

【臨床病理分科会】

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
難治性血管炎の医療水準・患者QOL向上に資する研究班
分担研究報告書

令和3年度 臨床病理分科会活動報告

研究分担者：

石津 明洋 北海道大学 大学院保健科学研究院 病態解析学分野 教授
川上 民裕 東北医科薬科大学 医学部 皮膚科学教室 教授
菅野 祐幸 信州大学 学術研究院医学系 医学部病理組織学教室 教授
高橋 啓 東邦大学医療センター大橋病院 病理診断科 教授
宮崎 龍彦 岐阜大学 医学部附属病院 病理診断科 教授

研究協力者：

池田 栄二 山口大学 大学院医学系研究科 病理形態学講座 教授
大原関 利章 東邦大学医療センター大橋病院 病理診断科 准教授
小川 弥生 NPO 法人北海道腎病理センター 副理事長
鬼丸 満穂 九州大学 大学院医学研究院 病理病態学 助教
倉田 美恵 愛媛大学 大学院医学系研究科 解析病理学 講師
中沢 大悟 北海道大学病院 内科2 助教
武曾 恵理 田附興風会医学研究所 北野病院 腎臓内科 客員研究員

研究要旨 実地臨床医ならびに実地病理医の血管炎診療の質を高めることを目的とし、血管炎病理診断コンサルテーションシステムを運用するとともに、血管炎病理学的所見における未解明問題として、GCA の大型血管病変の病理学的特徴、AAV の上気道生検組織の病理学的特徴、PAN の皮膚病変と皮膚動脈炎の病理学的特徴の相違を明らかにする課題ならびに FFPE 切片を用いた血管壁免疫グロブリン沈着の検出法開発に取り組んだ。また、ウェブ版血管炎病理アトラスの英文化を行った。今年度は10件の依頼症例に対し血管炎病理診断コンサルテーションを実施し、未報告であった1件を合わせて9件を報告した（2件実施中）。GCA の大動脈炎病変の特徴として、1) 多核巨細胞を含む炎症病変が大動脈中膜の中層に帯状に広がる、2) 大動脈栄養血管に沿った炎症所見は乏しく外膜の線維化に乏しい、の2点が挙げられた。AAV の上気道生検組織の特徴として、1) 筋性動・静脈炎、2) 筋性動・静脈の閉塞、の2点が挙げられた。人工知能を用いた解析により、罹患血管そのもののみならず、罹患血管周囲の浸潤炎症細胞や結合組織も、PAN と皮膚動脈炎の鑑別根拠になる可能性が示唆された。FFPE 切片に対する IgA 蛍光抗体法は1次抗体を24時間反応させ、間接法を施行するのが最適であると考えられた。また、ウェブ版血管炎病理アトラスを英文化した Expert Perspectives on Pathological Findings in Vasculitis を作成し、論文投稿中である。

A. 研究目的

実地臨床医ならびに実地病理医の血管炎診療の質を高めることを目的とする。

B. 研究方法

1. 血管炎病理診断コンサルテーションシステムの運用
2. 血管炎病理学的所見における未解明問題への取り組み
 - 1) GCA の大型血管病変の病理学的特徴の解明
 - 2) AAV の上気道生検組織の病理学的特徴の解明
 - 3) PAN の皮膚病変と皮膚動脈炎の病理学的特徴の相違の同定
 - 4) FFPE 切片を用いた血管壁免疫グロブリン沈着の検出
3. ウェブ版血管炎病理アトラスの英文化

(倫理面への配慮)

人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に則って実施した。

C. 研究結果

1. 血管炎病理診断コンサルテーションシステムの運用
10 件の依頼症例に対し血管炎病理診断コンサルテーションを実施し、未報告であった 1 件を合わせて 9 件を報告した (2 件実施中；表 1)。
2. 血管炎病理学的所見における未解明問題への取り組み
 - 1) GCA の大型血管病変の病理学的特徴の解明
GCA の大動脈炎病変の特徴として、1) 多核巨細胞を含む炎症病変が大動脈中膜の中層に帯状に拡がる、2) 大動脈栄養血

管に沿った炎症所見は乏しく外膜の線維化に乏しい、の 2 点が挙げられた。【詳細はワーキンググループ座長 菅野祐幸の分担研究報告書を参照】

- 2) AAV の上気道生検組織の病理学的特徴の解明

AAV の上気道生検組織の特徴として、1) 筋性動・静脈炎、2) 筋性動・静脈の閉塞、の 2 点が挙げられた。【詳細はワーキンググループ座長 宮崎龍彦の分担研究報告書を参照】

- 3) PAN の皮膚病変と皮膚動脈炎の病理学的特徴の相違の同定

人工知能を用いた解析により、罹患血管そのもののみならず、罹患血管周囲の浸潤炎症細胞や結合組織も、PAN と皮膚動脈炎の鑑別根拠になる可能性が示唆された。【詳細はワーキンググループ座長 石津明洋の分担研究報告書を参照】

- 4) FFPE 切片を用いた血管壁免疫グロブリン沈着の検出

FFPE 切片に対する IgA 蛍光抗体法は 1 次抗体を 24 時間反応させ、間接法を施行するのが最適であると考えられた。【詳細はワーキンググループ座長 高橋 啓の分担研究報告書を参照】

3. ウェブ版血管炎病理アトラスの英文化
ウェブ版血管炎病理アトラスを英文化した Expert Perspectives on Pathological Findings in Vasculitis を作成し、論文投稿中。

D. 考察

血管炎病理診断コンサルテーションを実施する過程で浮き彫りになってきた血管炎病理学的所見における 4 つの未解明問題に対し、ワーキンググループを結成して取り組んできた。その成

果は着実に得られつつある。また、Expert Perspectives on Pathological Findings in Vasculitis を英文論文として公表することは、実地臨床医ならびに実地病理医の血管炎診療の一助になる。

E. 結論

各プロジェクトは順調に進行している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato W, Yokouchi Y, Oharaseki T, Asakawa N, Takahashi K. The pathology of Kawasaki disease aortitis: a study of 37 cases. Cardiovasc Pathol 51: 107303, 2021.
- 2) Ota H, Sato C, Igarashi A, Inoue S, Masuda S, Ishizu A, Watanabe M. Spontaneously regressed granulomatosis with polyangiitis: a case report. Respiratory Invest 59(3): 372-376, 2021.
- 3) Kawakami T, Tamura Y, Dong Y, Yoshinari M, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibodies in patients with cutaneous vasculitis: possible involvement in the pathogenesis. J Dermatol 48(5):703-706, 2021.
- 4) Nishibata Y, Matsuzawa S, Satomura Y, Ohtsuka T, Kuhara M, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Neutrophil fixation protocols suitable for substrates to detect anti-neutrophil cytoplasmic antibodies by indirect immunofluorescence. Pathol Res Pract 228: 153661, 2021.
- 5) Iwasaki S, Watanabe T, Tsuji T, Otsuka T, Makita K, Fukasawa Y, Ishizu A. Infliximab-induced granulomatous vasculitis with amyloid deposition in the tongue of a patient with Behçet's disease. J Clin Rheumatol 27(8S): S710-S712, 2021.
- 6) Kawakami T, Okiyama N, Koderu M, Seishima M, Yamaguchi Y. The relationship between anti-phosphatidylserine/prothrombin complex IgM antibodies and cutaneous ulcers in patients with cutaneous vasculitis. J Dermatol 48(9): 1457-1458, 2021.
- 7) Usui J, Kawashima S, Sada K, Miyawaki Y, Nakazawa D, Itabashi M, Endo S, Endo T, Oda T, Ohya M, Kitagawa K, Nagasawa T, Hirahashi T, Hiromura K, Kawaguchi T, Takayasu M, Tsuboi N, Hirayama K, Muso E, Yumura W, Kaname S, Furuichi K, Okada H, Narita I, Committee of Clinical Practical Guideline for Rapidly Progressive Glomerulonephritis 2020. A digest of the evidence-based Clinical Practice Guideline for Rapidly Progressive Glomerulonephritis 2020. Clin Exp Nephrol 25(12): 1286-1291, 2021.
- 8) Takeuchi S, Kawakami T, Okano T, Shida H, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A, Kadono T. Elevated myeloperoxidase-DNA complex levels in sera of patients with IgA vasculitis. Pathobiology 89(1): 23-28, 2022.
- 9) Masuda S, Kato K, Ishibashi M, Nishibata Y, Sugimoto A, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Tsujino I, Ishizu A. Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulation under hypoxia induces nuclear swelling with DNA outflow but not extracellular trap formation of neutrophils. Exp Mol Pathol 125: 104754, 2022.
- 10) Nishibata Y, Nonokawa M, Tamura Y, Higashi R, Suzuki K, Hayashi H, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of intermolecular epitope spreading in the production of anti-glomerular basement membrane antibody in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Clin Exp Rheumatol (in press)
- 11) Senda A, Sasai R, Kato K, Nishibata Y, Masuda S, Ishizu A, Takahara N. Involvement of Neutrophil

Extracellular Traps in the Pathogenesis of Glomerulonephritis in a Case of Systemic Lupus Erythematosus and Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis Overlap Syndrome. Clin Exp Nephrol Case Rep (in press).

