

特集

血管炎の診療に役立つ新たな知見

ANCA関連血管炎の評価法においてBVASの意義と問題点*

伊藤千春**
湯村和子**

Key Words : ANCA-associated vasculitis, Birmingham vasculitis activity score, rapidly progressive glomerulonephritis, microscopic polyangiitis, MPO-ANCA

緒言

ANCA関連血管炎(AAV)はこれまで難治性疾患として考えられてきたが, 疾患啓蒙による早期発見, 早期治療, 治療法の改善により, 臓器および生命予後が改善されている。AAVにおいては, 多臓器に病変が及ぶこと, 再発例がみられるなど, 時間空間的に病像が変化し, その疾患多様性を示唆する報告については枚挙に暇がない。一方, それぞれの症例における血管炎の急性, 慢性活動性評価については, 臨床所見や検査所見に基づいた臨床医の判断に委ねられ, 日常臨床において一定のルールに基づいた指標において総合評価される機会は少ない。

本稿においては, Birmingham vasculitis activity score (BVAS)を主軸に, これまで報告されてきた血管炎活動性評価法の変遷, 血管炎活動性評価の意義について, 今後期待される役割や, その使用に際しての問題点を交えながら, 述べる。

血管炎活動性評価法の変遷

血管炎は文字通り, 全身の血管に障害をきたしうる疾患であり, あらゆる臓器について病変

の有無を検索する必要がある。発症初期段階において, ある臓器の障害を見逃すことになれば, 臓器機能不全に陥る可能性もある。腎障害の発見が遅れることで, 維持透析導入に至ることも少なくない¹⁾。逆に言えば, 全身の臓器障害の評価を早期に適切に行うことで, その後の疾病管理がしやすくなる可能性が高い。血管炎活動性評価は, 典型的臨床像を呈する例だけではなく, 非典型的な経過を辿る症例においてもその病像把握に有用と考えられる。

血管炎の活動性評価は1988年にGuillevinらが, 年齢, 腹部症状などの有無により, 生命予後評価を行ったことに端を発する²⁾。その後, 臨床項目として, 蛋白尿のほか, 腎機能, 心, 消化管, 中枢神経の障害の5項目(five factor score; FFS)が設定され, 予後予測に有用とされている^{3,4)}。項目の少なさゆえ, 簡便であるが, 正確性に欠けるという欠点があった。一方, Groningen indexは, 1990年にWegener肉芽腫(WG)に対して設定された指標である。疾患特異的であり, その包括的, 細目にわたる評価が, 診断には有用とされてきた。しかしながら, やや煩雑であり, 連続的な評価には向いていない⁵⁾。同じくWGの指標とされるdisease extent index (DEI)は, 11項目によって疾患活動性, 臓器障害度を評価する指標で, 長期予後によく反映するとされる⁶⁾。また, 全身性血管炎研究国際ネットワークが2001

* Birmingham vasculitis activity score as a tool for evaluating activity of ANCA-associated vasculitis.

** Chiharu ITO, M.D., Ph.D. & Wako YUMURA, M.D., Ph.D.: 自治医科大学腎臓内科 [〒329-0498 下野市葉師寺3311-1]; Division of Nephrology, Department of Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke 329-0498, JAPAN

表1 BVAS2003

	なし	活動性 病変		なし	活動性 病変
1. 一般状態	<input type="checkbox"/>		6. 心血管	<input type="checkbox"/>	
筋肉痛		<input type="radio"/>	脈の欠如		<input type="radio"/>
関節痛あるいは関節炎		<input type="radio"/>	弁膜疾患		<input type="radio"/>
38.0℃以上の発熱		<input type="radio"/>	心外膜炎		<input type="radio"/>
2 kg以上の体重減少		<input type="radio"/>	虚血性の胸痛		<input type="radio"/>
2. 皮膚	<input type="checkbox"/>		心筋症		<input type="radio"/>
梗塞		<input type="radio"/>	うっ血性心不全		<input type="radio"/>
紫斑		<input type="radio"/>	7. 腹部	<input type="checkbox"/>	
潰瘍		<input type="radio"/>	腹膜炎		<input type="radio"/>
壊疽		<input type="radio"/>	血性下痢便		<input type="radio"/>
他の皮膚血管炎		<input type="radio"/>	虚血性の腹痛		<input type="radio"/>
3. 粘膜/眼	<input type="checkbox"/>		8. 腎	<input type="checkbox"/>	
口腔潰瘍/肉芽腫		<input type="radio"/>	高血圧		<input type="radio"/>
陰部潰瘍		<input type="radio"/>	蛋白尿>1+		<input type="radio"/>
付属器炎		<input type="radio"/>	血尿>10rbc/hpf		<input type="radio"/>
著明な眼球突出		<input type="radio"/>	血清クレアチニン125~249μmol/l		<input type="radio"/>
上強膜炎		<input type="radio"/>	血清クレアチニン250~499μmol/l		<input type="radio"/>
結膜炎/眼瞼炎/角膜炎		<input type="radio"/>	血清クレアチニン≥500μmol/l		<input type="radio"/>
霧眼		<input type="radio"/>	30%超の血清クレアチニン値の上昇あるいは		<input type="radio"/>
突然の視力喪失		<input type="radio"/>	25%超のクレアチニンクリアランスの低下		<input type="radio"/>
ぶどう膜炎		<input type="radio"/>	9. 神経	<input type="checkbox"/>	
網膜血管炎/網膜血栓/網膜滲出/網膜出血		<input type="radio"/>	頭痛		<input type="radio"/>
4. 耳鼻咽喉	<input type="checkbox"/>		髄膜炎		<input type="radio"/>
血性鼻汁/鼻垢/潰瘍かつ/または肉芽腫		<input type="radio"/>	器質性病変に基づく認知障害		<input type="radio"/>
副鼻腔病変		<input type="radio"/>	痙攣(高血圧性脳症ではない)		<input type="radio"/>
声門下狭窄		<input type="radio"/>	脳卒中		<input type="radio"/>
伝音性難聴		<input type="radio"/>	脊髄病変		<input type="radio"/>
感音性難聴		<input type="radio"/>	脳神経麻痺		<input type="radio"/>
5. 胸部	<input type="checkbox"/>		感覚末梢神経障害		<input type="radio"/>
喘鳴		<input type="radio"/>	運動性多発単神経炎		<input type="radio"/>
結節または空洞		<input type="radio"/>	10. その他	<input type="checkbox"/>	
胸水貯留/胸膜炎		<input type="radio"/>	持続性血管炎病態限定		<input type="checkbox"/>
浸潤影		<input type="radio"/>	上記のすべての症候が、新規/悪化ではなく、		<input type="checkbox"/>
気管支内病変		<input type="radio"/>	低侵襲/断続性のときのみチェック		<input type="checkbox"/>
多量の血痰/肺膿出血		<input type="radio"/>			
呼吸不全		<input type="radio"/>			

二: 病変が活動性病態によると考えられる場合のみ、チェックする(慢性障害と考えられる場合はvasculitis damage index (VDI)を使用する)。臓器に異常がない場合は、それぞれの臓器項目の「なし」にチェックする。○: 記録されているすべての病変が、くすぶり型/低侵襲型/断続型で、新規/悪化の症候がない場合は、右下端の四角にチェックする。

年にBVASをWG向けに改訂し(BVAS/WG)使用されてきたが、WGに限定的で一般的な血管炎には応用できないため、普及されていない⁷⁾。

ボルチモアのグループがvisual analogue scaleを用いたvasculitis activity index (VAI)を1999年に提唱したが、バイアスの影響が大きく、汎用されていない⁸⁾。一方、BVASは、1994年にLuqmaniらによって発表され、今日もっとも使用

される頻度の高い指標である⁹⁾。BVASは血管炎の主要症候に基づいて評価項目が設定されており、簡便で実用的な指標といっていだろう。後述するように、治療決定、血管炎のスクリーニング、臨床試験での評価に使用できるとされる。BVASのオリジナル版は、1997年にEuropean vasculitis study group (EUVAS)によって改訂され¹⁰⁾、さらに、BVAS2003として改正されている

表 2-a BVAS2003加点表および注釈(一部改)(1)

		BVAS 持続	BVAS 新規/悪化
1. 一般状態	最大点数	2	3
筋肉痛	筋肉の痛み	1	1
関節痛あるいは関節炎	関節の痛みあるいは関節炎	1	1
38.0℃以上の発熱	口腔/腋窩での測定, 直腸温では0.5℃上昇	2	2
2 kg以上の体重減少	食事制限によらない, 前回測定時あるいは4週間以内に比較して2 kg以上の体重減少(脱水ではない)	2	2
2. 皮膚	最大点数	3	6
梗塞	組織壊死あるいは線状出血	1	2
紫斑	点状出血(小赤色斑点), 触知できる紫斑, 皮膚出血斑, 粘膜内出血(外傷ではない)	1	2
潰瘍	皮膚表面の開放有病性病変	1	4
壊疽	高度の組織壊死(手指など)	2	6
他の皮膚血管炎	網状皮斑, 皮下結節, 結節性紅斑など	1	2
3. 粘膜/眼	最大点数	3	6
口腔潰瘍/肉芽腫	アフタ性口内炎, 深部潰瘍かつ/または蕁状の歯肉肥厚, ただしSLEと感染を除外する	1	2
陰部潰瘍	外陰, 会陰部の潰瘍, ただし感染を除外する	1	1
付属器炎	唾液腺(食後の広範軟性腫脹ではない)あるいは涙腺炎, 感染などの他の要因を除外する, 専門医の診断が必要	2	4
著明な眼球突出	眼窩内の著明な炎症による眼球突出, 片側なら健側と比べ2 mmの差があること, 外眼筋炎による複視も合併することあり, 進行性の近視も眼球突出の徴候である(最高視力で評価)	2	4
上強膜炎	強膜の炎症(専門医の診断が必要), 羞明も前兆となる	1	2
結膜炎/眼瞼炎/角膜炎	結膜の炎症(感染を除外, 同じく充血の原因となる, ぶどう膜炎を除外, 乾燥性結膜炎は活動性血管炎の症候ではないので除外)(専門医の判断は通常必要ない)/眼瞼の炎症, 他の要因(外傷, 感染)を除外, 専門医の判断は必要ない/専門医の診断による, 中心部または周辺部角膜炎の炎症	1	1
霧視	以前あるいは基準となる視力を基に, 最高視力を改めて測定, より精密な検査には専門医の診察が必要	2	3
突然の視力喪失	眼科医の診察が必要な, 突然の視力喪失		6
ぶどう膜炎	眼科医によって確認される, ぶどう膜(虹彩, 毛様体, 脈絡膜)の炎症	2	6
網膜血管炎	専門医の診察または蛍光眼底造影で確認される網膜血管鞘形成		
網膜血栓	網膜動静脈血管閉塞	2	6
網膜滲出	眼底検査によって観察される, 網膜軟性斑(硬性斑は除外)		
網膜出血	眼底検査によって観察される, 網膜出血	2	6
4. 耳鼻咽喉	最大点数	3	6
血性鼻汁/鼻垢/潰瘍かつ/または肉芽腫	血性, 粘液膿性, 鼻汁/鼻閉をきたす, 淡明あるいは, こげ茶色の鼻垢/鼻鏡によって観察される鼻の潰瘍かつ/または肉芽腫	3	6
副鼻腔病変	画像所見(CT, MRI, X線)において異常像を通常伴う, 副鼻腔の圧痛, 疼痛	1	2
声門下狭窄	喉頭鏡によって観察される, 声門下の炎症, 狭窄による喘鳴, 嘔声	3	6
伝音性難聴	耳鏡かつ/または音叉かつ/または聴力検査によって確認される, 中耳病変が原因の聴力喪失	1	3
感音性難聴	聴力検査によって確認される, 聴神経あるいは蝸牛の障害	2	6

