

Myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody 関連血管炎における myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody 産生に関わる T 細胞解析

岩 堀 徹

東京医科大学八王子医療センター腎臓科

(指導: 蓮江正道教授・八王子医療センター長; 吉田雅治助教授・腎臓科部長)

【要旨】 腎および肺の細小血管レベルの血管炎症候（急速進行性糸球体腎炎，肺出血など）を示す，myeloperoxidase (MPO) 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎患者について，MPO-ANCA 産生と T 細胞機能との関連について解析した．未治療活動期 MPO-ANCA 陽性血管炎患者の末梢血単核球に concanavalin (Con)-A を添加培養した結果，培養上清中に MPO-ANCA 産生の上昇が確認された．測定の特異性は精製 MPO 抗原の添加による吸収試験で確認した．この MPO-ANCA 産生上昇は，cyclosporin-A (CyA) 添加および CD4 細胞を除去することにより抑制された．また Con-A 刺激により，培養上清中の interleukin-4 (IL-4) の産生に変化はみられなかったが interferon- γ (IFN- γ) の産生は亢進した．以上より，MPO-ANCA 産生に関わる T 細胞は Th1 細胞と推定された．

はじめに

抗好中球細胞質抗体 (antineutrophil cytoplasmic antibody; ANCA) は，Davies らにより蛍光抗体間接法 (indirect immunofluorescence assay; IIF) により初めて報告された自己抗体である¹⁾．蛍光染色パターンにより，cytoplasmic (C)-ANCA と perinuclear (P)-ANCA に分類される．C-ANCA の対応抗原は好中球細胞質 α 顆粒中の proteinase-3 (PR-3) で，Wegener 肉芽腫症 (WG) に疾患特異性が高い．一方 P-ANCA の対応抗原は主として好中球細胞質 α 顆粒中の myeloperoxidase (MPO) で，顕微鏡的多発動脈炎 (microscopic polyangiitis; MPA) や腎血管炎，pauci immune 型壊死性半月体形成性腎炎 (necrotizing crescentic glomerulonephritis; NCGN)，Churg-Strauss 症候群 (allergic granulomatous angiitis; AGA) などで高率に陽性を呈する^{2,3)}．近年

ANCA の対応抗原が明らかになったことから，ANCA 測定系の酵素抗体法 (ELISA) が確立され ANCA がそのサブセットまで含めて定量的に測定できるようになり，血管炎，膠原病，炎症性腸疾患の早期診断や鑑別診断にきわめて有用であり⁴⁻⁶⁾，とくに血管炎症候群⁷⁾ では，ANCA が陽性か否か，陽性の場合にはそのサブセットにより臨床的に分類できるようになっている．

また一方では，WG において T 細胞機能異常が指摘されており⁸⁾，ANCA 関連血管炎において対応抗原の MPO や PR3 により T 細胞が増殖する⁹⁾ という ANCA 関連血管炎における病態に T 細胞関与の可能性も示唆されている．

本研究では主として腎や肺の血管炎症候を示し臨床頻度の高い MPO-ANCA 関連血管炎を対象とし，まず *in vitro* で MPO-ANCA 産生系を確立することを検討し，次に MPO-ANCA 関連血管炎にお

1998年9月18日受付，1998年10月23日受理

キーワード：抗好中球細胞質抗体，ミエロペルオキシダーゼ，自己抗体産生，T細胞機能，血管炎

(別刷請求先：〒193-8639 東京都八王子市館町1163 東京医科大学八王子医療センター腎臓科 岩堀 徹)

Table 1 Patient profile and clinical findings.

patient no.	age	sex	MPO-ANCA (E unit)	clinical findings of vasculitis
1	52	F	320	RPGN (CrGN), pulmonary bleeding
2	50	M	950	RPGN, CRF
3	84	M	950	RPGN, acute interstitial pneumonitis
4	50	F	750	RPGN, pleuritis
5	70	F	1300	pleuritis

RPGN: rapidly progressive glomerulonephritis

CrGN: crescentic glomerulonephritis

CRF: chronic renal failure

ける MPO-ANCA 産生と T 細胞機能の関連を検討するための研究を試みた。

材料及び方法

1. 対象

Table 1 に示すように 1990 年から 1996 年までに、東京医科大学八王子医療センター腎臓科に受診した MPO-ANCA 陽性血管炎患者 5 例（男性 2 例，女性 3 例，年齢 50 歳より 84 歳，平均年齢 65 歳）を対象とした。血管炎症候は，急速進行性糸球体腎炎 (RPGN) を 4 例，胸膜炎 2 例，肺出血，間質性肺炎各 1 例に認めた。MPO-ANCA 値はニッショー製キットを用いて ELISA で測定し⁶⁾，MPO-ANCA の力価は 405 nm の吸光度で標準血清を用いた検量線より測定した。対象例の測定結果は 320 から 1300 (平均 854) E unit を示した。また，本研究の一部に MPO-ANCA 陰性健常人 5 例（男性 3 例，女性 2 例，年齢 21 歳より 35 歳，平均年齢 28.2 歳）をコントロールとして用いた。