- 12) Kawakami T, Yokoyama K, Ikeda T, Yoshinari M, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. The presence of neutrophil extracellular traps in superficial venous thrombosis of Behcet's disease. J Dermatol (in press)
- 13) Iwama E, Yokoyama K, Ikeda T, Kawakami T. Incompetent saphenous vein in patients with lower leg dermatitis and cramps. J Cutan Immunol Allergy (in press)
- 14) Morita K, Yamamoto S, Ueda M, Taniguchi K, Nakai H, Minamiguchi S, Muso E, Yanagita M. A rare case of atypical ANCA-associated vasculitis without crescents overlapping with invasive pulmonary aspergillosis, successfully treated to remission with intravenous immunoglobulin therapy CEN Case Rep (in press)
- 15) 工藤孝司, 中沢大悟, 石津明洋. 好中球細胞外トラップと腎疾患. 日本腎臓学会会誌 63(3): 265-273, 2021.
- 16) 石津明洋. 抗好中球細胞質抗体関連血管炎の病態形成メカニズム. アレルギー 70(5): 372-375, 2021.

2. 学会発表

- 1) Takahashi K. Histopathology of cardiovascular lesions in remote phase of Kawasaki disease -especially in relation to atherosclerosis-. The 13th International Kawasaki Disease Symposium.
- 2) Asakawa N, Oharaseki T, Makino H, Yokouchi Y, Miura N, Ohno N, Takahashi K. Syk inhibitor suppresses developing Kawasaki disease-like murine vasculitis induced by *Candida albicans* cell-wall polysaccharide. The 13th International Kawasaki Disease Symposium.
- 3) Oharaseki T, Asakawa N, Yokouchi Y, Makino H, Miura N, Ohno N, Takahashi K. Hyperlipidemia make the long-term prognosis of life poor in a murine model of Kawasaki disease vasculitis induced by *Candida albicans* water soluble fraction. The 13th International Kawasaki Disease Symposium.
- 4) Yokouchi Y, Makino H, Asakawa N, Oharaseki T, Takahashi K. Calcification of the coronary artery aneurysm in Kawasaki disease. The 13th International Kawasaki Disease Symposium.
- 5) 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. myosin light chain 6 を認識する抗好中球細胞外トラップ(NETs)抗体は NETs 分解阻害活性を持つ. 第 65 回日本リウマチ学会.
- 6) 山田理紗, 高田秀人, 花岡成典, 勝又康弘, 石津明洋, 大原関利章, 針谷正祥. 肉芽腫性血管炎が病因として示唆された肥厚性硬膜炎の 1 例. 第 65 回日本リウマチ学会.
- 7) 益田紗季子, 西端友香, 田中 敏, 外丸詩野, 辻野一三, 石津明洋. 低酸素環境が好中球細胞外トラップ形成へ与える影響. 第 110 回日本病理学会.
- 8) 宮部千恵, 川上民裕. 皮膚血管炎における抑制性共刺激因子の役割. 第 120 回日本皮膚科学会総会.
- 9) 高橋真由美, 臼井丈一, 金子修三, 杉山 斉, 新田孝作, 和田隆志, 武曾恵理, 有村義宏, 榎野博史, 松尾清一, 山縣邦弘. RPGN 全国アンケート調査二次研究: IgA 腎症及び IgA 血管炎の生命・腎予後の検討. 第 64 回日本腎臓学会総会.

- 10) 川上民裕, 田村宥人, 董 宇鵬, 吉成未来, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. 抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体による皮膚血管炎動物モデルの完成. 第 85 回日本皮膚科学会東部支部学術大会.
- 11) 遠藤知美, 武曾惠理. ANCA 関連腎炎の病理予後予測. 第 50 回日本腎臓学会東部部会.
- 12) 川上民裕, 田村宥人, 董 宇鵬, 吉成未来, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. 抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体による皮膚血管炎動物モデルの完成. 第 70 回日本アレルギー学会学術大会.
- 13) 川上民裕, 田村宥人, 董 宇鵬, 吉成未来, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. ヒストン皮下注射と抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体静脈注射から完成した皮膚血管炎の動物モデル. 第 49 回日本臨床免疫学会総会.
- 14) 川上民裕, 董 宇鵬, 沖山奈緒子, 小寺雅也, 清島真理子, 長谷川稔, 山口由衣. 皮膚動脈炎患者における多施設共同の抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体測定. 第 85 回日本皮膚科学会東京支部学術大会.
- 15) 高橋 啓. 川崎病と病理組織学. 第 41 回日本川崎病学会.
- 16) 麻生里佳, 中沢大悟, 三好敦子, 上田雄翔, 西尾妙織, 外丸詩野, 石津明洋, 渥美達也. ANCA 関連血管炎における CD47・エフェロサイトシスの役割. 第 26 回日本血管病理研究会.
- 17) 田中 瑛, 河野裕夫, 藏澄宏之, 鈴木 亮, 濱野公一, 池田栄二. 胸部大動脈瘤および冠動脈瘤を呈した IgG4 関連疾患の一例. 第 26 回日本血管病理研究会.
- 18) 浅川奈々絵, 大原関利章, 牧野治樹, 横内 幸, 三浦典子, 大野尚仁, 高橋 啓. 川崎病類似血管炎マウスモデルにおける Syk 阻害薬の有効性について. 第 26 回日本血管病理研究会.
- 19) 柏 航, 加藤千恵次, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 川上民裕, 石津明洋. 結節性多発動脈炎と皮膚動脈炎の皮膚生検画像の人工知能による鑑別. 第 26 回日本血管病理研究会.
- 20) Kazuhiro Kobayashi, Maximilian Seidl, Faeq Husain-Syed, Mercedes Noriega, Tobias Huber, Victor Puelles, Hermann-Josef Gröne, Dominic Wichmann, Jan Spherhake, Tatsuhiko Miyazaki, Thorsten Wiech. Post-mortem kidney histopathological analysis in 94 patients with COVID-19 in Germany reveals high frequency of myoglobinuria. 第 26 回日本血管病理研究会.
- 21) 川上民裕, 横山華英, 池田高治, 高橋一夫, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. 東北医科薬科大学におけるベーチェット病診療の実態と皮膚生検標本を使用した NETs 免疫染色の検証. 第 4 回日本ベーチェット病学会.
- 22) 石津明洋. ANCA 関連血管炎の動物モデル. 第 3 回血管炎病因病態研究会.
- 23) 中沢大悟, 工藤孝司, 楠加奈子, 白鳥里佳, 西尾妙織, 外丸詩野, 石津明洋, 渥美達也. シクロフィリン D をターゲットとした ANCA 関連壊死性血管炎に対する新規治療薬の開発. 第 3 回血管炎病因病態研究会.
- 24) 宮崎龍彦, 新居俊典, 小林一博, 酒々井夏子, 松本宗和. 組換え近交系マウス腎炎・腎血管炎治療モデルを用いた治療抵抗性遺伝子座の解析. 第 3 回血管炎病因病態研究会.
- 25) 浅川奈々絵, 大原関利章, 牧野治樹, 横内 幸, 三浦典子, 大野尚仁, 高橋 啓. カンジダ細胞壁多糖誘導川崎病血管炎モデルにおける Syk 阻害薬による血管炎抑制効果. 第 3 回血管炎病因病態研究会.
- 26) 伊藤吹夕, 津久井大輔, 大原関利章, 木村佳貴, 柳田たみ子, 岸フク子, 山河芳夫, 亀岡洋祐, 鈴木章一, 三浦典子, 大野尚仁, 高橋 啓, 河野 肇, 鈴木和男. カンジダ菌体抽出物 (CAWS) による川崎病モデルマウスへの抗

VAP2 抗体投与の有効性. 第 3 回血管炎病因
病態研究会.

H. 知的財産権の出願・登録
なし。

表 1. 血管炎病理診断コンサルテーション実績概要

症例	年 齢	性 別	依頼概要	コンサルタンツ所見	
				A	B
VC038 (未報告分 の報告)	53	男	2003年 急性心筋梗塞 2011年 左大腿動脈仮性動脈瘤 2012年 腹部大動脈瘤 2020年 右外腸骨動脈破裂 2020年 CABG+冠動脈切除 結合組織脆弱性疾患?	c/w multiple aneurysm based on congenital matrix abnormality, NOS	Aneurysm of coronary artery due to fragility of internal elastic lamina
VC042	63	女	大動脈弁閉鎖不全症, 高血圧 上行大動脈置換術+大動脈弁形成術+ 左心耳切除→TAK?	c/w TAK	c/w TAK
VC043	49	男	2013年 肥厚性硬膜炎 2015年 鞍鼻, ANCA 陰性だが GPA と 診断 治療により改善したが、副鼻腔内占拠性 病変が 増大し、生検→GPA?	c/w GPA	c/w GPA
VC044	56	男	副鼻腔炎・喘息の既往あり 2019年 下肢対麻痺, 痙攣, 麻痺性イレ ウス 肉眼的血尿, 急速進行性腎障害, 血痰, 呼吸困難, CRP↑ 腎生検, 上部・下部消化管生検・肺生検 →EGPA?	No evidence of vasculitis	No evidence of vasculitis
VC045	64	女	2021年 発熱, 頭痛, 発語障害 左内頸動脈狭窄による脳梗塞 赤沈亢進, 血小板減少, 肝障害 側頭動脈エコーで内・中膜の肥厚あり 側頭動脈生検→GCA?	c/w GCA	c/w GCA
VC046	87	男	2018年より頭痛 2021年6月 発熱, 左側頭部痛 炎症反応あり 側頭動脈生検→GCA?	Non-inflamed temporal artery	Indefinite for vasculitis