(表 1, 2). このBVAS2003に関する問題点については後述する。

血管炎自体や, 長期にわたる副腎皮質ステロイドや免疫抑制薬投与により, 慢性的な臓器障

表 2-b BVAS2003加点点表および注釈(一部改)(2)

		BVAS 持続	BVAS 新規/悪化
5. 胸部	最大点数	3	6
喘鳴	身体所見上の喘鳴	1	2
結節または空洞	胸部X線によって認められる新規の病変		3
胸水貯留/胸膜炎	臨床的に評価される胸膜痛かつ/または胸膜摩擦音, あるいは画像上認められる新規の胸水, 他の要因(感染, 悪性腫瘍など)は除外	2	4
浸潤影	胸部X線, CTスキャンによって同定, 他の要因(感染)は除外	2	4
気管支内病変	気管支内の偽腫瘍または潰瘍性病変, 感染や悪性腫瘍は除外, 注:平滑な狭窄病変はVDIに該当;声門下病変は耳鼻咽喉の項に記録	2	4
多量の血痰/肺胞出血	移動性の肺浸潤影を伴う多量の肺出血;他の出血の要因は除外	4	6
呼吸不全	人工換気が必要な呼吸苦	4	6
6. 心血管	最大点数	3	6
脈の欠如	あらゆる血管における脈の消失:四肢の喪失のおそれのある脈の喪失を含む	1	4
弁膜疾患	聴診上, あるいは心エコー上認められる, 大動脈, 僧帽, 肺動脈弁の異常	2	4
心外膜炎	心膜痛かつ/または, 聴診上認められる心膜摩擦音	1	3
虚血性の胸痛	心筋梗塞あるいは狭心症につながるような, 典型的な胸痛の病変, よりありふれた原因(動脈硬化)も考慮	2	4
心筋症	心エコーにおいて確認される, 著明な心室壁運動の障害	3	6
うっ血性心不全	病歴あるいは臨床評価による, 心不全	3	6
7. 腹部	最大点数	4	9
腹膜炎	小腸, 虫垂, 胆嚢などの穿孔/梗塞による腹膜炎/腹膜炎による急激な腹痛, あるいは放射線診断/外科手術/上昇するアミラーゼによって確認される肺炎	3	9
血性下痢便	新規の発症;炎症性腸疾患と感染を除外	3	9
虚血性の腹痛	画像的診断あるいは外科手術によって確認できる, 虚血に典型的徴候をあわせもった強度の腹痛で, 血管炎に特徴的な動脈瘤や異常血管像を伴う	2	6
8. 腎	最大点数	6	12
高血圧	拡張期血圧>95, 促進的かどうか, 網膜変化を伴うかどうかは問わない	1	4
蛋白尿>1+	新尿で, 1+超;0.2g/日超, 感染を除外	2	4
血尿>10rbc/hpf	強拡大視野で赤血球10個以上, 尿路感染や尿路結石を除外	3	6
血清クレアチニン125~249μmol/l	初診時のみ血清クレアチニン125~249μmol/l	2	4
血清クレアチニン250~499μmol/l	初診時のみ血清クレアチニン250~499μmol/l	3	6
血清クレアチニン≥500μmol/l	初診時のみ血清クレアチニン≥500μmol/l	4	8
30%超の血清クレアチニン値の上昇あるいは25%超のクレアチンクリアランスの低下	活動性血管炎による, 著しい腎機能の低下		6

害が生じる。慢性臓器障害とは、免疫抑制によっては治療、軽快しない、瘢痕形成による機能的障害を指す。これらの管理は、時として活動性血管炎の治療よりも難渋することがある。米国国立衛生研究所の報告では、WG患者の86%が血管炎自体による永続的な障害を有し、また42%が治療起因となった障害を有するとされる。慢性障害に

は、腎不全、肺機能障害、難聴などが含まれる。これらの慢性障害を評価するために、vasculitis damage index (VDI)が定められた(表3)^{11,12}。VDIの中では、11臓器の64項目が設定され、3か月以上続く、不可逆性病変として定義されている。病初期には活動性病変と区別が難しい症候に遭遇するであろうが、VDIの付記事項としては記載

表 2-c BVAS2003加点表および注釈(一部改)(3)

		BVAS 持続	BVAS 新規/悪化
9. 神経	最大点数	6	9
頭痛	新規の習慣化していない、持続性の頭痛	1	1
髄膜炎	炎症性の髄膜炎による、後部硬直を伴う強度の頭痛、感染、出血を除外	1	3
器質的病変に基づく認知障害	代謝、精神、薬剤性、中毒性の要因のない、見当識、記憶などの高次機能障害	1	3
痙攣(高血圧性脳症ではない)	脳内発作性電気放電、および強直性、常同運動、行動変化を含む特徴的身体異常	3	9
脳卒中	麻痺、筋力低下など、巣症状の原因となる、脳血管障害。他の原因による(動脈硬化など)脳卒中発作の鑑別に神経内科専門医の診察も必要	3	9
脊髄病変	括約筋機能失調(直腸、膀胱)、下肢の筋力低下、感覚脱失(通常感覚異常高位を確認できる)を伴う、横断性脊髄炎	3	9
脳神経麻痺	顔面神経麻痺、再発性神経麻痺、動眼神経麻痺、感音性難聴、炎症による眼症状を除く	3	6
感覚末梢神経障害	手袋・靴下型感覚脱失の原因となる感覚神経障害、他の要因(特発性、代謝性、ビタミン欠乏、感染、中毒、遺伝性)を除く	3	6
運動性多発単神経炎	多くの末梢神経の同時性神経炎で、運動障害がある場合のみ加算。他の要因(糖尿病、サルコイドーシス、腫瘍性、アミロイドーシス)を除外	3	9
10. その他	活動性血管炎の他の症候を記載		

一般原則：症候が活動性血管炎によると思われる場合のみ加算し、事前に他の要因(感染、高血圧など)を除外すること。症候が、活動性血管炎によると思われる場合、所定の欄に加算する。それぞれの項目において、これらの原則にあてはめていくことが重要である。すべての症候が活動性血管炎(新規あるいは悪化ではなく)の場合、「持続性血管炎病態」にチェックする。なんらかの異常が、新規あるいは悪化の場合は、「持続性血管炎病態」にはチェックしない。異常が新規に出現、あるいは悪化した際には、より多くの情報を入手すること(専門医の診察、あるいは追加の検査により)。多くの症例においては、診察時にすべての項目のチェックが可能であるが、ある項目については、より多くの情報が必要なこともある。情報が入手できるまでは、項目欄を空欄とし、情報入手後、欄に記入する。たとえば、Wegener症候群の症例で、新規発症の喘鳴の訴えがあるとき、その症候が活動性か否かを確認するため、耳鼻咽喉科専門医に診察依頼する。血清クレアチニン125, 250, 500 $\mu\text{mol/l}$ はそれぞれ、1.41, 2.83, 5.66 mg/dl に相当する。

されていないものの、「治療に反応しない、永続的な障害」と理解すればよい。

以前は関節リウマチ症例の、身体的、精神的機能評価に使用されていたshort-form 36(SF-36)¹³⁾は今日でもさまざまな疾患のquality of lifeを評価するのに頼用されている。海外でのWG症例の臨床研究での使用が散見されるが、顕微鏡的多発血管炎(MPA)での臨床研究では使用されていない。後述するBVAS2003の評価トレーニングマニュアルの中では、SF-36は患者本人によって記入されるべきとなっており、高齢者の多いMPA症例においては、一般的使用が難しいと思われる。

なお、BVAS2003, BVAS/WG, VDI, FFSは、米国の稀少疾患臨床研究ネットワーク(RCDRN)の血管炎臨床研究協会(VCRC)のインターネットサイトより入手可能である(<http://rarediseasesnetwork.epi.usf.edu/vcrc/investigators/omi.htm>)。

BVAS

先述したように、2回の改変を経て、BVAS originalの項目中の4つが削除され、さらに、眼科などの専門医が、血管炎症例において出現頻度が高いと判断された7項目が新たに設定され、9臓器、計66項目に臨床的重要度を考慮に入れた、任意の点数が割り当てられている。具体的にはBVAS original, generalの項目の①38.5℃以上/以下の発熱を、点数を2/1点で分けていたのを、38.0℃以上で2点に統一した、②malaiseの項を削除した、③2kg超過/1~2kgの体重減少を3/2点で分けていたのを、2kg以上で2点とした、などであるが、この項目での最高点は、3点であり、いくつも障害・症状などの異常が出現してもその最高点を超えることはない。ほかの項目改訂点については割愛する。

BVAS originalではいずれの徴候も4週間以内

表3 Vascular damage index (VDI)

