

学 位 論 文 題 名

Wegener 肉芽腫症における抗好中球細胞質抗体の
臨床的重要性および発症機序における接着分子の役割

学位論文内容の要旨

Wegener 肉芽腫症（以下WGと略す）は原因不明の、上気道と肺の壊死性肉芽腫性炎、全身の壊死性血管炎および巣状壊死性糸球体腎炎をTriasとする疾患である。以前は臨床症状および生検標本の病理組織において診断がなされてきたが、確定診断を得ることは症状が進んだ典型例を除いては困難であった。1985年 van der WoudeらはWGに特異的であり、かつ疾患活動性の指標となる抗好中球細胞質抗体、Anti-neutrophil cytoplasmic antibody（以下ANCAと略す）を報告した。その後この抗体はWGの診断および病態推移の把握に非常に有用であるとの報告が多くなされている。当教室においても平成2年以降、間接蛍光抗体法、indirect immunofluorescence assay（以下IIFと略す）にて、ANCAの測定を行いその臨床的有用性を確認してきた。本研究ではANCAの臨床的重要性をまとめるとともに、ANCAのELISAでの定量化を試みた。またWGの血管炎の発症機序として、Tumor necrosis factor- α （TNF- α ）等の炎症性サイトカインによる好中球の活性化、好中球の血管内皮細胞への接着、および活性化された好中球からのセリンプロテアーゼ、活性酸素等のケミカルメディエーターの放出が考えられる。本研究ではこのうちの接着分子の関与について検討を加えたので報告する。

ANCAはIIFの蛍光パターンにより2種類に分類される。すなわち好中球細胞質全体が顆粒状に染色されるものがcytoplasmic-ANCA（C-ANCA）、好中球の核周辺が強く染色されるものがperinuclear-ANCA（P-ANCA）である。このうちC-ANCAはWGにはほぼ疾患特異的である。一方P-ANCAは多彩な疾患、すなわち結節性動脈周囲炎（PN）、特発性半月体形成性腎炎（ICr-GN）、潰瘍性大腸炎等で高率に陽性となるとされている。これまでにC-ANCA陽性を示す患者を23名経験した。そのうち22名がWGであり、1名がGoodpasture Syndromeであった。この22名のうち生検で病理学的確定診断がついたのは、わずかに7例のみであった。またWG22例中10例が頭頸部限局型WGであったが、そのうち8例はC-ANCAの結果なしではWGの診断は不可能であった。

一方P-ANCAを示す症例は43名認めた。その半数以上の28名がWG以外の自己免疫疾患であり、その内訳はSjögren症候群12名、全身性エリテマトーデス（SLE）8名、混合性結合組織病（MCTD）2名、強皮症（PSS）、皮膚筋炎（DM）、橋本病、結節性紅斑、Sweet症候群、Relapsing polychondritis各1名であった。腎疾患では急速進行性糸球体腎炎（RPGN）で3名P-ANCA陽性だった。また、脳神経領域では多発性硬化症（MS）で6

名、脳神経麻痺で3名（顔面神経麻痺、舌神経麻痺、動眼神経麻痺各1名）、反復性脳神経炎1名、硬髄膜炎1名でP-ANCA陽性だった。その他難治性咽喉頭潰瘍の1症例でP-ANCA陽性であった。

C-ANCAの抗原はヒト好中球アズール顆粒内のproteinase-3であることが確認されている。そこでホモゲナイズした好中球の上清よりショ糖密度勾配遠心法にてアズール顆粒に含まれる α -fractionを部分精製し、その α -fractionを抗原としてELISAを行った。2次抗体としてペロキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体を使用した。健常人25名のELISA値はすべて10units未満であったため、このELISAでは10units以上を陽性とした。活動期WG20名すべて陽性であり、そのうち7名は100units以上の高値を示した。寛解期WG19名中8名が陽性だったが、そのうち1名のみが高値を示した。WG以外の膠原病32名中14名で陽性だったが、そのうち11名はIIFでP-ANCA陽性であった。P-ANCAの抗原の1つであるミエロペロキシダーゼも α -fractionに存在するため、P-ANCAを示す血清の一部でもこのELISAで陽性にでたものとおもわれる。しかし、同一患者においてはIIF力価とELISA値はよく相関し、疾患活動性を反映していた。このELISAは定量性にもすぐれ、WGの診断および疾患活動性の指標に有用であると思われた。

ところで、WGの血管炎発症機序は好中球の血管内皮細胞への接着が重要であると考えられている。本研究では血管内皮細胞側の接着分子としてE-セレクトインのendothelial cell-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1)およびIgスーパーファミリーのinter-cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)を、好中球側はsialyl Lewis X (SLe^x)およびインテグリンファミリーのleucocyte function associated-1 (LFA-1)を測定した。