VC047	62	女	<p>2020年7月 肉眼的血尿 以後、間欠的発熱 (37°C台) CRE 0.63mg/dl, 尿タンパク 2.59g/gCRE ANA ×40, 低補体血症 クリオグロブリン (+) Monoclonal IgG (κ) 腎生検→軽度の基底膜二重化, 内皮下浮腫を伴うメサンギウム増殖性腎炎 電顕にて少数の上皮下沈着</p> <p>その後、間欠性跛行あり 両側外腸骨動脈狭窄と 右腎動脈末梢部狭窄が判明 PDG-PET で弓部～下行大動脈, 両側総頸動脈, 両側鎖骨下動脈に集積 →高安動脈炎と診断</p>	<p>Membranous nephropathy, stage I s/o light chain deposition</p>	<p>Mesangial proliferative glomerulonephritis and Membranous nephropathy, associated with Takayasu arteritis</p>
VC048	82	男	<p>発熱, 食欲不振 抗核抗体陽性 (抗 SSA, SSB 高値) MPO-ANCA 陽性 ランダム皮膚生検→血管炎?</p>	<p>実施中</p>	
VC049	74	女	<p>2週間前から左側頭部痛と複視, 左眼視力低下, 視野障害 (下半盲) 発熱なし, 炎症反応軽度 臨床的に GCA と診断し, ステロイドパルス その後、側頭動脈生検 内膜肥厚と内弾性板の断裂を認めたが, 炎症細胞浸潤は認めなかった→GCA?</p>	<p>Marked disruption of vascular wall structure, highly suggestive of arteritis</p>	<p>Marked disruption of internal elastic lamina, indefinite for GCA</p>
VC050	79	女	<p>VC004 にて GPA に矛盾しないと診断 その後、寛解導入され維持療法中 横行結腸ポリペクトミー後に回腸穿孔 3か月前の PET で小腸に複数の集積像 →GPA の再燃?</p>	<p>s//o Other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disease (OIIA-LPD)</p>	<p>s//o Other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disease (OIIA-LPD), need to consider EBV-associated mucocutaneous ulcer (EBVMCU)</p>
VC051	32	男	<p>2021年8月 コロナワクチン接種 2021年9月 動作時下肢疼痛 2021年10月 下肢紅斑, 発熱, 体重減少, CRP↑ 右肺動脈血栓 皮膚生検・筋生検→血管炎?</p>	<p>実施中</p>	

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患政策研究事業
難治性血管炎に関する調査研究班
分担研究報告書

巨細胞性動脈炎の大型血管病変に関する研究

研究分担者：

菅野 祐幸 信州大学学術研究院医学系医学部病理組織学教室 教授

石津 明洋 北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 教授

研究協力者：

池田 栄二 山口大学大学院医学系研究科病理形態学講座 教授

鬼丸 満徳 九州大学大学院医学研究院病理病態学講座 助教

倉田 美恵 愛媛大学大学院医学系研究科解析病理学 講師

研究要旨 高安動脈炎と巨細胞性動脈炎(GCA)では、その疫学における差異は明らかだが、病理組織学的には巨細胞の出現を伴う肉芽腫性血管炎の組織像を示し、大型血管における組織像の差異は必ずしも明確ではない。高安動脈炎とGCAの分類基準が明らかでない現状を鑑み、側頭動脈生検で典型的なGCA病変を有することが病理組織学的に確認されGCAの診断に異議の少ない高齢の症例で、手術標本あるいは剖検標本で大動脈炎病変の病理組織学的な検討の可能な症例(cranial GCA with established extracranial involvement; C-GCA with EECIに相当)の収集を試みたところ、病理組織学的に確定診断のついたC-GCA with EECI症例1例の大動脈炎病変の組織像を検討することができた。巨細胞の出現を伴う虫食い状の大動脈中膜炎だが、中膜最外層の弾性線維は保たれ、外膜における炎症細胞浸潤と線維化は比較的軽微であった。こうした所見は併せて収集した、頭蓋内外の頸動脈分枝には血管病変が確認されず大型血管にのみ病変を有するGCA(extracranial GCA; EC-GCA)と考えられる症例4例の大動脈炎病変と共通の所見であり、C-GCA with EECI、EC-GCAの病型に関わらず共通の大動脈炎病変を示すものと考えられた。この大動脈炎の組織学的所見は、高安動脈炎の組織所見として報告されているものとは異なる点がみられ、GCAと高安動脈炎は病理組織学的に区別される別の疾患である可能性が考えられた。

A. 研究目的

大型血管炎の領域では、高安動脈炎と巨細胞性動脈炎(GCA)との異同が問題となっている。高安動脈炎とGCAでは、その疫学における差異は明らかだが、病理組織学的には巨細胞の出現を伴う肉芽腫性血管炎の組織像を示し、大型血管における組織像の差異は必ずしも明確ではない。

高安動脈炎とGCAの分類基準が明らかでない現

状を鑑み、側頭動脈をはじめとする頭蓋内外の頸動脈分枝に典型的なGCA病変を有することが病理組織学的に確認されGCAの診断に異議の少ない高齢の症例で、手術標本あるいは剖検標本で大動脈炎病変の病理組織学的な検討の可能な症例(cranial GCA with established extracranial involvement; C-GCA with EECIに相当)を収集して、その大型血管病変の組織学的特徴を明らかにする。併せて頭蓋

内外の頸動脈分枝には血管病変が確認されず大型血管にのみ病変を有する GCA 症例 (extracranial GCA; EC-GCA) の組織像と比較することにより、GCA の大型血管病変の病理組織学的特徴を明らかにすることができる。これにより、高安動脈炎と GCA の大型血管病変の組織学的な差異を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

症例の収集に当たっては、当研究班の班員に情報提供を依頼したほか、剖検輯報、学会報告、論文を検索して候補症例を収集し、事前アンケートにより病理組織標本の有無などの概略を把握することとした。なお、GCA に類似した梅毒感染に伴う大動脈中膜炎を除外するため、梅毒感染の有無についての情報提供も依頼することとした。

事前アンケートにより、C-GCA with EECI の可能性のある症例は 3 例、EC-GCA と考えられる症例は 14 例あった。これらを収集対象とし、血管炎に関わる臨床情報と当該血管炎病変の未染病理組織切片の提供を求める多施設共同研究の枠組みで研究を遂行することとした。

(倫理面への配慮)

人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に則り、信州大学医学部医倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号: 4452)。なお、症例提供先の施設においても倫理審査を依頼し、その承認を受けて患者情報と病理組織切片の提供を受けることとした。

C. 研究結果

最終的に 9 施設から計 11 例の提供を受けることができたが、剖検例で大動脈が採取されていない症例、大動脈に血管炎の所見がはっきりしない症例、また粥状硬化の所見が強く血管炎病変の組織学的特徴の抽出には不相当と考えられた症例などがあり、最終的には C-GCA with EECI 相当の症例 1 例、

EC-GCA 相当の症例 4 例を組織学的な検討対象とした。なお、EC-GCA 相当の 1 例を除き、梅毒血清反応陰性を確認しており梅毒による大動脈中膜炎の可能性は否定的である。これら計 5 例の大動脈切片について、H-E 及び elastica-Goldner 染色を施行し、WSI ファイルを作成してワーキンググループメンバーの配布し組織学的所見について意見集約を行った。

その結果、C-GCA with EECI の大動脈炎病変の特徴として、1) 多核巨細胞を含む炎症病変が大動脈中膜の中層に帯状に広がる、2) 大動脈栄養血管に沿った炎症所見は乏しく外膜の線維化に乏しい、の 2 点が挙げられ、これらの所見は EC-GCA 相当の症例のほとんどでも観察された。また、炎症病変は巨細胞を含むものの、いわゆる肉芽腫としての結節状の形態は明らかではなかった。

D. 考察

組織像を検討することのできた C-GCA with EECI 症例は、大動脈解離発症前に頭痛、顎跛行の症状が認められている。Ga シンチで大動脈壁の一部にびまん性の集積がみられたが明らかな神経学的異常は認めていない。GCA が疑われて側頭動脈生検が施行され病理組織学的に GCA の診断が確定している (図 1)。その後ステロイド治療中に上行大動脈解離を発症した。その病理組織像は巨細胞の出現を伴う虫食い状の大動脈中膜炎だが、中膜最外層の弾性線維は保たれ、外膜における炎症細胞浸潤と線維化は比較的軽微であった (図 2)。

高安動脈炎は同じく虫食い状の大動脈中膜炎を呈するが、外膜寄り優位の中膜炎であり、栄養血管周囲の炎症細胞浸潤が外膜から連続し、中膜最外層の弾性線維も断裂を来とし、外膜には著明な線維性肥厚を来す。今回の C-GCA with EECI 症例とは異なる組織像を示す。

EC-GCA と考えられた 4 例の大動脈病変は、基本的に C-GCA with EECI 症例の大動脈病変の特徴を示しており (図 3)、C-GCA with EECI、EC-GCA の病型に関わらず共通の大動脈病変を示すものと考えら

れた。

引き続き、疾患の背景にある免疫学的な病態の検討のため、免疫組織化学を用いて浸潤する炎症細胞の機能的な phenotype の検討を進めているが、剖検材料も多く含まれており、一部の解析にとどまる状況である。

E. 結論

側頭動脈生検で GCA の確定診断がついた C-GCA with EECI 症例の大動脈炎病変を検討することができた。臨床的に GCA が疑われた症例 (EC-GCA) の大動脈炎病変も類似した病理組織学的所見を示した。この大動脈炎の組織学的所見は、高安動脈炎の組織所見として報告されているものとは異なる点がみられ、GCA と高安動脈炎は病理組織学的に区別される別の疾患である可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 菅野祐幸, 小林実喜子. 大型血管の血管炎. 病理と臨床 39(11): 1106-1109, 2021.