	あり	なし		あり	なし
I. 筋骨格		<input type="checkbox"/>	VII. 消化器		<input type="checkbox"/>
1. 明らかな筋萎縮、筋力低下	<input type="radio"/>		1. 腸管梗塞/腸管切除後	<input type="radio"/>	
2. 変形または骨ビランを伴った関節炎	<input type="radio"/>		2. 腸間膜動脈循環不全/脾炎	<input type="radio"/>	
3. 骨粗鬆症/脊椎圧迫骨折	<input type="radio"/>		3. 慢性腹膜炎	<input type="radio"/>	
4. 無腐性骨壊死	<input type="radio"/>		4. 食道狭窄/上部消化管の手術	<input type="radio"/>	
5. 骨髄炎	<input type="radio"/>		VIII. 末梢循環		<input type="checkbox"/>
II. 皮膚症状		<input type="checkbox"/>	1. 1肢における脈の欠損	<input type="radio"/>	
1. 脱毛			2. 1肢における2回目の脈の欠損	<input type="radio"/>	
2. 皮膚潰瘍	<input type="radio"/>		3. 2肢以上の脈の欠損	<input type="radio"/>	
3. 口腔潰瘍	<input type="radio"/>		4. 大血管の狭窄	<input type="radio"/>	
III. 耳鼻咽喉		<input type="checkbox"/>	5. 3か月超続く間欠性跛行	<input type="radio"/>	
1. 難聴	<input type="radio"/>		6. 静脈血栓症	<input type="radio"/>	
2. 鼻閉/慢性鼻汁分泌	<input type="radio"/>		7. 小さな部位の組織欠損	<input type="radio"/>	
3. 鞍鼻/鼻中隔穿孔	<input type="radio"/>		8. 大きな部位の組織欠損	<input type="radio"/>	
4. 慢性副鼻腔炎/X線による骨破壊所見	<input type="radio"/>		9. 2回目の大きな部位の組織欠損	<input type="radio"/>	
5. 声門狭窄(未手術)	<input type="radio"/>		IX. 眼		<input type="checkbox"/>
6. 声門狭窄(手術後)	<input type="radio"/>		1. 白内障	<input type="radio"/>	
IV. 呼吸器		<input type="checkbox"/>	2. 網膜病変	<input type="radio"/>	
1. 肺高血圧	<input type="radio"/>		3. 視神経萎縮	<input type="radio"/>	
2. 肺線維症	<input type="radio"/>		4. 視力低下・複視	<input type="radio"/>	
3. 胸膜線維化	<input type="radio"/>		5. 1眼の失明	<input type="radio"/>	
4. 肺梗塞	<input type="radio"/>		6. もう1眼の失明	<input type="radio"/>	
5. 慢性気管支喘息	<input type="radio"/>		7. 眼窩の破壊	<input type="radio"/>	
6. 慢性呼吸不全	<input type="radio"/>		X. 精神神経		<input type="checkbox"/>
7. 呼吸機能異常	<input type="radio"/>		1. 認知障害	<input type="radio"/>	
V. 循環器		<input type="checkbox"/>	2. 主要精神障害	<input type="radio"/>	
1. 狭心症/冠動脈バイパス術後	<input type="radio"/>		3. 惊撃	<input type="radio"/>	
2. 陈旧性心筋梗塞	<input type="radio"/>		4. 脳血管障害	<input type="radio"/>	
3. 2度目の心筋梗塞	<input type="radio"/>		5. 2回目の脳血管障害	<input type="radio"/>	
4. 心筋症	<input type="radio"/>		6. 脳神経障害	<input type="radio"/>	
5. 心弁膜異常	<input type="radio"/>		7. 末梢神経障害	<input type="radio"/>	
6. 3か月以上続く心外膜炎あるいは心外膜切除後	<input type="radio"/>		8. 横断性脊髄障害	<input type="radio"/>	
7. 高血圧; 拡張期血圧95mmHgまたは降圧薬内服	<input type="radio"/>		XI. その他		<input type="checkbox"/>
VI. 腎		<input type="checkbox"/>	1. 性腺障害	<input type="radio"/>	
1. 予測または実測の糸球体濾過率(GFR)が50%以下	<input type="radio"/>		2. 骨髄障害	<input type="radio"/>	
2. 蛋白尿0.5g/日以上	<input type="radio"/>		3. 糖尿病	<input type="radio"/>	
3. 腎不全末期	<input type="radio"/>		4. 薬剤性膀胱炎	<input type="radio"/>	
			5. 悪性腫瘍	<input type="radio"/>	
			XII. その他		<input type="radio"/>
			合計		

VDIは血管炎初発時から生じている臓器障害の記録表である。血管炎症例では血管炎が進展する前にしばしば合併症を伴うことが多いが、その合併症については加点をしない。活動性病変については、Birmingham vasculitis activity score (BVAS)を用いて記録する。血管炎初発時より3か月以上経過し、かつ、初発時より臓器障害が進展あるいは悪化していない限りは、VDI点数は通常0点となる。

の出現の有無で、点数を付けていた。ところが、軽度あるいは断続的な血管炎症候の発現は、通常治療法の変更、強化までは必要ない場合もあることから、4週間前後の変化の重要性が低くなり、1997年の改変¹¹⁾ではBVAS-1(initial form)とBVAS-2(follow up form)の2つの評価がなさ

れるようになった。この改訂版ではさらに、それぞれのformで、数週間に発現した症候の有無をチェックする欄があり、混乱を招きやすいということで、BVAS2003ではBVAS-2が削除され、1つのformで、観察時点の症候の有無を記載、加点をしていくこととなった。さらに4週

以前にすでに出現していたと考えられる症候に対して、BVAS originalで発症時期などを忠実に判断し、記録をつけると、その症候は評価をされないこととなり¹⁴、実用性の面でも問題が残っていたが、この点に関してはBVAS2003で修正されている。BVAS2003が普及されることで、早期診断が可能な症例が多くなる可能性があり、血管炎の評価のみならず、病態把握にも有用と考えられる。

また、BVAS2003での腎での項目は総点数が12点と他の項目に比較して高く、血清クレアチニン濃度の上昇が著しいだけでも12点となる。尿異常で尿血を、赤血球を1視野10個以上認めていたり、尿蛋白が1日0.2g以上出現していても10点であり、腎検査異常所見の出現を重要視していることがわかる。

上述したVCRCのサイトからは、BVAS2003の評価トレーニングマニュアルも入手できる。BVAS2003の原文を参照すると気づくのが、馴染みのない医学英語が散見されることである。Peritonism(腹膜炎)という単語は少なくとも、本邦では使用される機会はほとんどない。このマニュアルの中でもperitonismに関しては、「腹膜炎と推測される症候の記述用語」とされ、両者の区別は「術学的」と記載されている。

また、このマニュアルではBVASのほかにも、VDIによる評価法についても詳しく言及されている。限られた診察時間の中で、これらの評価を逐一行うことは難しいと思われるが、ポイントを押さえることで、所要時間短縮を図れる可能性は残されている。ちなみに、このマニュアルでは、BVASの一部の項目、VDIの全項目についてはナースプラクティショナーによって評価できるとされる。

血管炎活動性評価の意義

AAVを含む血管炎初期治療後の長期観察では、多くの症例で長期間の治療が続けられているにもかかわらず、完全寛解に至っていないことが報告されている¹⁵。くすぶり(smoldering)という表現がなされ、定期的な注意深い観察が必要となる。一方、Arkinの組織的分類上での癒痕期における臓器虚血、感染、免疫抑制薬などの薬物、

高血圧などの二次的疾患の合併など、さまざまな原因により臓器障害が増悪し、血管炎の活動性の評価が、臓器障害の原因鑑別に必要となる場面も多く経験する。

血管炎での疾患活動性の定義について普遍的なものではなく、多くの臨床介入試験で、臨床医の主観的、定量性に欠ける基準が使用されてきた経緯がある。病期によっては、ある基準に当てはめようとするだけで、正しい評価や判断が妨げられ、実地医療でこれらの基準が汎用されていない理由の一つとなっていると考えられる。

血管炎活動期の病像は、病態生理的、病理学的、血清学的、臨床的にそれぞれの捉えられ方がある。病初期および再燃期は活動期に該当し、寛解期は無症候期と解釈されるが、臨床的にいったん寛解期に入ったと考えられる症例でも、治療内容変更などを契機に血管炎が再燃する。血管炎は再燃も多く、寛解期とはいえ、再燃準備状態にあると考え、加療・経過観察を慎重に行わなければならない。そもそも活動期、寛解、再燃という言葉は臨床用語として解釈され、その定義には限界があり、活動性評価はごく表面的な見方でしかできなないと考えられる。血清学的活動性の評価に関しては、感染の存在が明確ではないのに、CRPの上昇を血管炎ではしばしば認められることから、活動性を一見反映しているかのようにみえるが、腎限局性血管炎(急速進行性腎炎を示す場合)ではCRPの上昇はないことがほとんどである。一方、ANCAが定量されるようになり、AAVの診断、病勢予測は比較的平易となったが、その抗体価は必ずしも活動性を反映していない。今後、病態生理学的に血管炎の病勢をさらに鋭敏に反映するマーカーの開発が必要であろう。

これまでAAVでの特異的な疾患活動性評価基準は定められていないので、これまで提唱されている全身性血管炎での活動性評価基準の役割について説明する。

1. 日常診療で血管炎を発見するための教育的見地に基づく利用法

全身性血管炎の症例は比較的稀な疾患として、見落とされてきた。血管炎の代表的症候を把握しておくことは、プライマリケア医にとって非常に

重要なことである。血管炎活動性評価基準の項目は、血管炎症例の治療にあたる機会が多い専門医のコンセンサスが得られているものであり、それぞれの症候を的確に血管炎と結びつけ、一元的に理解することは、早期発見、早期治療に結びつくものと考えられ、普及が急がれる。

2. 病態把握のための指標

血管炎の活動性と予後の関連については、これまで多くの報告がなされ、評価にはBVASが汎用されている。

また、多忙な実地医療の中で、血管炎の活動性を各項目において定期的に評価していくことは、合併症が多岐にわたる症例においては、とくに重要と考えられる。高齢者、とくに中枢神経障害合併例においては、自覚症状が軽度に留まる例や、症候の訴えがないこともあり、一定の評価項目を設けた上で定期的に診察に臨むことが、再燃の徴候の早期発見につながると考えられる。これまで、多くの血管炎活動性指標が提唱されているが、WGに比較してMPO-ANCA陽性MPA症例の割合が多い本邦の場合、とりあえず従来のBVASで評価を行い、今後は、独自の疾患特異的な活動性評価基準を作成することも必要かもしれない。

3. 治療評価のための指標

AAVに対する治療として、副腎皮質ステロイド単独あるいは、免疫抑制薬、大量免疫グロブリン投与、血漿交換、白血球吸着療法、モノクローナル抗TNF抗体などを組み合わせた治療がこれまで行われてきた。これらの治療効果の評価には、FFS、BVASが多く使用されている¹⁶⁾¹⁷⁾。これらの治療の前後、治療開始後定期的に、総合点数あるいは、特定臓器項目の点数を算出し、統計的に解析をすることとなる。治療開始後の活動性をBVASの総合点数で評価した場合、各項目の最高点数が異なること、障害の回復度は各臓器によって異なる可能性があることから、一概に点数での比較で治療の優劣を決めることはできないと考えられる。そのため治療法の比較を目的とした報告の多くでは、初診時の血管炎活動性の評価と、観察期間終了時の寛解率を比較する程度に留められている。