ELAM-1は患者血清中の可溶性ELAM-1 (sELAM-1)をELISAで、ICAM-1は可溶性ICAM-1 (sICAM-1)をELISAで測定した。sICAM-1は寛解期WG血清に比べ活動期WG血清で有意に高値を示した。一方sELAM-1は3群間で差は無かった。TNF- α が1pg/ml以上を示す血清はわずかに3血清のみであったが、いずれも活動期WGの血清で、sICAM-1の値も比較的高値の血清であった。また活動期から寛解期に移るにつれ、ほとんどの症例でsICAM-1の測定値が低下することより、sICAM-1の値は疾患活動性と相関することが確認できた。なお同一血清のANCA (α -ELISA)とsICAM-1の値の間には相関を認めなかった。

好中球側の接着分子として、好中球表面のSLe^xとLFA-1陽性細胞をフローサイトメトリーで測定したが、未処理の好中球でそれぞれの陽性細胞がすでに90%以上あり、TNF- α でのprimingや、C-ANCA IgGの刺激等では特に陽性率に変化を認めなかった。LFA-1のようなインテグリンは一般に"resting form"と"active form"があり、conformational changeによりリガンドに対するアフィニティが変わるとされている。よってLFA-1に関しては、さらにbinding assay等の検討が必要と考える。

WGの診断におけるANCAの重要性を報告したが、病因としてのANCAの意義がかなり明らかになっている。近い将来WGとANCAの全容が明かにされるものと考ええる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 犬 山 征 夫

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

Wegener 肉芽腫症における抗好中球細胞質抗体の 臨床的重要性および発症機序における接着分子の役割

Wegener 肉芽腫症（以下WGと略す）は原因不明の、上気道と肺の壊死性肉芽腫性炎、全身の壊死性血管炎および巣状壊死性糸球体腎炎をTriasとする疾患である。以前は臨床症状および生検標本の病理組織において診断がなされてきたが、確定診断を得ることは症状が進んだ典型例を除いては困難であった。1985年 van der WoudeらはWGに特異的であり、かつ疾患活動性の指標となる抗好中球細胞質抗体、Anti-neutrophil cytoplasmic antibody（以下ANCAと略す）を報告した。当教室においても平成2年以降、間接蛍光抗体法、indirect immunofluorescence assay（以下IIFと略す）にて、ANCAの測定を行いその臨床的有用性を確認してきた。本研究ではANCAの臨床的重要性をまとめるとともに、ANCAのELISAでの定量化を試みた。またWGの血管炎の発症機序として、TNF- α 等の炎症性サイトカインによる好中球の活性化、好中球の血管内皮細胞への接着、および活性化された好中球からのセリンプロテアーゼ、活性酸素等のケミカルメディエーターの放出が考えられる。本研究ではこれらの接着分子の関与について検討を加えた。

ANCAはIIFの蛍光パターンにより2種類に分類されるが、WGに特徴的な好中球細胞質全体が顆粒状に染色されるcytoplasmic-ANCA（C-ANCA）陽性を示す患者を23名経験した。このうち生検でWGの病理学的確定診断がついたのは、わずかに7例のみであった。また10例が頭頸部限局型WGであったが、うち8例はC-ANCAの結果なしではWGの診断は不可能であった。以上よりWG早期診断におけるANCAの重要性が示唆された。

C-ANCAの抗原はヒト好中球アズール顆粒内のproteinase-3であることが確認されている。そこでホモゲナイズした好中球の上清よりシヨ糖密度勾配遠心法にてア

ズール顆粒の含まれる α -fraction を部分精製し、その α -fraction を抗原としてELISAを行った。活動期WGはすべて陽性であり、ほとんどの血清は高値を示した。同一患者においてはIIF力価とELISA値はよく相関し、疾患活動性を反映していた。このELISAは定量性にもすぐれ、WGの診断および疾患活動性の指標に有用であると思われる。

ところで、WGの血管炎発症機序は好中球の血管内皮細胞への接着が重要であると考えられている。本研究では血管内皮細胞側の接着分子としてELAM-1 およびICAM-1 を、好中球側はsialyl Lewis X (SLe^x) およびLFA-1 を測定した。

ELAM-1は患者血清中の可溶性ELAM-1 (sELAM-1) を、ICAM-1 は可溶性ICAM-1 (sICAM-1) をそれぞれELISAで測定した。sICAM-1は寛解期WG血清に比べ活動期WG血清中で有意に高値を示した。一方sELAM-1はでは差は無かった。また活動期から寛解期に移るにつれ、ほとんどの症例でsICAM-1の測定値が低下することより、sICAM-1の値は疾患活動性と相関することが確認できた。

好中球側の接着分子として好中球表面のSLe^xとLFA-1陽性細胞をフローサイトメトリーで測定したが、未処理の好中球でそれぞれの陽性細胞がすでに90%以上あり、TNF- α でのprimingや、C-ANCA IgGの刺激等では特に陽性率に変化を認めなかった。LFA-1のようなインテグリンは一般に"resting form"と"active form"があり、conformational changeによりリガンドに対するアフィニティが変わるとされている。よってLFA-1に関しては、さらにbinding assay等の検討が必要と考える。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。