H. 知的財産権の出願・登録

なし。

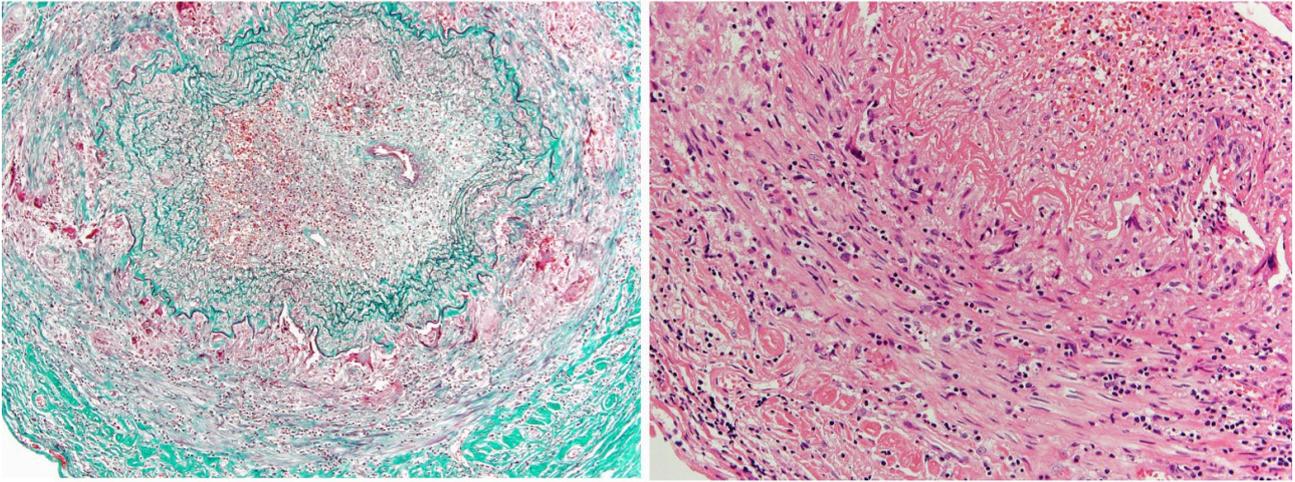


図 1. C-GCA with EECI 側頭動脈生検の組織像

左の E-M 染色で中膜の破壊が明らかであり、右の強拡大の H-E 染色で巨細胞が確認される。GCA として典型的な組織像を示す。

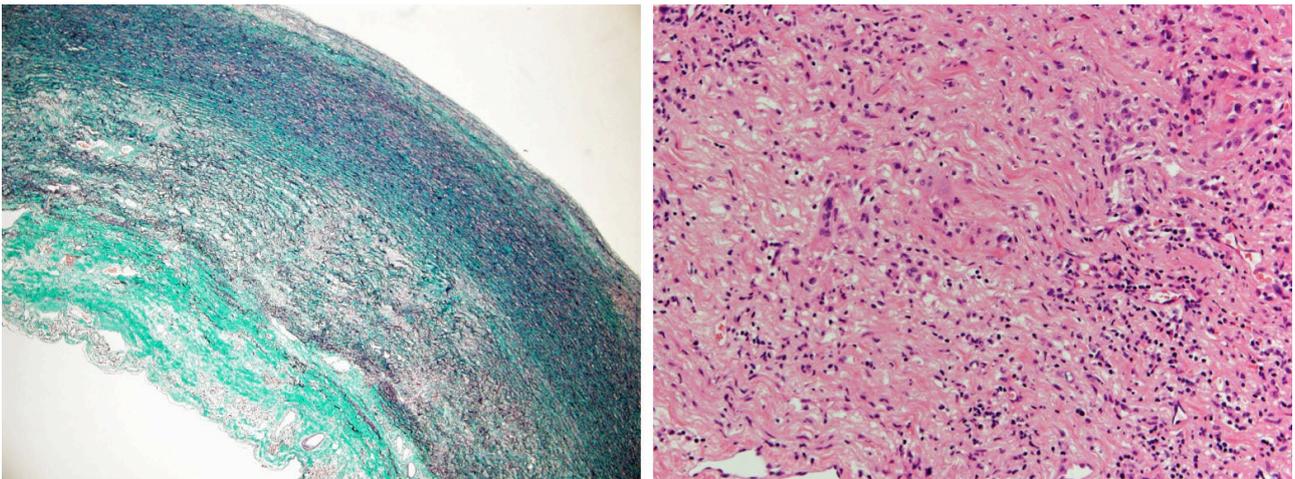
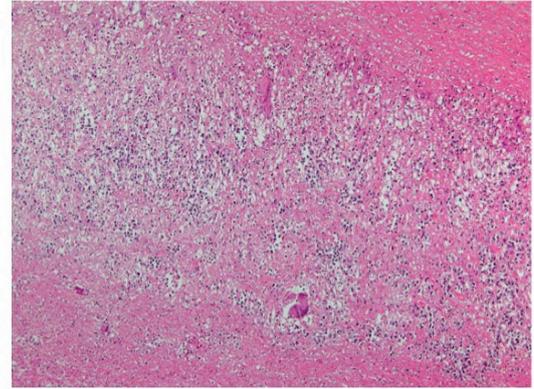
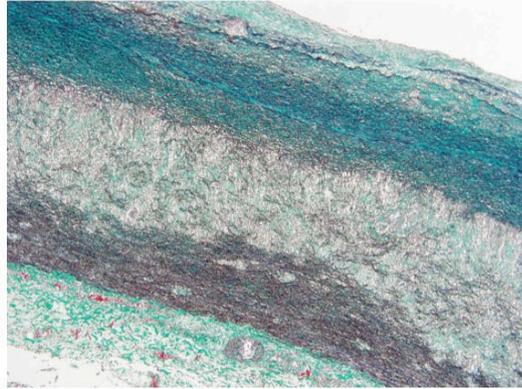


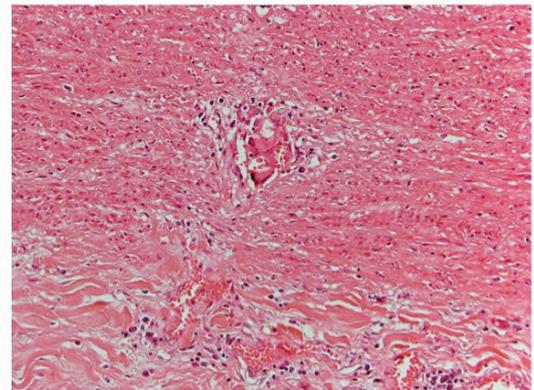
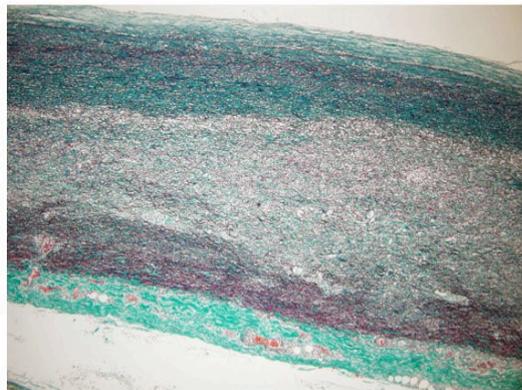
図 2. C-GCA with EECI 大動脈解離切除標本の組織像

左の E-M 染色で中膜の外膜寄りに虫食い状の弾性線維の断裂がみられるが、中膜最外層の弾性線維は保たれ、外膜の線維化は比較的軽微である。右の強拡大の H-E 染色で巨細胞が確認される。

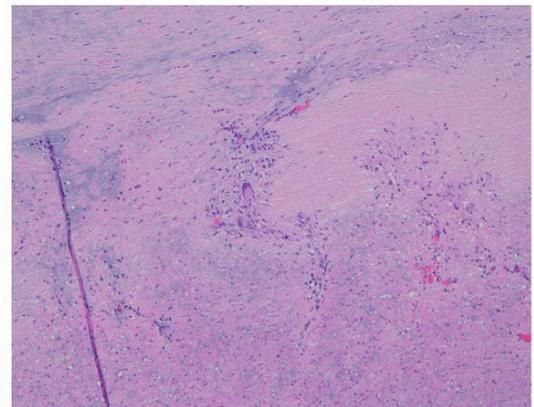
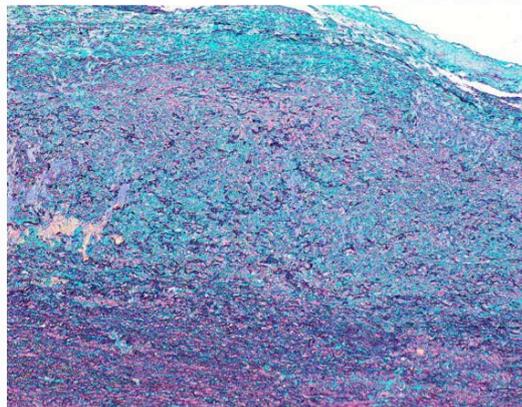
Case 1