一方、上述したように、AAVにおいてはさま

ざまな合併症を有する症例が多いが、初期治療としてどのような治療が適切か十分に吟味する必要がある。結核やMRSAなどを保菌している例も多く、強い免疫抑制がこれらの重篤な感染症の再発を招くことがある。AAV寛解までの必要最低限の治療を見出す必要があるが、実際には治療の選択、治療薬の用量設定、減量の方法などは経験的に決められていることが多い。これらの指標を利用することで、寛解までに至る経過をより定量的に把握でき、今後合併症を有するAAV症例の治療選択の際に、これらの指標で示された臨床経過を参考にすることもできる。後遺症の程度をより少なくする治療法の開発を目的とする場合は、VDIなどの慢性臓器障害度の評価基準を用いることになる。

4. AAVの活動性、慢性期障害度の血清学的マーカーの開発

多数の血管炎症例を長期に観察すると、経過中に突然の再燃で致死的となりうる例も経験しうる。再燃の早期診断、早期治療を円滑にするシステム整備は当然であるが、先述したように、診断度の高い血清学的マーカーの開発研究は今後も続けられていくであろう。これらのマーカーの推移と、臨床経過を照合する際には、BVASは有用と考えられる。Kümpersらはleptin, ghrelinと疾患活動性との関係を、BVASを用いて示している¹⁸⁾。

おわりに

Birmingham vasculitis activity score(BVAS)を中心に、血管炎活動性評価の変遷とその意義について述べてきた。評価の方法については、実用的な問題に直面することが予想されるが、完璧に病態を把握できる指標は存在しないことは確かである。各施設において、臨床スタッフ、研究グループの各個人が、目的に合わせて理解しやすい形にアレンジしながら、検討していくことが重要である。

本稿の趣旨からはずれるので、詳述はしなかったが、活動性の評価とは別に臨床的に問題となるのが、血管炎の分類であろう。MPO-ANCA測定の普及と診断基準の簡明さから、MPAの診断に苦慮する例は少ないものの、Chapel Hill consensus conference¹⁹⁾での古典的結節性多発性動

脈炎の病態も合併するような、重症MPA症例も散見されている²⁰。いずれにせよ、典型的症例、特殊病態の血管炎であっても、その分類と、活動性および障害度を的確に評価しながら、治療効果や病態を明らかにしていくことが望まれる。

文 献

- 1) Adu D, Howie AJ, Scott DG, et al. Polyarteritis and the kidney. *QJ Med* 1987; 62 : 221.
- 2) Guillevin L, Le THD, Godeau P, et al. Clinical findings and prognosis of polyarteritis nodosa and Churg Strauss angitis a study in 165 patients. *Br J Rheumatol* 1988; 27 : 258.
- 3) Guillevin L, Lhote F, Gayraud M, et al. Prognostic factors in polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome. A prospective study in 342 patients. *Medicine (Baltimore)* 1996; 75 : 17.
- 4) Gayraud M, Guillevin L, Le Toumelin P, et al. Long-term follow up of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, and Churg-Strauss syndrome : analysis of four prospective trials including 278 patients. *Arthritis Rheum* 2001; 44 : 666.
- 5) Kallenberg CGM, Cohen Tervaert JW, Stegman CA. Criteria for disease activity in Wegener's granulomatosis : a requirement for longitudinal clinical studies. *APMIS Suppl* 1990; 98 : 37.
- 6) De Groot K, Gross WL, Herlyn K, et al. Development and validation of a disease extent index for Wegener's granulomatosis. *Clin Nephrol* 2001; 55 : 31.
- 7) Stone JH, Hoffman GS, Merkel PA, et al. A disease-specific activity index for Wegener's granulomatosis : modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score. *Arthritis Rheum* 2001; 44 : 912.
- 8) Whiting-O'Keefe QE, Stone JH, Hellmann DB. Validity of a vasculitis activity index for systemic necrotizing vasculitis. *Arthritis Rheum* 1999; 42 : 2365.
- 9) Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, et al. Birmingham vasculitis activity score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJ Med* 1994; 87 : 671.
- 10) Luqmani RA, Exley AR, Kitis GD, et al. Disease assessment and management of the vasculitides. *Baillieres Clin Rheumatol* 1997; 11 : 423.
- 11) Exley AR, Bacon PA, Luqmani RA, et al. Development and initial validation of the vasculitis damage index for the standardized clinical assessment of damage in the systemic vasculitides. *Arthritis Rheum* 1997; 40 : 371.
- 12) Exley AR, Bacon PA, Luqmani RA, et al. Examination of disease severity in systemic vasculitis from the novel perspective of damage using the vasculitis damage index (VDI). *Br J Rheumatol* 1998; 37 : 57.
- 13) Ware JE, Sherbourne CD. The MOS 36-item short form health survey (SF-36) 1 : conceptual framework and item selection. *Medical Care* 1992; 30 : 473.
- 14) 湯村和子. BVAS(Birmingham vasculitis activity score)とVDI(vasculitis damage index). *リウマチ科* 2007; 37 : 268.
- 15) Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, et al. Wegener's granulomatosis : an analysis of 158 patients. *Ann Intern Med* 1992; 116 : 488.
- 16) Jayne DR, Chapel H, Adu D, et al. Intravenous immunoglobulin for ANCA-associated systemic vasculitis with persistent disease activity. *QJ Med* 2000; 93 : 433.
- 17) Booth A, Harper L, Hammad T, et al. Prospective study of TNFalpha blockade with infliximab in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 : 717.
- 18) Kümpers P, Horn R, Brabant G, et al. Serum leptin and ghrelin correlate with disease activity in ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47 : 484.
- 19) Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994; 37 : 187.
- 20) 今村秀道, 小林浩子, 阿部和道, ほか. Myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody (P-ANCA)陽性で臨床的に顕微鏡的多発血管炎の像を呈しながら組織学的に結節性多発動脈炎と診断された1剖検例. *日内会誌* 2000; 89 : 2531.

Identification of a significant association of a single nucleotide polymorphism in *TNXB* with systemic lupus erythematosus in a Japanese population

Yoichiro Kamatani · Koichi Matsuda · Tetsuya Ohishi · Shigeru Ohtsubo · Keiko Yamazaki · Aritoshi Iida · Naoya Hosono · Michiaki Kubo · Wako Yumura · Kosaku Nitta · Toyomasa Katagiri · Yasushi Kawaguchi · Naoyuki Kamatani · Yusuke Nakamura

Received: 29 September 2007 / Accepted: 22 October 2007 / Published online: 6 December 2007
© The Japan Society of Human Genetics and Springer 2007

Abstract Systemic lupus erythematosus (SLE) is one of the common autoimmune diseases, with complex genetic components. Here, we report on a case–control association study of 178 SLE patients and 899 control subjects, using genome-wide gene-based single nucleotide polymorphism (SNP) markers. An SNP, rs3130342, in a 5' flanking region of the *TNXB* gene revealed a significant association with

SLE [$P = 0.00000930$, odds ratio (OR) 3.11, with 95% confidence interval (95%CI) of 1.89–5.28] in a Japanese population. This association was replicated independently with 203 cases and 294 controls ($P = 0.0440$, OR 1.52, with 95%CI of 1.01–2.78). Although a copy number variation (CNV) of the *C4* gene adjacent to the *TNXB* gene was reported to be associated with SLE, our analysis on this CNV revealed that the association of CNV of the *C4* gene was weaker than the SNP in the *TNXB* gene and likely to reflect the linkage disequilibrium between *C4* CNV and this particular SNP. Stratified analysis also revealed that the association of SNP rs3130342 with SLE was independent of the HLA-DRB1*1501 allele that has been shown to be associated with SLE. Our findings strongly imply that the *TNXB* gene is a candidate gene susceptible to SLE in the Japanese population.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10038-007-0219-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Y. Kamatani · K. Matsuda (✉) · T. Ohishi · S. Ohtsubo · T. Katagiri · Y. Nakamura
Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, the University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato, Tokyo 108-8639, Japan
e-mail: koichima@ims.u-tokyo.ac.jp

T. Ohishi · S. Ohtsubo · W. Yumura · K. Nitta
Department of Medicine, Kidney Center, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

K. Yamazaki
Laboratory for Gastrointestinal Diseases, SNP Research Center, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Kanagawa, Japan

A. Iida
Laboratory for Pharmacogenetics, SNP Research Center, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Tokyo, Japan

N. Hosono · M. Kubo
Laboratory for Genotyping, SNP Research Center, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Kanagawa, Japan

Y. Kawaguchi · N. Kamatani
Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

Keywords Systemic lupus erythematosus · single nucleotide polymorphism (SNP) · *TNXB* · Copy number variation (CNV) · *C4* · Genome-wide association study

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) (OMIM #152700) is a complex, heterogeneous, and relatively prevalent autoimmune disease in Japan. Glucocorticoids, together with immunosuppressive agents, have been widely used for treatment of SLE patients and have remarkably improved the clinical outcome for SLE patients (Trager and Warc 2001). However, most of the patients with SLE need to take these drugs throughout their lives after the diagnosis and often suffer from adverse events, such as opportunistic infections, avascular necrosis or myocardial infarction

Even in patients for whom the disease's activity could be successfully controlled at an early stage, progression of diseases such as renal insufficiency and neurological complications might afflict the patients later in the course. Hence, it is crucial for its detailed pathogenesis to be elucidated and novel therapeutic modalities developed that will improve patients' prognoses.

Although the molecular mechanisms of SLE have not been fully clarified, the involvement of both environmental and genetic factors in the etiology of SLE has been implied. Concordance rate of SLE in monozygote twins (24–58%) was significantly higher than that in dizygote twins (less than 10%), and a sibling recurrence risk ratio (λ_s) of the disease was estimated to be ~ 20 (Croker and Kimberly 2005). Therefore, the presence of multiple genetic factors that contribute to its pathogenesis has been suspected. To investigate genes susceptible to SLE, 11 studies applying genome-wide linkage analysis were conducted, and eight loci were shown to have significant linkage to SLE (Tsao 2003). A combined analysis of these studies indicated three loci at 6p21.1-q15, 16p13-q12.2 and 20p11-q13.13 to be candidate regions for SLE susceptibility (Forabosco et al. 2006).