2. 方法

1) *in vitro* MPO-ANCA 測定法

未治療活動期 MPO-ANCA 陽性血管炎患者からヘパリン加で末梢血 20 ml を採取し，Ficoll-Hypaque 液を用いた比重遠心分離法にて単核球 (PBMC) を得た。ELISPOT 法¹⁰⁾ を参考にして PBMC を MPO 抗原が固層化された ELISA 用プレート上に各ウエル 4×10^5 個ずつ播種し，これまでの報告から各種 mitogen (lipopolysaccharide (LPS) 20 μ g/ml, interleukin-1 β (IL-1 β) 10 ng/ml, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 10 ng/ml, concanavalin-A (Con-A) 60 μ g/ml) の条件で添加して 37°C CO₂ incubator で培養した¹¹⁾。72 時間後浮遊細胞と培養液を除去洗浄し，アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体で 37°C 1 時間反応させ洗浄後，ジエタノール

アミンで 1 mg/ml に溶解した発色基質 (p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム) を各ウエルに 200 μ l ずつ添加した。室温で 1 時間発色させ，405 nm の吸光度を用いて測定し，optimal density (O.D.) 値をもって *in vitro* MPO-ANCA 産生量とした。

次に Con-A を 15, 30, 60, 120 μ g/ml の各濃度で添加し PBMC を培養して Con-A の至適濃度を検討した。さらに培養時間を 72, 96, 120 時間としてそれぞれの *in vitro* MPO-ANCA 産生量を測定して至適培養時間を検討した。また，*in vitro* MPO-ANCA 産生の特異性を検討するために，上記培養条件下に精製 MPO 抗原を培養開始時に 10 μ g 添加して吸収試験を行った。次に，主として T 細胞機能に対するシグナル伝達阻害剤であるサイクロスポリン-A (CyA) を 10 ng/ml の濃度で添加して培養し，*in vitro* MPO-ANCA 産生量の変化を検討した。また PBMC を抗 CD4 抗体 (Sigma, St. Louis, USA) 100 μ l で 4°C 60 分反応後，Low-Tox-M rabbit complement (Cederlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canada) を 25 μ l 添加し 37°C 45 分反応させることにより CD4 細胞を除去し，生細胞を Ficoll-Hypaque 液を用いた比重遠心分離法にて分離後洗浄し，上記培養条件で培養して *in vitro* MPO-ANCA 産生量の変化を検討した。

2) 細胞増殖能の検討

未治療活動期 MPO-ANCA 陽性血管炎患者の末梢血をヘパリン加で 20 ml 採取し，Ficoll-Hypaque 液を用いた比重遠心分離法にて得た PBMC を用いた。96 穴プレートに PBMC を 4×10^5 個播種し，各種 mitogen 添加下にて 37°C CO₂ incubator で 84 時間培養後，トリチウム標識サイミジン (³H-TdR) を添加してさらに 12 時間培養した。その後培養細胞をポンプで吸引してグラスファイバーに捕捉させ，シンチレーションカウンターにて計測し，細胞

内 ³H-TdR 取り込み量を測定した. 次に上記培養条件下で CyA を種々の濃度で添加して培養を行い細胞内 ³H-TdR 取り込み量の変化を検討した.

3) 培養上清中のサイトカインの測定

未治療活動期 MPO-ANCA 陽性血管炎患者の末梢血から前記と同条件で得た PBMC を用い, 24 穴プレートに 2 × 10⁶ 個ずつ播種し, Con-A 60 μg/ml 添加下にて 37°C CO₂ incubator で 96 時間培養した. 培養上清を回収し, interleukin-4 (IL-4) と interferon-γ (IFN-γ) を ELISA (MBL 製キット) にて測定した.

4) 統計学的解析

患者における各種 mitogen の効果の比較および, 吸収試験結果, サイトカイン量測定結果の比較および正常人と患者群間の比較は独立 2 群 t 検定で行い, p < 0.05 あるいは p < 0.01 をもって有意とした. 数値はすべて mean ± SD で表示した.