Case 2



Case 3



Case 4

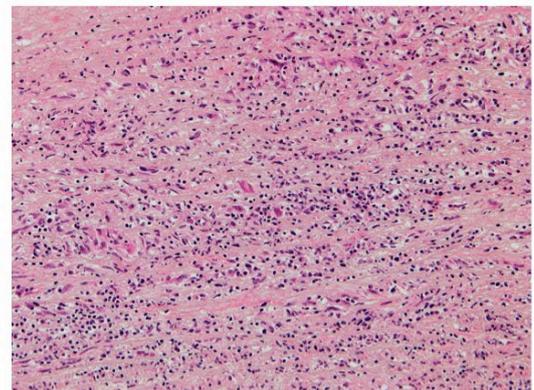
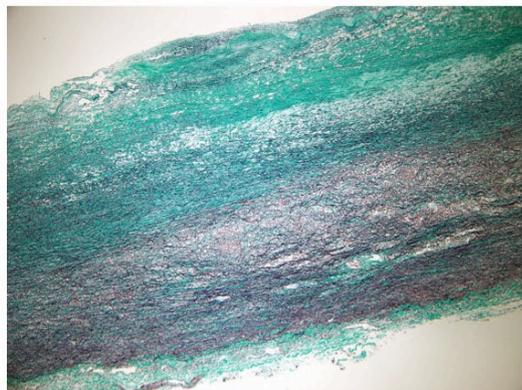


図3. EC-GCA 4例の大動脈病変の組織像

左の E-M 染色で大動脈壁の変化は基本的に C-GCA with EECI と同様である。右の強拡大の H-E 染色でも巨細胞が確認される。Case 1-3 は TP 陰性。Case 4 は TP 未検査。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患政策研究事業)
難治性血管炎の医療水準・患者QOL向上に資する研究班
令和3年度分担研究報告書

臨床病理分科会 AAV の上気道生検組織の病理学的特徴

研究分担者：

石津 明洋 北海道大学 大学院保健科学研究院 病態解析学分野 教授
宮崎 龍彦 岐阜大学 医学部附属病院 病理診断科 教授
黒川真奈美 聖マリアンナ医科大学大学院疾患バイオマーカー・標的分子制御学 大学院教授

研究協力者：

小川 弥生 NPO 法人北海道腎病理センター 副理事長
中沢 大悟 北海道大学病院 内科2 助教
武曾 恵理 田附興風会医学研究所 北野病院 腎臓内科 客員研究員

研究要旨 血管炎病理学的所見における未解明問題として、AAV の上気道生検組織の病理学的特徴を明らかにする課題に取り組んだ。ANCA 関連血管炎(AAV)には GPA の様に上気道の壊死性肉芽腫性病変を形成するものがある。一方で成人の難治性中耳炎のなかにも同一機序で発症する ANCA 関連血管炎性中耳炎(otitis media with ANCA associated vasculitis (OMAAV))があり、GPA との異同が論議されている。そこで、OMAAV の組織学的診断パラメーターを抽出し、GPA、MPA との移動を含む診断基準の策定を行うことを企図して解析に取り組んだ。プレリミナリーな解析では、AAV の上気道生検組織の特徴として、1) 筋性動・静脈炎、2) 筋性動・静脈の閉塞、の2点が正の相関を示すパラメーターとして、3) 浮腫、4) 好酸球浸潤、5) 形質細胞浸潤が負の相関を示すパラメーターとして挙げられた。次に、これらのパラメーターの妥当性を統計学的に検証するため、研究分担者、研究協力者で全組織像をシェアして評価するにあたり、対象症例を training set と、検出したパラメーターを validate する testing set にほぼ偏り無く分け得た。これらのグループ分けを使って、さらに WG 座長の組織において若手病理医に評価させたところ、データの再現性に問題があることが示唆され、その原因を調べたところ、HE 染色標本のみで弾性線維染色のない症例では評価に偏りが出ることが明らかとなった。そこで、再度弾性線維染色を追加したのち組織像をシェアすべく、現在準備を進めている。

A. 研究目的

ANCA 関連血管炎 (AAV) には GPA など上気道の壊死性肉芽腫性病変を形成するものがある。成人の難治性中耳炎のなかにも同一機序で発症する ANCA 関連血管炎性中耳炎(otitis media with ANCA associated vasculitis (OMAAV))があり、GPA

との異同が論議されている。OMAAV は早期診断が難しく、重篤な合併症を生じたり、致死的になったりすることもある。GPA が鼻、耳、眼、上気道および肺の壊死性肉芽腫性病変、全身の中小血管の壊死性肉芽腫性血管炎、腎の壊死性半月体形成性腎炎をトリアスとするが、GPA に伴う中耳炎

では顔面神経麻痺や肥厚性硬膜炎を合併することが多い。また、MPO-ANCA 陽性で急激に進行する感音性難聴や顔面神経麻痺を伴う中耳炎もある。これら ANCA 関連血管炎に伴う中耳炎を OMAAV と呼ぶ。しかし、OMAAV の組織学的な特徴や診断基準は未だ確立されていない。そこで、我々は臨床病理分科会メンバーで OMAAV の組織学的パラメーターを抽出し、GPA, MPA との異同を含む診断基準の策定を行うことを企図し、OMAAV 症例の組織学的特徴の解析に取り組んでいる。

B. 研究方法

対象症例：旭川医科大学で 2000 年から 2017 年までに生検された OMAAV 病変 34 例、および対照症例として慢性副鼻腔炎 32 例、慢性中耳炎 5 例、喉頭肉芽腫 10 例。合わせて 81 症例、206 プレパラートを解析対象とした。解析方法 プレリミナリーな解析として、二重盲検法にて、岐阜大学医学部附属病院病理部の若手病理専門医 4 名がダブルチェックで組織学的パラメーターについて定性的もしくは半定量的に評価した。組織学的パラメーターは、①びらん、②浮腫、③炎症細胞浸潤全体、④線維化、⑤リンパ球浸潤、⑥好中球浸潤、⑦好酸球浸潤、⑧形質細胞浸潤、⑨マクロファージ浸潤を半定量（0～3 の 4 段階）で評価し、①表層の壊死物、②小血管壁の炎症細胞浸潤、③血管内皮へのアンカリング、④肉芽腫形成、⑤筋性動・静脈の閉塞、⑥筋性動静脈の血管炎、⑦小血管増生、⑧不整な血管増生、⑨肉芽様隆起性病変を定性的に評価（あり＝1，なし＝0）、さらに①壊死物の厚み、②ラッセル小体の強拡大 1 視野あたりの数を定量的に評価した。また、①線維化のパターン、②被覆上皮の種類、③主な浸潤細胞については、記述としてデータを蓄積した。

次の段階として、上記の群を Training Set と Testing Set に分けて、研究分担者・研究協力者でその組織像をシェアし、プレリミナリーな解析で見いだしたパラメーターが反映されるか否かを解析すべく、対照群を Training set と Testing set に分け、再度プレリミナリーな解析を WG 座長の施設内で行った。

(倫理面への配慮)

人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に則って実施した。

C. 研究結果

プレリミナリーな解析で有意差を認めた、1) 筋性動・静脈炎の有無、2) 筋性動・静脈の閉塞の有無を正の相関を示す組織学的パラメーター候補、3) 浮腫、4) 好酸球浸潤、5) 形質細胞浸潤を負の相関を示す組織学的パラメーター候補として見いだした。これら各パラメーターの妥当性を検証するために、Training Set と Testing set に分けた。同一患者からの複数生検があるものに関しては、検体を絞り込み、OMAAV 症例数を当初の 34 例から 17 例に訂正した。男女比ほぼ同じで、平均年齢も ± 2 歳以内に収めることができた。

このグループ分けを用いて、再度 WG 座長の施設内で若手病理医の協力のもと再現性実験を行ったところ、HE 染色標本のみで弾性線維染色の無い症例では再現性に問題が見いだされた。そこで、全症例弾性線維染色を施行して、完全な標本セットで解析を続けるべく、現在、準備進行中である。

D. 考察

training set と検出したパラメーターを validate する testing set に分けて設定し、HE 染色標本と弾性線維染色をセットとして今後の解析を進めることにより、統計学的妥当性をもって有効なバイオマーカーとなり得る組織学的パラメーターを確立していくことが期待される。

E. 結論

本プロジェクトは順調に進行している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) なし

COVID-19 in Germany reveals high frequency of myoglobinuria. 第26回日本血管病理研究会.

2. 学会発表

1) Kazuhiro Kobayashi, Maximilian Seidl, Faeq Husain-Syed, Mercedes Noriega, Tobias Huber, Victor Puelles, Hermann-Josef Gröne, Dominic Wichmann, Jan Sperhake, Tatsuhiko Miyazaki, Thorsten Wiech. Post-mortem kidney histopathological analysis in 94 patients with

2) 宮崎龍彦, 新居俊典, 小林一博, 酒々井夏子, 松本宗和. 組換え近交系マウス腎炎・腎血管炎治療モデルを用いた治療抵抗性遺伝子座の解析. 第3回血管炎病因病態研究会.