In the very recent years, an information database of very high-density single nucleotide polymorphisms (SNPs) across the genome has been constructed, and advances in genotyping technology permit high-throughput SNP analysis at low cost. Hence, the SNP-based genome-wide approach is now widely used to investigate the genetic factors involved in diseases with high prevalence and low penetrance. By applying this approach, our group has identified genes susceptible to various diseases, such as myocardial infarction, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and cerebral infarction (Ozaki et al. 2002; Suzuki et al. 2003; Seki et al. 2005; Kubo et al. 2007).

In the study described here, we performed a genome-wide case-control association study to exploit genes susceptible to SLE and found that an SNP in the *TNXB* gene within the major histocompatibility complex (MHC) region of chromosome 6p21 had a strong association with SLE. Our genome-wide association study identified an SLE-susceptible locus on the MHC region in the Japanese population.

Materials and methods

DNA samples and genotyping

A total of 178 individuals with SLE was diagnosed at the Department of Nephrology, Tokyo Women's Medical University (case 1 and case 2, Supplementary Table 1). Additional DNA samples of 203 individuals with SLE

(case 3) were obtained from the Department of Rheumatology. All patients were diagnosed to have SLE on the basis of the revised criteria by the American College of Rheumatology (Hochberg 1997). Two sets of 538 (control 1) and 365 (control 2) control subjects were recruited, independently, from various medical institutes in Japan. We obtained written informed consent from each subject, and this study was approved by the ethics committee at the Institute of Medical Sciences, University of Tokyo, as well as that at Tokyo Women's Medical University. We extracted genomic DNA from peripheral blood leukocytes, using standard protocols. The third control cohort (control 3) was a gender- and age-matched control consisting of 294 healthy volunteers collected by the Pharma SNP Consortium (Ikari et al. 2006). We genotyped SNPs using the multiplex polymerase chain reaction (PCR)-based Invader assay (Third Wave Technologies). The detailed method has been described elsewhere (Ohnishi et al. 2001). We sequenced the *TNXB* gene in 48 healthy Japanese control subjects to search genetic variations further. Typing for the HLA-DRB1 locus was performed by the PCR-microtiter plate hybridization (MPH) method using commercial typing kits (WAK Flow, Wakunaga, Hiroshima, Japan), as described previously (Kawai et al. 1996).

Copy number analysis of *C4* gene

The *C4* gene has two isoforms, *C4A* and *C4B*, differing by only four amino acids at positions 1,101, 1,102, 1,105, and 1,106 (Supplementary Fig. 1). Another two isoforms, *C4* long (*C4L*) and *C4* short (*C4S*), were distinguished by the presence (*C4L*) or absence (*C4S*) of the insertion of endogenous retrovirus sequence HERV-K (*C4*) in intron 9 (Dangel et al. 1995). The TaqMan probes to evaluate copy numbers of the *C4A* and *C4B* genes have been previously described (Szilagyi et al. 2006). We designed primers and probe for *C4S* by Primer Express software, version 1.5 (Applied Biosystems). Probes and primer sets used in this assay are listed in Supplementary Table 2. We used 5' VIC-labeled *RNaseP* control reagents (Applied Biosystems) as a reference gene probe. We prepared 10 μ l of reaction mixture containing 20 ng of genomic DNA, 900 nM of primers, 250 nM of probes, 0.5 μ l of *RNase P* control reagent, and 5 μ l of TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). Thermal cycling conditions were as follows: initial 2-min incubation at 50°C and 10-min incubation at 95°C, and following the 40-cycle reaction at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The PCR reaction was performed in a 384-well reaction plate using ABI 7900HT (Applied Biosystems). A genomic fragment of the *RNase P* gene, together with the target fragment, was co-amplified within the same tube to apply the copy number of the

RNase P gene for normalization. Experiments were at least triplicated for each sample. The real-time amplification data were analyzed by sequence detection system software (version 2.1; Applied Biosystems). Relative gene copy numbers were determined by the comparative C_T method (User Bulletin #2; Applied Biosystems). Outliers within triplicates were excluded by the result of Smirnov-Grubb's test. We verified the accuracy of this quantification method by comparing the result of quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis and that of Southern blotting analysis (Supplementary Fig. 2). The total gene copy number of *C4* was estimated from the sum of *C4A* and *C4B*, as well as that of *C4S* and *C4L*. Thus, we determined the copy numbers of total *C4* and *C4L* from those of *C4A*, *C4B*, and *C4S*.

Statistical analysis

A genome-wide association study of SNPs in SLE patients and control subjects had been already carried out. To increase the statistical power, we adopted the two-step approach (Saito and Kamatani 2002). At the first stage, we performed an association study of 94 SLE patients (case 1) and 538 control subjects (control 1) for the genome-wide approach using 52,608 gene-based SNPs (Tsunoda et al. 2004). Then, we chose SNPs that showed a *P* value of 0.01 or less in either of three genetic models and further performed SNP genotyping in 84 SLE patients (case 2) and 365 independent control subjects (control 2). In each stage, SNPs showing a *P* value of 0.01 or lower in the Hardy-Weinberg equilibrium test for control samples were excluded. Fisher's exact test was applied for the calculation of statistical significance of two-by-two contingency tables in three genetic models: an allele count model, a dominant effect model, and a recessive effect model. We used Haploview software, version 3.32 (Barrett et al. 2004) to draw a linkage disequilibrium (LD) map around the marker SNP. In the replication study, the independent 203 patients (case 3) and 294 controls (control 3) were genotyped for SNP rs3130342, and the analyses were carried out by the same statistical method. The DNA from a total of 178 patients (cases 1 and 2) and 365 controls (control 2) was also analyzed for variations in gene copy number. To investigate the differences in the number of copies between the case and control groups, we used the Wilcoxon rank sum test. Differences in the distribution of copy number among the three genotype groups were analyzed by the Kruskal-Wallis test. Multivariate logistic regression modeling was used to estimate the independency of each polymorphism for SLE susceptibility, concerning SNP rs3130342 and the number of copies of the *C4A* gene and the *C4B* gene. Fisher's exact test was also used for the test

of association of HLA-DRB1*1501 with SLE by allele count model. For statistical analysis, we used the R statistical software version 2.4.1.

Results

To screen for a gene(s) susceptible to SLE, we performed genome-wide, case-control, association analysis using 52,608 gene-based SNPs for 94 SLE patients (case 1) and 538 controls (control 1). Among the 50,464 SNPs successfully genotyped, 1,310 showed *P* values of 0.01 or smaller. Subsequently, we genotyped for the additional 84 SLE patients (case 2) and 365 controls (control 2) for these 1,310 SNPs, and found an SNP, rs1009382, to have a strong association with SLE, with a *P* value of 0.00894, in the second stage; the combined samples at allele count model revealed a *P* value of 0.0000518 (Supplementary Table 3). This *P* value is the second significant *P* value obtained by this approach following an SNP in the *ITPR3* gene recently identified (Ohishi et al., data not shown).

Next, we constructed an LD map around this marker SNP on the basis of the HapMap-JPT genotyping data [release 21, based on National Center for Biotechnology Information (NCBI) build 35 and single nucleotide polymorphism database (dbSNP) build 125] using SNPs with the minor allele frequency of 20% or higher. As shown in Fig. 1b, two LD blocks were identified in the genomic region, including the SNP rs1009382. We selected 45 tag-SNPs from the genomic region covering these LD blocks and genotyped them for 178 patients (cases 1 and 2) and 365 controls (control 2). The statistical analysis indicated that the association was still peaked at this marker SNP rs1009382 in exon 23 of the *TNXB* gene and became gradually weak in both directions (Fig. 1a), implying that *TNXB* was the most likely candidate gene susceptible to SLE.

To define further the region of interest, we screened SNPs in a genomic region corresponding to the *TNXB* gene and identified 60 SNPs. Since the CNV region was located adjacent to this locus and contained a part of the *TNXB* gene, we selected and genotyped 33 SNPs mapped to a single-copy part of the human genome and found that the SNP rs3130342 located in the 5' flanking region of the *TNXB* gene revealed a stronger association [*P* value of 0.00000930, with odds ratio (OR) of 3.11 and 95% confidence interval (95%CI) of 1.89–5.28] than did the marker SNP (Table 1). Although the *ITPR3* gene, for which we had previously revealed a significant association with SLE, is located in the same chromosomal region as the *TNXB* gene is, the distance between the two genes is 1.5 Mb, and the pairwise *D'* value between them is very small. Hence, the association of the SNP on the *TNXB* gene with SLE was considered to be independent of that on the *ITPR3* gene.

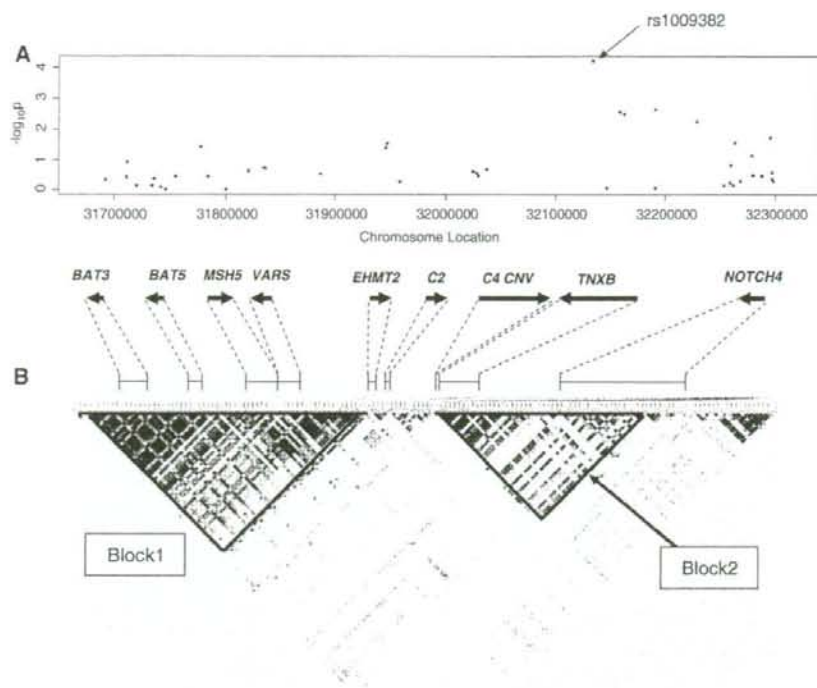


Fig. 1 Association of SNPs in the *TNXB* gene with SLE. **a** Single-point associations between SLE and tag SNPs around the *C4* CNV region. The *Y* axis is in units of $-\log_{10}(P)$. The lowest *P* value was detected at an SNP rs1009382 locus. **b** An LD map of this region

constructed from the HapMap-JPT data. The r^2 value between a pair of SNPs (minor allele frequency was 0.2 or more) was plotted at the apex of an *isosceles right triangle* defined by the baseline connecting the SNPs. Two LD blocks are shown by *bold edged triangle*

Systemic lupus erythematosus is known to occur predominantly in female patients; the female/male ratio in our study population was approximately 9:1. Since the control 2 population was not gender-matched, we performed a subgroup analysis using female patients and controls. The association study of SNP rs3130342 in 150 female patients and 67 female control subjects revealed a *P* value of 0.00395, in a recessive model, by Fisher's exact test (Table 2). The G-allele frequency and the odds ratio were almost the same as when we used all case and control subjects. To validate further the association of rs3130342 with SLE susceptibility, we performed a replication study using independent cases (case 3, $n = 203$) and gender-matched controls (control 3, $n = 294$). As a result, the association of rs3130342 was replicated in a recessive-effect model ($P = 0.044$ at $\alpha = 0.05$, Table 2).

