療として ST 合剤は有用である

分担研究者 吉田雅治¹、中林巖¹、明石真和¹、吉川憲子¹、渡邊妙子¹、高良洋平¹、
畔蒜祐一郎²、江原 美里²、飛田俊介²、石橋健一²、大野尚仁²

東京医科大学八王子医療センター 腎臓内科、¹東京薬科大学薬学部免疫学教室²

研究要旨

ANCA 関連血管炎 (AAV) の重篤な合併症であるアスペルギルス感染症 (ASP) の予知、ST 合剤の標的治療について明らかにする事を目的とした。アスペルギルス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 ASBG 抗体) を、ELISA により樹立し測定した。ST 合剤の抗 *Aspergillus* (A) 活性を測定するために、天然培地に SMX-TMP 5:1 混和物を添加し、A を植菌し、コロニーサイズを測定し、ST 合剤の作用を観察した。剖検にて肺、脳の深在性アスペルギルス (Asp) 感染症を認めた MPO-ANCA 関連血管炎症例に標的治療として ST 合剤を投与した臨床経過について解析した。抗 ASBG 抗体は AAV の ASP 併発時に BG の上昇に加え抗 ASBG 抗体は有意に低下し ($P < 0.01$)、ST 合剤を含めた抗真菌療法により ASP 感染が回復すると抗 ASBG 抗体は速やかに上昇した。A は ST 合剤の濃度依存的にコロニーサイズが減少し、ST 合剤のサルファ剤に抗真菌活性があることが示された。MPO-ANCA 関連血管炎例の臨床経過の解析より、ST 合剤の単独治療のみで MPO-ANCA が低下し、透析離脱を認め、投与されていた ST 合剤が血管炎の活動性及び潜在的な ASP 感染の活動も抑制していた可能性が示唆された。ST 合剤が細菌だけでなく、真菌の予防投与としても利用できる可能性が示唆され、AAV に対する ST 合剤は血管炎に対する免疫抑制療法及び ASP の標的治療一つとして有効と考えられた。

A. 研究目的

本研究は 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アスペルギルス感染症 (ASP) の予知、ST 合剤の標的治療の意義について明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

アスペルギルス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 ASBG 抗体) を、ELISA により樹立し、健常人 22 名、AAV 40 名 (ASP 5 名を含む) を測定した。

ST 合剤の抗 *Aspergillus* 活性を測定するために、天然培地である Potato dextrose agar(PDA)に SMX-TMP 5:1 混和物を添加し、Plate 中央に *A.fumigatus*, *A.niger*, *A.oryzae* を植菌し、1 W, 27°Cにて培養後、ジャイアントコロニーサイズを測定し、ST 合剤未添加のコロニーサイズを 100% として、ST 合剤の作用を観察した。剖検にて肺、脳の深在性アスペルギルス(Asp) 感染症を認めた MPO-ANCA 関連血管炎症例に標的治療として ST 合剤を投与した経過について解析した。

C. 研究結果

1. 抗 ASBG 抗体は健常人 22 名が 2677 ± 1686 U に比較し、未治療期 AAV40 名は 691 ± 522 U と有意に低値を示した ($P < 0.01$)。 (Fig 1) 抗 ASBG 抗体を経時的に測定すると ASP を併発しない AAV 寛解例は全例上昇するのに比較し、ASP 併発時には BG の上昇に加え抗 ASBG 抗体は 369 ± 441 U と有意に低下し ($P < 0.01$)、ST 合剤を含めた抗真菌療法によりが ASP 感染が回復すると抗 ASBG 抗体は速やかに上昇した。

2. *A.fumigatus*, *A.oryza*, *A.nigare* は ST 合剤 (Fig 2) の濃度依存的にコロニーサイズが減少した。 (Fig. 3) 一方、病原性真菌である *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* でも同様の実験を行なったが、*C.albicans*, *A.parapsilosis* ともに抑制はされなかった。

3. MPO-ANCA 関連血管炎の臨床経過：80 歳男性、農夫。平成 14 年 1 月、上気道感染後、下腿浮腫出現し、平成 15 年 1 月、

MPO-ANCA 253EU、血清クレアチニン値 (S-Cr) が 6.7mg/dl となり、血液透析(HD) 導入となる。全身性血管炎の診断にて当院へ転院となったが、 β -D glucan は 2 月に 38.1pg/ml、MPO-ANCA も 285EU と上昇し、ST 合剤の投与を開始した。3 月下旬には MPO-ANCA 130EU、 β -D glucan 7.7pg/ml と両者ともに改善し、ステロイドや免疫抑制剤などを投与することなく透析を一時離脱しえた。5 月中旬頃から呼吸障害や意識障害を認め脳血管炎の進行と考え、メチルプレドニゾン 1g のパルス療法を施行したが、肺うっ血、肺炎像が出現し、CRP は 6.7mg/dl まで上昇。急性呼吸不全、急性循環不全となり、集中治療室にて気管内挿管による呼吸管理、感染症治療、持続血液濾過透析、ステロイド投与にて改善を認めるも、頭部 CT にて広範囲な脳梗塞像を認め、多量の肺胞出血を認め肺血管炎による出血と考え、血漿交換療法を施行したが呼吸不全の進行が著しく第 49 病日に死亡された。【剖検所見】 脳の一部に血管炎を疑わせる細胞浸潤、皮質下壊死像を認め。ほぼすべての肺組織に A S P 肺炎像を認め、一部には血管壁への浸潤像を認めた。腎ではほぼ diffuse に繊維性半月体を有する糸球体と硬化糸球体を認め。胆嚢に血管炎所見を認めた。(Fig 4)

D. 考察

ST 合剤はグラム陽性、陰性菌など、広い抗菌スペクトルを持つ薬剤である。(Fig 2) 今回の検討から、ST 合剤のサルファ剤に抗真菌活性があることが示された。(Fig. 3) ST 合剤が細菌だけでなく、真菌の予防投与としても利用できる可能