H. 知的財産権の出願・登録
なし。

表1 Training set と Testing set の群間比較

Data set	Training set	Testing set
N (AAV cases)	16 cases	18 cases
Median age	59.5 y.o.	63.3 y.o.
Male : Femal ratio	7:9	7:11
OMAAV / non-OMAAV	8/6	9/9
Non-AAV	8 cases	9 cases
Median age	50.2 y.o.	49.2 y.o.
Male:Female ratio	5:3	5:4

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患政策研究事業
難治性血管炎の医療水準・患者QOL向上に資する研究班
分担研究報告書

PAN の皮膚病変と皮膚動脈炎の病理学的特徴の相違の同定に関する研究

研究分担者 石津明洋 北海道大学 大学院保健科学研究院 病態解析学分野 教授
研究分担者 川上民裕 東北医科薬科大学 医学部 皮膚科科学教室 教授
班員外研究協力者 加藤千恵次 北海道大学 大学院保健科学研究院 医用生体理工学分野 教授

研究要旨 従来、皮膚生検組織所見から結節性多発動脈炎(PAN)と皮膚動脈炎(CA)を鑑別するのは困難とされてきた。これに対し、人工知能(AI)は約 96%の確度で両者を鑑別したことを、令和 2 年度に報告した。令和 3 年度は、AI が画像のどのような特徴を読み取り、両者を鑑別したかを知ることを目的とした。対象とした 20 枚の PAN の画像から 5001 枚、100 枚の CA の画像から 3600 枚の切り抜き画像を得た。それらを実験的に 8:2 に分割し、Training 画像と Test 画像に分割した。Augmentation を行った Training 画像を AI (Resnet50 アーキテクチャー)に入力し、学習させた。学習済み AI に Test 画像を入力し、鑑別を行わせ、確度を評価した。また、学習済み AI に PAN と CA の画像を入力し、Gradient-weighted Class Activation Mapping (Grad-CAM)を行い、両者の鑑別根拠を可視化した。Test 画像に対する AI の鑑別確度は 99.7%であった。Grad-CAM では、罹患血管のみならず、罹患血管周囲の浸潤炎症細胞や結合組織もヒートマップ表示された。罹患血管に加え、罹患血管周囲の浸潤炎症細胞や結合組織にも着目することで、PAN と CA を鑑別できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

従来、皮膚生検組織所見から結節性多発動脈炎(PAN)と皮膚動脈炎(CA)を鑑別するのは困難とされてきた。これに対し、人工知能(AI)は約 96%の確度で両者を鑑別したことを、令和 2 年度に報告した。令和 3 年度は、AI が画像のどのような特徴を読み取り、両者を鑑別したかを知ることを目的とした。

B. 研究方法

対象とした 20 枚の PAN の画像 (1360×1024 ピクセル) から図 1 のごとく 340×256 ピクセルの画像を切り抜き、5001 枚のサンプル画像とした。同様に、100 枚の CA の画像から 3600 枚の切り抜き

画像を得た。それらを実験的に 8:2 に分割し、Training 画像と Test 画像に分割した。上下左右反転、明度変更による augmentation を行った Training 画像を AI (Resnet50 アーキテクチャー)に入力し、学習させた。学習済み AI に Test 画像を入力し、鑑別を行わせ、確度を評価した。また、学習済み AI に PAN と CA の画像を入力し、Gradient-weighted Class Activation Mapping (Grad-CAM)を行い、両者の鑑別根拠を可視化した。

(倫理面への配慮)

人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に則って実施した。

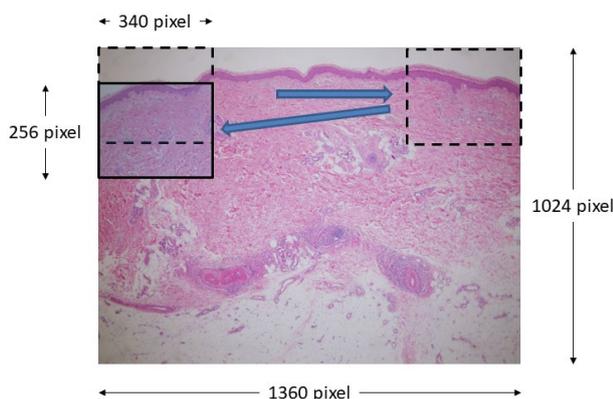


図 1. 皮膚生検画像 (1360x1024) からのサンプル画像 (340x256) の切り抜き

C. 研究結果

Test 画像に対する AI の鑑別確度は 99.7%であった (図 2)。Grad-CAM では、罹患血管のみならず、罹患血管周囲の浸潤炎症細胞や結合組織もヒートマップ表示された (図 3)。

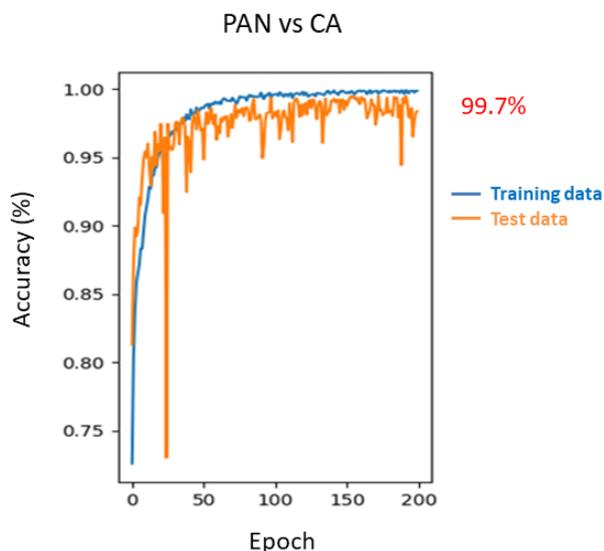


図 2. AI による PAN と CA の鑑別

D. 考察

罹患血管に加え、罹患血管周囲の浸潤炎症細胞や結合組織にも着目することで、PAN と CA が鑑別できる可能性が示唆された。

E. 結論

AI は 99.7% の確度で PAN と CA の皮膚生検画像

を鑑別した。罹患血管に加え、罹患血管周囲の浸潤炎症細胞や結合組織にも着目することで、PAN と CA を鑑別できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ota H, Sato C, Igarashi A, Inoue S, Masuda S, Ishizu A, Watanabe M. Spontaneously regressed granulomatosis with polyangiitis: a case report. *Respiratory Invest* 59(3): 372-376, 2021.
- 2) Kawakami T, Tamura Y, Dong Y, Yoshinari M, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibodies in patients with cutaneous vasculitis: possible involvement in the pathogenesis. *J Dermatol* 48(5): 703-706, 2021.
- 3) Kawakami T, Okiyama N, Kodera M, Seishima M, Yamaguchi Y. The relationship between anti-phosphatidylserine/prothrombin complex IgM antibodies and cutaneous ulcers in patients with cutaneous vasculitis. *J Dermatol* 48(9): 1457-1458, 2021.
- 4) Nishibata Y, Matsuzawa S, Satomura Y, Ohtsuka T, Kuhara M, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Neutrophil fixation protocols suitable for substrates to detect anti-neutrophil cytoplasmic antibodies by indirect immunofluorescence. *Pathol Res Pract* 228: 153661, 2021.
- 5) Iwasaki S, Watanabe T, Tsuji T, Otsuka T, Makita K, Fukasawa Y, Ishizu A. Infliximab-induced granulomatous vasculitis with amyloid deposition in the tongue of a patient with Behçet's disease. *J Clin Rheumatol* 27(8S): S710-S712, 2021.
- 6) Takeuchi S, Kawakami T, Okano T, Shida H, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A, Kadono T. Elevated myeloperoxidase-DNA complex levels

- in sera of patients with IgA vasculitis. Pathobiology 89(1): 23-28, 2022.
- 7) Masuda S, Kato K, Ishibashi M, Nishibata Y, Sugimoto A, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Tsujino I, Ishizu A. Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulation under hypoxia induces nuclear swelling with DNA outflow but not extracellular trap formation of neutrophils. Exp Mol Pathol 125: 104754, 2022.
 - 8) Nishibata Y, Nonokawa M, Tamura Y, Higashi R, Suzuki K, Hayashi H, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of intermolecular epitope spreading in the production of anti-glomerular basement membrane antibody in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Clin Exp Rheumatol (in press)
 - 9) Senda A, Sasai R, Kato K, Nishibata Y, Masuda S, Ishizu A, Takahara N. Involvement of Neutrophil Extracellular Traps in the Pathogenesis of Glomerulonephritis in a Case of Systemic Lupus Erythematosus and Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis Overlap Syndrome. Clin Exp Nephrol Case Rep (in press).
 - 10) Kawakami T, Yokoyama K, Ikeda T, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. The presence of neutrophil extracellular traps in superficial venous thrombosis of Behcet's disease. J Dermatol (in press)
 - 11) Iwama E, Yokoyama K, Ikeda T, Kawakami T. Incompetent saphenous vein in patients with lower leg dermatitis and cramps. J Cutan Immunol Allergy (in press)
 - 12) 川上民裕. IgA 血管炎 (Henoch-Schonlein 紫斑). 皮膚疾患最新の治療 2021-2022 (高橋健造, 佐伯秀久編集) pp78-79. 南江堂 2021.
 - 13) 川上民裕. エリテマトーデスにおける血管炎 蕁麻疹様血管炎も含めて. 皮膚科膠原病 皮膚疹から全身を診る (藤本 学編集) pp113-116. 中山書店 2021.
 - 14) 川上民裕. IgA 血管炎. 体と心 保険総合大百科 (小学校編) 2021. p135. 少年写真新聞社 2021.
 - 15) 川上民裕. 下腿の紫斑. 下腿の「傷」 皮膚診療ドリル あらゆる臨床医のための「皮疹の診かた」問題集 (梅林芳弘編集) pp22-25, pp153-155. 羊土社 2021.
 - 16) 川上民裕. 顕微鏡的多発血管炎. 今日の皮膚疾患治療指針 第5版 (佐藤伸一, 藤本 学, 門野岳史, 梶島健治編集) pp531-534. 医学書院 2022.
 - 17) 川上民裕. 好酸球性多発血管炎性肉芽腫症. 今日の皮膚疾患治療指針 第5版 (佐藤伸一, 藤本 学, 門野岳史, 梶島健治編集) pp534-536. 医学書院 2022.
 - 18) 川上民裕. 多発血管炎性肉芽腫症 (Wegener 肉芽腫症). 今日の皮膚疾患治療指針 第5版 (佐藤伸一, 藤本 学, 門野岳史, 梶島健治編集) pp536-538. 医学書院 2022.
 - 19) 工藤孝司, 中沢大悟, 石津明洋. 好中球細胞外トラップと腎疾患. 日本腎臓学会誌 63(3): 265-273, 2021.
 - 20) 石津明洋. 抗好中球細胞質抗体関連血管炎の病態形成メカニズム. アレルギー 70(5): 372-375, 2021.
 - 21) 石津明洋. ANCA 関連血管炎の実験モデル. 特集: 急速進行性腎炎症候群—Up date. 腎と透析 91(3): 435-438, 2021.
 - 22) 石津明洋. AAV の病態. 特集I ANCA 関連血管炎. 臨床免疫・アレルギー科 76(4): 345-350, 2021.
 - 23) 石津明洋, 益田紗季子, 西端友香. ANCA と NETs. 【糸球体疾患】 特集: 新しい手法を駆使した腎臓病研究の最前線. 腎と透析 91(5): 851-855, 2021.
 - 24) 川上民裕. メポリズマブの再発性難治性好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA) への効果. 臨床皮膚科 75(5): 165-168, 2021.