Among the many genes that were included in the human MHC region on chromosome 6p21, particular HLA alleles, as well as deletion of the *C4* gene, were suggested to be

genetic factors susceptible to SLE. The SNP rs3130342 is located close to the *C4* gene, and a recent study of a Caucasian SLE population indicated the association of a lower *C4* gene copy number with SLE susceptibility (Yang et al. 2007). Therefore, it is possible that the association between the SNP rs3130342 and SLE might simply reflect the linkage disequilibrium between *C4* CNV and SNP on *TNXB*. Hence, we investigated the number of copies of the *C4* gene and each of its isoforms (*C4A*, *C4B*, *C4L*, and *C4S*), in the DNA of 178 SLE patients (cases 1 and 2) and 365 control subjects (control 2), by qPCR.

On the basis of the results shown in Table 3, we tested the null hypothesis that the distribution of the copy number in the SLE patients was the same as in the healthy controls, using Wilcoxon's rank sum test. The null hypothesis was rejected at significance level $\alpha = 0.01$ (determined by Bonferroni's correction for five tests) in the analysis of copy numbers of total *C4* and *C4B* (*P* values of 0.0003453 and 0.0008674, respectively). Copy numbers of total *C4*

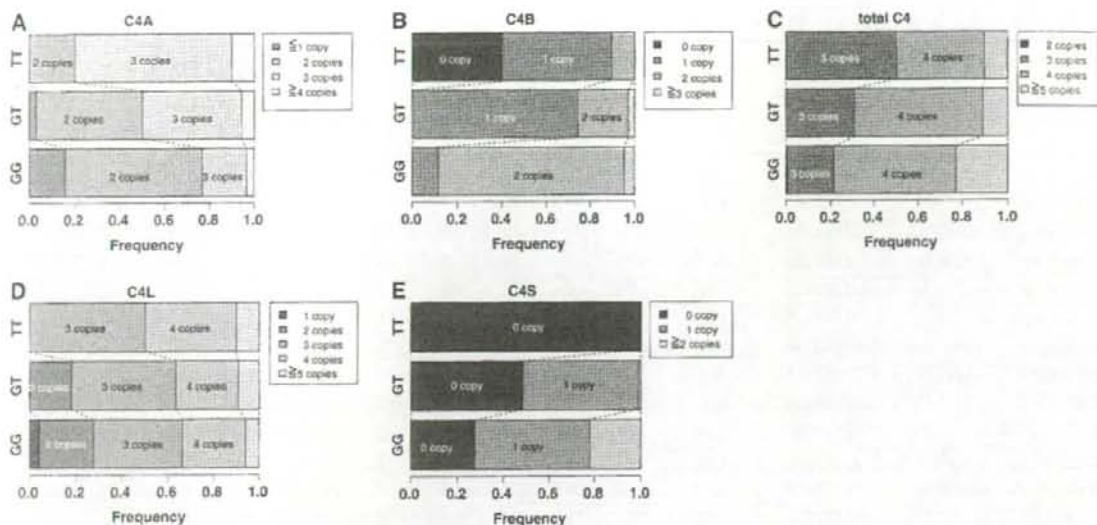


Fig. 2 Distributions of copy numbers of *C4* and its isoforms in the three genotype groups for an SNP rs3130342. The numbers of subjects were as follows: GG ($n = 244$), GT ($n = 109$), and TT ($n = 10$) at SNP rs3130342. **a** For *C4A*, two copies were prevalent in the GG genotype group, two and three copies were almost equal in the GT genotype group, and three copies were prevalent in the TT genotype group. **b** For *C4B*, more than 80% of the subjects with the GG genotype had two copies, and those with the GT genotype predominantly had one copy. The loss of the *C4B* gene was specifically observed in the group with the TT genotype. **c** Total

number of copies of the *C4* gene. Five or more copies were observed more frequently in the group with the GG genotype, and three copies were predominantly detected in the group with the TT genotype. **d** For *C4L*, none of the individuals with the TT genotype was judged to have two copies. **e** For *C4S*, the most significant difference was observed. All individuals belonging to the group with the TT genotype were judged to have no copy of *C4S*, while the remaining two-genotype groups predominantly possessed one or more copies. The GG genotype at SNP rs3130342 is a risk genotype for SLE

and *C4B* were significantly higher in SLE patients (4.20 and 1.88 in cases, and 3.96 and 1.74 in controls, respectively). Similar results were also obtained when we used the female subgroup for the analysis (Supplementary Table 4). Thus, our analyses indicated that greater numbers of copies of the *C4* and *C4B* gene might possibly be risk factors for SLE, although these results were contradictory to the results reported by Yang et al. (2007), in which lower numbers of copies of the *C4* gene were shown to be a susceptible factor to SLE.

Since the association of both *C4* CNV and SNP rs3130342 with SLE might simply reflect linkage disequilibrium between these two loci, we analyzed the relation between the number of copies of *C4* and its isoforms, and the genotypes of this particular SNP (Fig. 2). A Kruskal–Wallis test of the results revealed that copy numbers of *C4A* ($P = 4.213 \times 10^{-7}$, $\alpha = 0.01$ for all these five tests), *C4B* ($P = 1.195 \times 10^{-31}$), and *C4S* ($P = 7.32 \times 10^{-10}$) were significantly different among the three genotypes of the SNP, although the total *C4* copy number was of borderline significance ($P = 0.03734$). The number of copies of *C4A* became smaller according to the increase in the number of the G alleles (risk allele), while

the numbers of copies of *C4B*, total *C4*, and *C4S* increased when the number of G alleles was higher. These data suggested that SNP rs3130342 is in linkage disequilibrium with the CNV, especially with the copy number of *C4B*. The same tendency was also observed when we examined case 1 and case 2 individuals (data not shown).

We performed multivariate logistic regression analysis to evaluate the independence of these associated variants (Table 4). The SNP rs3130342 continued to show an association with SLE, regardless of the *C4* gene copy number, and revealed the smallest P value and the highest OR ($P = 0.0000954$, OR 3.24, 95%CI 1.80–5.87), indicating that the *TNXB* gene, but not the *C4* CNV, is the possible susceptible locus to SLE.

Particular HLA alleles were suggested to be genetic factors susceptible to SLE in the MHC region. Among them, HLA-DRB1*1501 has repeatedly been reported to be associated with SLE in the Japanese population (Hashimoto et al. 1994; Ohashi et al. 2001). To exclude the possibility that the association of SNP rs3130342 with SLE was due to its linkage disequilibrium with this HLA locus, we genotyped HLA-DRB1 using the 171 patients with SLE and the 365 control subjects (cases

Table 1 Summary of association of SNPs on *TNXB* gene with SLE

Location	dbSNP	Chromosome Location	Allele 1/2	Case			Control			Allele 1 frequency		Minimum <i>P</i> value
				Genotype			Genotype			Case	Control	
				11	12	22	11	12	22			
5' flanking	–	32189783	T/G	167	7	1	336	28	1	0.97	0.96	0.2
5' flanking	rs13196724	32189400	G/C	0	4	170	0	9	356	0.01	0.01	1
5' flanking	rs9469084	32188361	G/A	133	42	1	299	60	5	0.88	0.9	0.085
5' flanking	rs3130342	32188124	G/T	152	23	1	244	110	10	0.93	0.82	9.3E-07
5' flanking	–	32187936	C/T	178	0	0	365	0	0	1	1	1
5' flanking	–	32187545	G/T	120	49	9	277	81	7	0.81	0.87	0.014
5' flanking	rs3807039	32186351	A/C	127	46	4	285	76	3	0.85	0.89	0.078
5' flanking	rs411377	32185357	A/G	4	36	122	5	60	298	0.14	0.1	0.068
Intron 1	rs2269426	32184476	T/C	25	77	75	48	163	153	0.36	0.36	0.79
Exon 3	–	32173091	G/A	142	35	1	307	46	5	0.9	0.92	0.083
Exon 3	rs41270461	32173001	G/A	178	1	0	358	7	0	1	0.99	0.28
Exon 3	rs204896	32172075	A/G	2	34	122	5	59	300	0.12	0.09	0.18
Exon 3	rs41270458	32171874	C/T	174	1	0	363	2	0	1	1	1
Exon 3	–	32171771	A/G	150	25	1	294	71	0	0.92	0.9	0.19
Exon 3	rs17201602	32171659	G/A	0	3	171	0	9	356	0.01	0.01	0.76
Intron 3	rs2071293	32170665	T/C	18	74	80	35	156	171	0.32	0.31	0.76
Intron 3	rs204899	32165605	A/G	2	40	132	5	60	295	0.13	0.1	0.11
Intron 3	–	32165126	G/A	165	6	1	334	29	1	0.98	0.96	0.099
Exon 5	rs204900	32164557	T/G	126	42	1	298	60	6	0.87	0.9	0.064
Intron 7	rs2239688	32162189	C/G	10	47	111	7	85	273	0.2	0.14	0.0085
Exon 10	rs185819	32158044	A/G	18	50	90	48	163	151	0.27	0.36	0.0016
Intron 11	rs204877	32155414	C/G	1	42	134	5	61	299	0.12	0.1	0.11
Intron 11	rs2269427	32155254	G/C	0	4	172	1	9	355	0.01	0.02	0.78
Intron 14	rs2071295	32146677	A/G	16	74	82	34	160	171	0.31	0.31	0.93
Exon 18	rs3749963	32144427	A/G	1	26	150	0	70	295	0.08	0.1	0.28
Intron 20	rs9469080	32143405	A/G	1	41	135	5	60	300	0.12	0.1	0.11
Intron 20	rs2239689	32138262	C/T	18	78	80	36	160	169	0.32	0.32	0.84
Exon 21	rs2269428	32138177	A/C	1	26	149	0	69	295	0.08	0.09	0.33
Exon 23	rs1009382	32134084	A/G	109	61	7	158	170	34	0.79	0.67	0.000062
Intron 25	–	32131521	C/T	161	16	0	335	27	1	0.95	0.96	0.62
Intron 26	rs11969759	32129108	G/A	148	26	1	319	43	2	0.92	0.94	0.35
Intron 29	–	32125013	G/A	178	0	0	365	0	0	1	1	1
Intron 30	–	32123842	G/A	4	18	153	6	58	300	0.07	0.1	0.17
Intron 30	–	32123774	T/C	16	21	138	10	65	287	0.15	0.12	0.0022

and 2 and control 2). Our data indicated an association of HLA-DRB1*1501 with SLE (allele frequency was 15.4% and 7.0% in case and control samples, respectively, $P = 0.0000245$), similar to the previous reports. Stratified analysis revealed strong association between SNP rs3130342 and SLE in subjects without the HLA-DRB1*1501 allele ($P = 0.0000727$ at recessive model, Supplementary Table 5). Thus, we concluded that the GG genotype of SNP rs3130342 was associated with SLE, independent of the HLA-DRB1*1501 allele.

Discussion

In this study, we found a significant association of the SNP rs3130342 in the *TNXB* gene with SLE susceptibility in the Japanese population. The *TNXB* gene is reported to encode a member of the tenascin family of extracellular matrix proteins that was highly expressed in skin, muscle, tendon sheath, peripheral nerve, and vasculature (Matsumoto et al. 1994; Geffrotin et al. 1995). Molecular pathogenesis of SLE was considered as the exaggerated B cell response

Table 2 Association of SNP rs3130342 with SLE

Parameter	Number	Case			Number	Control			Frequency of G allele		Odds ratio ^a (95%CI)	P value ^b
		Genotype				Genotype			Case	Control		
		GG	GT	TT		GG	GT	TT				
Case 1, 2/control 2	177	152	23	1	363	244	110	10	0.929	0.822	3.11 (1.92–5.05)	9.30×10^{-7}
Female ^c	150	130	19	1	66	45	17	3	0.93	0.822	2.87 (1.45–5.86)	0.00395
Case 3/control 3	203	155	44	4	294	200	90	4	0.872	0.833	1.52 (1.01–2.28)	0.044
Total ^d	380	306	67	5	657	444	200	14	0.888	0.827	2.05 (1.51–2.78)	2.50×10^{-4}

^a Odds ratio of recessive effect (GG or GT + TT)^b Fisher's exact test of recessive effect model^c Analysis using female subgroup from case 1, case 2 and control 1^d Combined analysis comparing the sum of case 1, case 2 and case 3 with the sum of control 2 and control 3**Table 3** Association of gene copy number of C4 and its isoforms with SLE

C4A	0	1	2	3	4	5		Mean ± SD	P value ^a
Control 2	1	41	203	105	12	3		2.26 ± 0.74	
Case 1, Case 2	2	9	102	42	13	0		2.32 ± 0.75	0.3784
C4B	0	1	2	3	4			Mean ± SD	P value ^a
Control 2	4	115	232	13	1			1.70 ± 0.56	
Case 1, Case 2	3	26	129	9	1			1.88 ± 0.54	0.0003453 ^b
C4	2	3	4	5	6	7		Mean ± SD	P value ^a
Control 2	1	90	206	60	5	3		3.96 ± 0.74	
Case 1, Case 2	1	18	107	31	10	1		4.20 ± 0.76	0.0008674 ^b
C4L	1	2	3	4	5	6	7	Mean ± SD	P value ^a
Control 2	10	78	149	102	22	2	2	3.17 ± 0.98	
Case 1, Case 2	0	33	67	56	7	4	1	3.32 ± 0.95	0.1536
C4S	0	1	2	3				Mean ± SD	P value ^a
Control 2	131	179	54	1				0.79 ± 0.69	
Case 1, Case 2	48	91	29	0				0.89 ± 0.67	0.1225

^a Results of Wilcoxon rank sum test comparing cases 1 + 2 with control 2. The significance level alpha is 0.01^b P values below significance level**Table 4** Results of multivariate logistic regression analysis

Variables	P value	OR	95% CI
SNP rs3130342 ^a	0.0000954	3.24	1.80–5.87
C4A CNV ^b	0.0137	1.41	1.08–1.84
C4B CNV ^b	0.223	1.33	0.86–2.06

^a Value 1 for GG genotype and value 0 for GT or TT genotypes^b Values are the numbers of copies

caused by activated T cells or dendritic cells, or soluble mediators such as cytokines (Kyttaris et al. 2005). Tissue deposition of antibodies or immune complex induces

inflammation and subsequent injury of multiple organs. Mutations in the *TNXB* gene were found in patients with Ehlers–Danlos-like syndrome (Burch et al. 1997), but the role of *TNXB* in the immune system was not known.

C4 has an essential role in the classical complement pathway. C4A deficiency was repeatedly reported to be associated with SLE in Caucasian populations. However the association of C4 CNV with SLE was not examined until quite recently. In 2002, the genomic structure of the C4 CNV region was precisely determined (Chung et al. 2002), and the association of the lower copy number of the C4 or C4A gene with SLE in the Caucasian population was reported recently (Yang et al. 2007). However, our result

that a higher number of copies of the *C4* gene was associated with the susceptibility to SLE was controversial with regard to their results. In earlier days, the frequency of an 8.5 kb-*HindIII* band (corresponding to *C4A* gene deletion) was reported to be higher in SLE patients (20.5–24.5%) than in control individuals (7.9–12.9%) in the Caucasian population (Kemp et al. 1987; Goldstein et al. 1988; Reveille et al. 1991; Hartung et al. 1992), while in an Afro-American population, its frequencies were 14.5% in SLE patients and 3.7% in controls (Olsen et al. 1989). On the other hand, this 8.5 kb-*HindIII* band itself was not observed in Japanese, Korean, or Chinese populations (Yamada et al. 1990; Doherty et al. 1992; Hong et al. 1994), indicating that this particular allele was extremely rare or absent in Asian populations. Two basepair insertion mutations that would cause a premature stop codon in exon 30 of the *C4A* gene were reported in Caucasian SLE patients (Barba et al. 1993; Lokki et al. 1999), but we found such mutation in none of our SLE patients (data not shown).

Considering the ethnic differences indicated above, the discrepancy between our result (association of a higher copy number of *C4* to SLE susceptibility) and the result by Yang et al. (association of a lower copy number of *C4* to SLE susceptibility) could be explained by historical recombination, where the true susceptible risk allele is linked to the high copy number of *C4* in Japanese populations and with the low copy number in Caucasians. In general, the existence of linkage disequilibrium between SNP locus and CNV locus is a matter of argument (Locke et al. 2006; Redon et al. 2006), but, especially in this region, we clearly indicated that there was linkage disequilibrium between *C4* CNV locus and the SNP on *TNXB*. On multivariate logistic regression analysis, the SNP rs3130342 remained associated with SLE, independent of *C4* CNV, and this result suggests that the association between *C4* CNV and SLE might only reflect the linkage disequilibrium between *C4* CNV and SNP on *TNXB*.

We also examined the effect of HLA locus on SNP rs3130342. Since HLA-DRB1*1501 was shown to associate with SLE in Japanese populations, we examined the HLA-DRB1 gene and revealed that SNP rs3130342 was still associated with SLE in subjects without the HLA-DRB1*1501 allele. We also found the tendency of association ($P = 0.092$, odds ratio 2.94, 95%CI 0.76–13.6) in individual with the HLA-DRB1*1501 allele, although the association was not statistically significant, possibly due to smaller sample size ($n = 52$ and 51 in case and control samples). HLA-B*0801-HLA-DRB1*0301 haplotype was also frequently reported to be associated with SLE in Caucasians. This haplotype was included in a large haplotype called 8.1 ancestral haplotype or “COX haplotype” that consists of HLA-A1 Cw7 B8 C4A/Q C4B1

DRB1*0301 DRB3*0101 DQB1*0201 DQA1*0501 (Stewart et al. 2004). Moreover, the risk allele (G allele) of SNP rs3130342 was included in the COX haplotypes in Caucasian populations according to the Sanger MHC haplotype project. However, the HLA-DRB1*0301 allele was almost absent or extremely rare in the Japanese population (Hashimoto et al. 1994) and none carried the HLA-DRB1*0301 allele in our case and control individuals. Taken together, the association of rs3130342 with SLE was not due to its linkage disequilibrium with “COX haplotype” or HLA-DRB1*1501 in Japanese populations, and rs3130342 might have a causative role in SLE pathogenesis.

In summary, we performed a genome-wide association study of SLE and identified the SNP rs3130342 in the 5' flanking region of the *TNXB* gene as a possible candidate gene susceptible to the disease. The *TNXB* gene encodes an extracellular matrix protein, tenascin XB, that regulates collagen synthesis and deposition (Mao et al. 2002). Our findings indicated the possible role of collagen metabolism in the pathogenesis of SLE, and the association of *C4* CNV might not have a causal effect in the Japanese population. However, to clarify the physiological role of the *TNXB* polymorphism in SLE susceptibility, further investigation are required.

Web resources

Pharma SNP Consortium, <http://www.jpma.or.jp/psc/index.html>. The R statistical software: <http://www.R-project.org>. The HapMap project: <http://www.hapmap.org>. The JSNP database: <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index.html>. NCBI BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. The Sanger MHC haplotype project: <http://www.sanger.ac.uk/HGP/Chr6/MHC/>.

Acknowledgments We are grateful to members of The Rotary Club of Osaka-Midosuji District 2660 Rotary International in Japan for supporting our study.