- 25) 石津明洋. 総論 血管炎の病理. 臨時増刊号「血管炎症候群のすべて」臨床放射線 66(10): 975-981, 2021.
- 26) 石津明洋, 益田紗季子, 西端友香. 小型血管の血管炎. 【血管炎・血管奇形・弁膜疾患】循環器II-血管炎・血管奇形・弁膜疾患- 病理と臨床 39(11): 1116-1122, 2021.
2. 学会発表
- 1) 川上民裕, 田村宥人, 董 宇鵬, 吉成未来, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. ヒストン皮下注射と抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体静脈注射から完成した皮膚血管炎の動物モデル. 第 49 回日本臨床免疫学会総会. 基礎↔臨床シンポジウム 3.
- 2) 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. myosin light chain 6 を認識する抗好中球細胞外トラップ(NETs)抗体は NETs 分解阻害活性を持つ. 第 65 回日本リウマチ学会.
- 3) 山田理紗 高田秀人, 花岡成典, 勝又康弘, 石津明洋, 大原関利章, 針谷正祥. 肉芽腫性血管炎が病因として示唆された肥厚性硬膜炎の 1 例. 第 65 回日本リウマチ学会.
- 4) 益田紗季子, 西端友香, 田中 敏, 外丸詩野, 辻野一三, 石津明洋. 低酸素環境が好中球細胞外トラップ形成へ与える影響. 第 110 回日本病理学会.
- 5) 宮部千恵, 川上民裕. 皮膚血管炎における抑制性共刺激因子の役割. 第 120 回日本皮膚科学会.
- 6) 川上民裕, 田村宥人, 董 宇鵬, 吉成未来, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. 抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体による皮膚血管炎動物モデルの完成. 第 85 回日本皮膚科学会東部支部学術大会.
- 7) 川上民裕, 董 宇鵬, 沖山奈緒子, 小寺雅也, 清島真理子, 長谷川稔, 山口由衣. 皮膚動脈炎患者における多施設共同の抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体測定. 第 85 回日本皮膚科学会東京支部学術大会.
- 8) 川上民裕, 田村宥人, 董 宇鵬, 吉成未来, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. 抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体による皮膚血管炎動物モデルの完成. 第 70 回日本アレルギー学会.
- 9) 川上民裕, 横山華英, 池田高治, 高橋一夫, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. 東北医科薬科大学におけるベーチェット病診療の実態と皮膚生検標本を使用した NETs 免疫染色の検証. 第 4 回日本ベーチェット病学会.
- 10) 麻生里佳, 中沢大悟, 三好敦子, 上田雄翔, 西尾妙織, 外丸詩野, 石津明洋, 渥美達也. ANCA 関連血管炎における CD47・エフェロサイトシスの役割. 第 26 回日本血管病理研究会.
- 11) 柏 航, 加藤千恵次, 西端友香・益田紗季子, 外丸詩野, 川上民裕, 石津明洋. 結節性多発動脈炎と皮膚動脈炎の皮膚生検画像の人工知能による鑑別. 第 26 回日本血管病理研究会.
- 12) 石津明洋. ANCA 関連血管炎の動物モデル. 第 3 回血管炎病因病態研究会.
- 13) 中沢大悟, 工藤孝司, 楠加奈子, 白鳥里佳, 西尾妙織, 外丸詩野, 石津明洋, 渥美達也. シクロフィリン D をターゲットとした ANCA 関連壊死性血管炎に対する新規治療薬の開発. 第 3 回血管炎病因病態研究会.
- 14) 谷口 舞, 荒井粹心, 細井夢花, 進藤綾乃, 北野翔大, 中出一生, 西端友香, 益田紗季子, 清水喬史, 長倉 廷, 寺田 央, 外丸詩野, 石津明洋. MPO-ANCA 関連血管炎モデルを用いた新規好中球機能制御薬の薬効評価. 第 54 回北海道病理談話会.
- 15) 荒井粹心, 谷口 舞, 細井夢花, 進藤綾乃, 北野翔大, 中出一生, 西端友香, 益田紗季子,

清水喬史, 長倉 延, 寺田 央, 外丸詩野, 石津明洋. 新規の好中球機能制御薬が好中球細胞外トラップ(NETs)の形成に及ぼす影響. 第54回北海道病理談話会.

- 16) 佐々木瑞季, 横山華英, 池田高治, 高橋一夫, 川上民裕. COVID-19 感染より発症した IgA 血管炎の一例. 日本皮膚科学会 宮城地方会 第396回例会.

- 17) 川上民裕, 横山華英, 池田高治, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. ベーチェット病皮膚生検標本を使用したNETsの検証. 日本皮膚科学会第150回広島地方会.

H. 知的財産権の出願・登録なし。

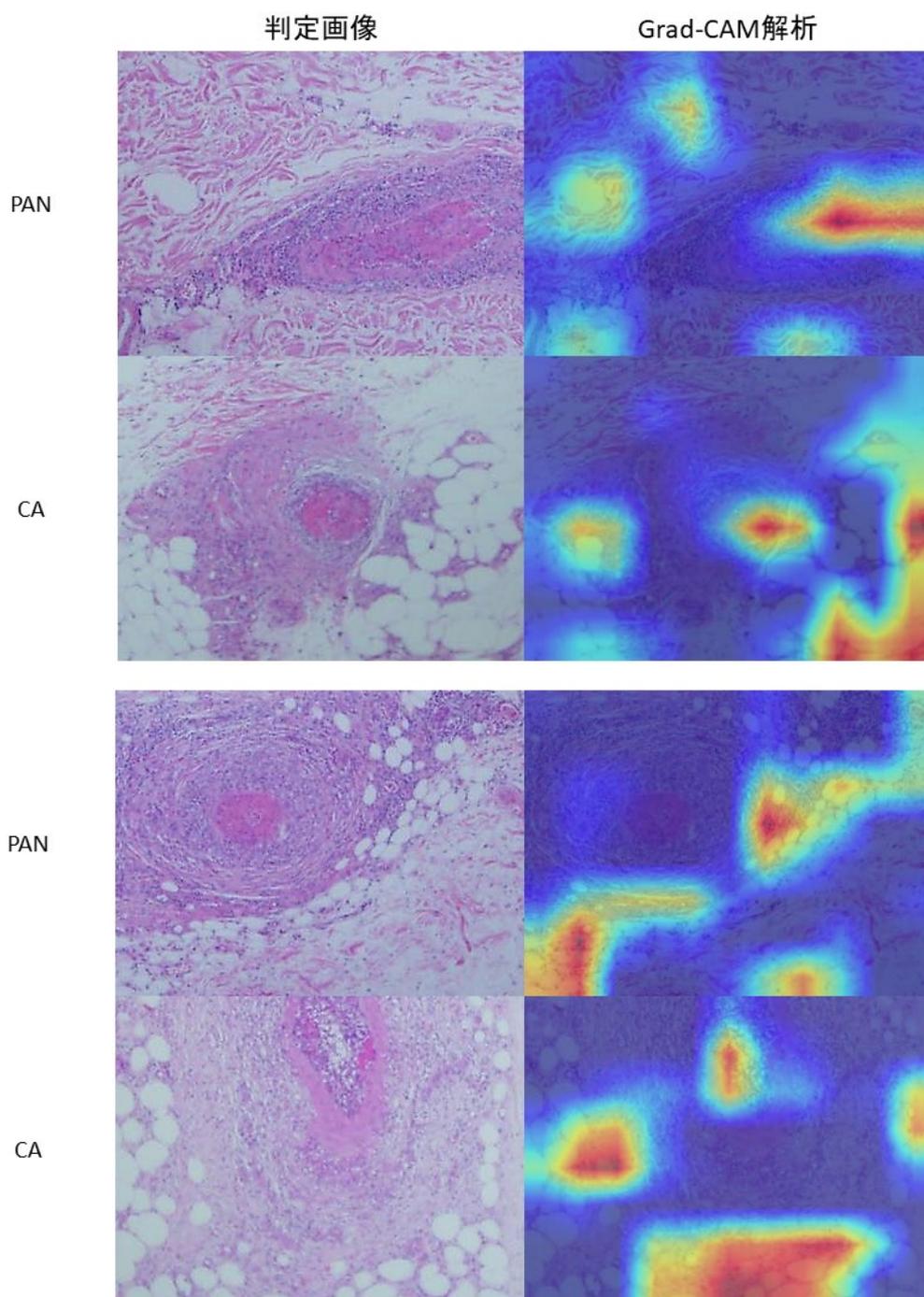


図3. Grad-CAM 解析。ヒートマップ表示がAIの着目点を示している。

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 薄切切片を用いた血管壁免疫グロブリン沈着の検出

研究分担者： 高橋 啓 東邦大学 医学部 教授
宮崎 龍彦 岐阜大学 医学部附属病院 教授
石津 明洋 北海道大学大学院 保健科学研究院 教授
研究協力者： 大原関 利章 東邦大学 医学部 准教授

研究要旨 皮膚 IgA 血管炎では血管壁への IgA の沈着を証明する方法として、凍結切片を用いた蛍光抗体直接法が用いられている。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片において IgA 沈着を証明可能な方法について検討した。その結果、1 次抗体を 24 時間、4°C で反応させ、蛍光抗体間接法を行うことで FFPE 切片でも凍結切片と同程度の陽性像を得ることができた。

A. 研究目的

皮膚 IgA 血管炎の病理診断には、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いたヘマトキシリン・エオジン (HE) 標本による形態診断だけでなく凍結切片を用いた蛍光抗体直接法による血管壁への免疫グロブリン A (Immunoglobulin A, IgA) 沈着の証明が必要である。FFPE 切片と凍結切片は検体採取後の処理が異なる為、2 カ所から皮膚を採取することが多い。FFPE 切片を用いて IgA 沈着を証明できれば皮膚の採取個数を減らすことが出来る。本研究は、FFPE 切片に対して蛍光抗体法を行い IgA 血管炎の診断における有用性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

検討 1 : FFPE 切片に対する IgA 蛍光抗体間接法の有用性の検討

2018 年 1 月～2021 年 2 月の間に当院にて実施さ

れた皮膚生検のなかで、1) IgA 血管炎の臨床診断、2) 白血球破砕性血管炎の病理所見、3) 同時に採取された組織の凍結切片を用いた蛍光抗体直接法で IgA 陽性、を満たした 7 例を対象とした。また、非 IgA 血管炎で、凍結切片による蛍光抗体直接法にて IgA 陰性が確認されている 2 皮膚生検症例を陰性対照、IgA 腎症の腎生検検体で凍結切片に対する蛍光抗体直接法にて IgA 陽性が確認されている 3 症例を陽性対照とした。

各検体の FFPE ブロックから 3 μm 厚の FFPE 切片を作製、脱パラフィン後に精製水に浸漬、0.05% プロテアーゼ (type XXIV SIGMA) で 37°C、30 分処理した。PBS に 5 分浸漬後、1 次抗体 (抗ヒト IgA 抗体 F0204、DAKO) を 37°C、60 分反応させた。PBS にて 5 分間、2 回洗浄の後、FITC 標識 2 次抗体 (抗ウサギ Igs F0205、DAKO) を 37°C、30 分反応させた。PBS で 5 分間、2 回洗浄の後、水溶性封入剤 (fluoromount) で封入した。OLYMPUS 社の落射蛍光

システムと顕微鏡カメラ (DP73, software: WinnR00F2018) を装着した顕微鏡を用いてモニター上で観察し、染色性を評価した。

検討2: FFPE切片を用いたIgA蛍光抗体間接法と直接法の比較、1次抗体の反応条件の検討

2021年2月～2021年11月の間に当院にて1) IgA血管炎の臨床診断のもと皮膚生検が実施され、2)凍結切片による蛍光抗体間接法にてIgAが陽性であった5例と検討1のFFPE切片を用いた蛍光抗体間接法にてIgA陽性であった1例の合計6例を対象とした。また、非IgA血管炎にて皮膚生検が施行され、凍結切片に対する蛍光抗体直接法でIgA陰性が確認されている1例を陰性対照、IgA腎症にて腎生検が施行され凍結切片に対する蛍光抗体直接法でIgA陽性が確認されている1例を陽性対照とした。

蛍光抗体間接法は検討1と同様の方法で行ったが、1次抗体の反応条件を1時間・室温と24時間・4℃の2条件を設定した。蛍光抗体直接法は1次抗体(抗ヒトIgAヤギ抗体(α-chain)106G、MBL)を用い、反応時間については蛍光抗体間接法と同様に2つの条件を設定した。

(倫理面への配慮)

本研究は既存の病理検体とカルテ情報の一部を用いた研究であり、倫理委員会申請後、診療科Webでのオプトアウトで対応した。

C. 研究結果

検討1: FFPE切片に対するIgA蛍光抗体間接法の有用性の検討

陽性対照の全例で糸球体が陽性であること、糸球体以外に陽性所見がないこと、陰性対照の皮膚組織が陰性であることが確認できた。皮膚IgA血管炎7例のうち、1例で真皮上層の血管壁に一致する顆粒状の陽性所見が観察された。しかし、蛍光強度は微弱で注意深い観察を要した。他の6例では明らかな陽性所見を確認できなかった。

検討2: FFPE切片に対するIgA蛍光抗体間接法と直接法の比較および1次抗体の反応条件の検討

陽性対照の糸球体が陽性であること、糸球体以外に陽性所見がないこと、陰性対照が陰性であることを確認した。

蛍光抗体間接法・24時間・4℃では検討1で陽性であった1例を含む全例で比較的明瞭な陽性所見が確認できた。蛍光抗体間接法・1時間・37℃では明瞭な陽性所見が得られたのは2例であり、2例は陽性/陰性の判定が困難、2例は陰性であった。蛍光抗体直接法・24時間・4℃では、4例で比較的明瞭な陽性所見が得られたが、2例は陽性/陰性の判定が困難であった。蛍光抗体直接法・1時間・37℃では陽性は2例にとどまり、4例は陰性であった。

D. 考察

FFPE切片を用いた蛍光抗体法でも陽性対照の糸球体以外の部分が陽性にならず、陰性対照の皮膚組織が陰性であることが確認できた。すなわち今回の検討で偽陽性所見は認められず、FFPE切片に対する蛍光抗体法は特異性の点で大きな問題はないと考えられた。

IgAを高率、高感度で検出する為には、1次抗体を24時間・4℃で反応させる方法が適していた。この条件であれば蛍光抗体直接法でも比較的高い陽性率が得られたが、皮膚IgA血管炎のIgAの陽性強度はIgA腎症におけるIgAの陽性強度と比較して微弱にとどまることが多く、陽性・陰性の判定に迷う場合が少なからずあった。従って、FFPE切片を用いたIgAの証明には、1次抗体の反応時間を24時間・4℃とし、蛍光抗体間接法を用いるのが現時点における最適な方法と考えられた。

今後、より発色の強い蛍光色素の使用、FFPEからのタンパク質抽出法の検討に加え、IgA血管炎の病期による陽性率の差、凍結切片に対する蛍光抗体直接法にて陰性であった皮膚IgA血管炎症例

に対する検討、さらに、感度、露光時間など撮影条件の検討を行う予定である。

E. 結論

FFPE 切片に対する蛍光抗体法は皮膚 IgA 血管炎における IgA 沈着の証明に有用である。FFPE 切片に対して IgA の蛍光抗体法を施行する場合、1 次抗体を 24 時間、4°C で反応させ、間接法を行うことが現時点での最適な方法と考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 石津明洋. 血管炎の病理. 臨床放射線 66(10): 975-981, 2021.
- 2) 石津明洋, 益田紗季子, 西端友香. 小型血管の血管炎. 病理と臨床 39(11): 1116-1122, 2021.

2. 学会発表

- 1) 石津明洋. FFPE 切片を用いた血管壁免疫グロブリン沈着の検出 (進捗報告). 第 9 回日本皮膚科学会新血管炎・血管障害診療ガイドライン改訂委員会. 2021, 11. 28 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録

該当なし

症例	Frozen IgA 直接法 *	FFPE IgA 間接法
1	+	+
2	+	-
3	+	-
4	+, weak	-
5	+, weak	-
6	+, weak	-
7	+	-
Negative control 1	not examined	-
Negative control 2 (PR3-ANCA(+))	not examined	-

*外部施設にて実施された凍結切片による評価
検討① 結果

症例	蛍光抗体 間接法		蛍光抗体 直接法	
	1 時間、 室温	24 時間、 4°C	1 時間、 室温	24 時間、 4°C
1*	+	+	+	+
2	+	+	-	±
3	±	+	-	±
4	-	+	-	+
5	±	+	+	+
6	-	-	-	+
Negative control	-	-	-	-

*検討①の症例 1 と同一例
検討② 結果