References

- Barba G, Rittner C, Schneider PM (1993) Genetic basis of human complement C4A deficiency. Detection of a point mutation leading to nonexpression. *J Clin Invest* 91:1681–1686
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2004) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265
- Burch GH, Gong Y, Liu W, Dettman RW, Curry CJ, Smith L, Miller WL, Bristow J (1997) Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome. *Nat Genet* 17:104–108
- Chung EK, Yang Y, Rennebohm RM, Lokki ML, Higgins GC, Jones KN, Zhou B, Blanchong CA, Yu CY (2002) Genetic sophistication of human complement components C4A and C4B and

- RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in the major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet* 71:823–837
- Croker JA, Kimberly RP (2005) Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 17:529–537
- Dangel AW, Baker BJ, Mendoza AR, Yu CY (1995) Complement component C4 gene intron 9 as a phylogenetic marker for primates: long terminal repeats of the endogenous retrovirus ERV-K (C4) are a molecular clock of evolution. *Immunogenetics* 42:41–52
- Doherty DG, Ireland R, Demaine AG, Wang F, Veerapan K, Welsh KI, Vergani D (1992) Major histocompatibility complex genes and susceptibility to systemic lupus erythematosus in southern Chinese. *Arthritis Rheum* 35:641–646
- Forabosco P, Gorman JD, Cleveland C, Kelly JA, Fisher SA, Ortmann WA, Johansson C, Johanneson B, Moser KL, Gaffney PM, Tsao BP, Cantor RM, Alarcon-Riquelme ME, Behrens TW, Harley JB, Lewis CM, Criswell LA (2006) Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 7:609–614
- Geffrotin C, Garrido JJ, Tremet L, Vaiman M (1995) Distinct tissue distribution in pigs of tenascin-X and tenascin-C transcripts. *Eur J Biochem* 231:83–92
- Goldstein R, Arnett FC, McLean RH, Bias WB, Duvic M (1988) Molecular heterogeneity of complement component C4-null and 21-hydroxylase genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 31:736–744
- Hartung K, Baur MP, Coldewey R, Fricke M, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schendel D, Schneider PM, Seuchter SA, Stangel W, Deicher HRG (1992) Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study. *J Clin Invest* 90:1346–1351
- Hashimoto H, Nishimura Y, Dong RP, Kimura A, Sasazuki T, Yamanaka K, Tokano Y, Murashima A, Kabasawa K, Hirose S (1994) HLA antigens in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 23:191–196
- Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:1725
- Hong GH, Kim HY, Takeuchi F, Nakano K, Yamada H, Matsuta K, Han H, Tokunaga K, Ito K, Park KS (1994) Association of complement C4 and HLA-DR alleles with systemic lupus erythematosus in Koreans. *J Rheumatol* 21:442–447
- Ikari K, Momohara S, Inoue E, Tomatsu T, Hara M, Yamanaka H, Kamatani N (2006) Haplotype analysis revealed no association between the PTPN22 gene and RA in a Japanese population. *Rheumatology* 45:1345–1348
- Kawai S, Maekawajiri S, Tokunaga K, Kashiwase K, Miyamoto M, Akaza T, Juji T, Yamane A. (1996) Routine low and high resolution typing of the HLA-DRB gene using the PCR-MPH (microtitre plate hybridization) method. *Eur J Immunogenet* 23:471–486
- Kemp ME, Atkinson JP, Skanes VM, Levine RP, Chaplin DD (1987) Deletion of C4A genes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 30:1015–1022
- Kubo M, Hata J, Ninomiya T, Matsuda K, Yonemoto K, Nakano T, Matsushita T, Yamazaki K, Ohnishi Y, Saito S, Kitazono T, Ibayashi S, Suetishi K, Iida M, Nakamura Y, Kiyohara Y (2007) A nonsynonymous SNP in PRKCH (protein kinase C ϵ) increases the risk of cerebral infarction. *Nat Genet* 39:212–217
- Kytaris VC, Juang YT, Tsokos GC (2005) Immune cells and cytokines in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol* 17:518–522
- Locke DP, Sharp AJ, McCarroll SA, McGrath SD, Newman TL, Cheng Z, Schwartz S, Albertson DG, Pinkel D, Altshuler DM, Eichler EE (2006) Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am J Hum Genet* 79:275–290
- Lokki ML, Circolo A, Ahokas P, Rupert KL, Yu CY, Colten HR (1999) Deficiency of human complement protein C4 Due to identical frameshift mutations in the C4A and C4B genes^{1,2}. *J Immunol* 162:3687–3693
- Mao JR, Taylor G, Dean WB, Wagner DR, Afzal V, Lotz JC, Rubin EM, Bristow J (2002) Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nat Genet* 30:421–425
- Matsumoto K, Saga Y, Ikemura T, Sakakura T, Chiquet-Ehrismann R (1994) The distribution of tenascin-X is distinct and often reciprocal to that of tenascin-C. *J Cell Biol* 125:483–493
- Ohashi J, Yamamoto S, Tsuchiya N, Hata Y, Komata T, Matsushita M, Tokunaga K (2001) Comparison of statistical power between 2* 2 allele frequency and allele positivity tables in case-control studies of complex disease genes. *Ann Hum Genet* 65:197–206
- Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H, Nakamura Y (2001) A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J Hum Genet* 46:471–477
- Olsen ML, Goldstein R, Arnett FC, Duvic M, Pollack M, Reveille JD (1989) C4A gene deletion and HLA associations in black Americans with systemic lupus erythematosus. *Immunogenetics* 30:27–33
- Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T (2002) Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 32:650–654
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shaperro MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwork C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444:444–454
- Reveille JD, Anderson KL, Schrohenloher RE, Acton RT, Barger BO (1991) Restriction fragment length polymorphism analysis of HLA-DR, DQ, DP and C4 alleles in Caucasians with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 18:14–18
- Saito A, Kamatani N (2002) Strategies for genome-wide association studies: optimization of study designs by the stepwise focusing method. *J Hum Genet* 47:360–365
- Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, Mikami Y, Kizawa H, Oya T, Mio F, Mori M, Miyamoto Y, Masuda I, Tsunoda T, Kamata M, Kubo T, Toyama Y, Kimura T, Nakamura Y, Ikegawa S (2005) A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease. *Nat Genet* 37:607–612
- Stewart CA, Horton R, Allcock RJ, Ashurst JL, Atrazhev AM, Coggill P, Dunham I, Forbes S, Halls K, Howson JM, Humphray SJ, Hunt S, Mungall AJ, Osoegawa K, Palmer S, Roberts AN, Rogers J, Sims S, Wang Y, Wilming LG, Elliott JF, Jong PJ, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S (2004) Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res* 14:1176–1187
- Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K (2003) Functional haplotypes of PADI 4, encoding citrullinating

- enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34:395–402
- Szilagyi A, Blasko B, Szilassy D, Fust G, Sasvari-Szekely M, Ronai Z (2006) Real-time PCR quantification of human complement C 4 A and C 4 B genes. *BMC Genet* 7:1
- Trager J, Ward MM (2001) Mortality and causes of death in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 13:345–351
- Tsao BP (2003) The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Trends Immunol* 24:595–602
- Tsunoda T, Lathrop GM, Sekine A, Yamada R, Takahashi A, Ohnishi Y, Tanaka T, Nakamura Y (2004) Variation of gene-based SNPs and linkage disequilibrium patterns in the human genome. *Hum Mol Genet* 13:1623–1632
- Yamada H, Watanabe A, Mimori A, Nakano K, Takeuchi F, Matsuta K, Tanimoto K, Miyamoto T, Yukiya Y, Tokunaga K, Yokohari R (1990) Lack of gene deletion for complement C4A deficiency in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 17:1054–1057
- Yang Y, Chung EK, Wu YL, Savelli SL, Nagaraja HN, Zhou B, Hebert M, Jones KN, Shu Y, Kitzmiller K, Blanchong CA, McBride KL, Higgins GC, Rennebohm RM, Rice RR, Hackshaw KV, Roubey RAS, Grossman JM, Tsao BP, Birmingham DJ, Rovin BH, Hebert LA, Yu CY (2007) Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *Am J Hum Genet* 80:1037–1054

MPO-ANCA 関連血管炎の臨床病理学的アプローチによる腎病態の検討

板橋美津世* 湯村和子** 塚田三佐緒* 代田さつき*
武井卓* 小川哲也* 芳田工* 内田啓子*
上谷健* 新田孝作*

Clinico-histopathological analysis of renal changes in MPO-ANCA-associated vasculitis

Mitsuyo ITABASHI*, Wako YUMURA**, Misao TSUKADA*, Satsuki SHIROTA*, Takashi TAKEI*,
Tetsuya OGAWA*, Takumi YOSHIDA*, Keiko UCHIDA*, Ken TSUCHIYA*, and Kosaku NITTA*

*Department of Medicine IV, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, **Division of Nephrology and Kidney Center, Department of Medicine, Jichi Medical University, Tochigi, Japan

要 旨

目的: 急速進行性の腎障害を有し、腎生検を施行した MPO-ANCA 関連血管炎の症例を対象とし、病理および臨床所見、治療内容および予後について検討した。

方法: 血管炎としての活動病態を Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) で評価した。腎生検所見は、糸球体、間質および血管病変をスコアリングして評価した。腎予後は、1年後に維持透析に至った群と、透析離脱例も含めた腎機能保存群に分けて検討した。

結果: 平均年齢は 58.6 ± 13.9 歳で、60代が44%と最も多かった。血管炎の活動性は BVAS で平均 14.8 ± 3.2 であった。CRP は腎限局型では 1.2 ± 1.4 、多臓器型では 12.6 ± 10.5 と有意に腎限局型は低値であった ($p=0.0079$)。一方、MPO-ANCA は腎限局型では 393 ± 320 EU、多臓器型では 355 ± 280 EU であり、両群の間に有意差はなかった ($p=0.793$)。腎生検時の血清クレアチニン値は腎生存群では 3.57 ± 2.31 mg/dL であり、透析移行群における 9.10 ± 2.6 mg/dL に比し有意に低値であった ($p=0.000259$)。腎病理所見では、糸球体における全節性硬化糸球体率は、腎生存群が $24.7 \pm 19.9\%$ 、透析移行群が $68.5 \pm 19.7\%$ と透析移行群は有意に高値であった ($p=0.002$)。半月体形成率と腎予後には明らかな相関はなかった。初期治療1年後の時点で腎生存率は67%であった。

結語: 腎単独型に比し、多臓器型では有意に CRP が高かった。腎生検による全節性硬化糸球体の割合は腎予後と強い相関を示し、腎生検時の血清クレアチニン値は腎予後に関係する因子であった。

Objective: The pathological and clinical findings, therapies and prognoses of MPO-ANCA-associated vasculitis were investigated in cases who showed rapidly progressive nephritic syndrome and received renal biopsy.

Methods: Vasculitis activity was evaluated by BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score). The renal biopsy findings were evaluated by scoring glomeruli, interstitial and vascular lesions. The renal prognoses were studied by dividing the cases into a dialysis group, which went onto maintenance dialysis in one year and another group without dialysis, which maintained renal functions.

Results: The average age was 58.6 ± 13.9 years, and the 60s age bracket was the largest. Vasculitis activity was 14.8 ± 3.2 on the average by BVAS. CRP was 1.2 ± 1.4 for the kidney-located type group, and 12.6 ± 10.5 for the multiorgan-damaged group respectively, which shows the former to be significantly lower