結 果

1. *in vitro* MPO-ANCA 産生の検討

1) 各種 mitogen の作用

Fig. 1 に示すように, 患者 PBMC を mitogen 無添加培養もしくは LPS, IL-1β, TNF-α 添加培養したときの MPO-ANCA 産生量の患者 5 例における平均はそれぞれ 0.22 ± 0.06, 0.21 ± 0.03, 0.21 ± 0.03, 0.23 ± 0.1 O.D. 値であり, Con-A 60 μg/ml を添加培養したときの MPO-ANCA 産生量の患者 5 例における

平均は 0.46 ± 0.03 O.D. 値と有意に上昇していた.

2) Con-A 至適用量, 細胞数, 培養時間の検討

Fig. 2a に示すように, Con-A の添加用量依存性に MPO-ANCA が *in vitro* で産生され, Con-A 60 μg/ml でもっとも大量に MPO-ANCA を産生していた. また細胞数はすべての Con-A 濃度において, 2 × 10⁵ 個に比べ 4 × 10⁵ 個のほうが MPO-ANCA 産生量が多かった. 一方, Fig. 2b に示すように, 培養時間を 96 時間とした際に MPO-ANCA 産生量が最大となった.

3) *in vitro* MPO-ANCA 産生系の特異性の検討

Fig. 3 に *in vitro* MPO-ANCA 産生の MPO 抗原添加による吸収試験をおこなった結果を示す. 精製 MPO 抗原 (ニッショー社製) 10 μg を添加することで, MPO-ANCA 陰性コントロールでは O.D.405 値が 0.24 ± 0.11 から 0.38 ± 0.12 と有意な変化はみられなかったが, 対象患者例では 0.95 ± 0.19 から 0.43 ± 0.12 へ有意に低下し, 吸収試験陽性と判定された.

2. MPO-ANCA 産生に対する T 細胞関与の有無の検討

1) CyA, CD4 細胞関与の検討

MPO-ANCA 産生に対する CD4 T 細胞関与の有無を検討した結果を Fig. 4 に示す. 患者 PBMC を Con-A 60 μg/ml で刺激した時の MPO-ANCA 産生は CyA 10 ng/ml の添加により, Con-A のみに比し有意に低かった. 患者 PBMC から CD4 細胞を補

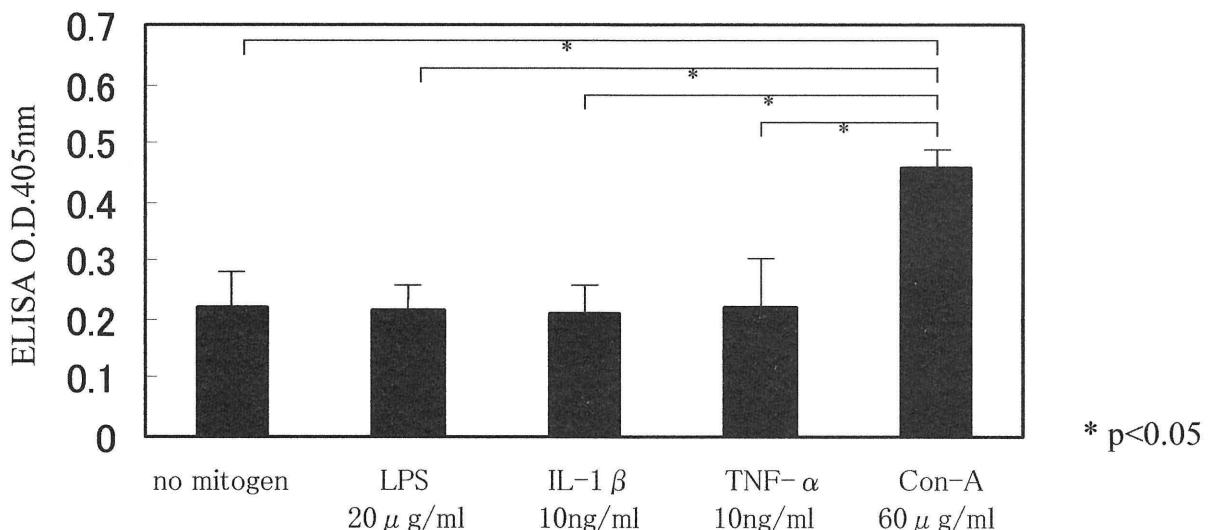


Fig. 1 Effect of several mitogen on *in vitro* MPO-ANCA production by PBMC from MPO-ANCA associated vasculitis (n = 5). Con-A enhanced MPO-ANCA production level but LPS, IL-1β, TNF-α did not.

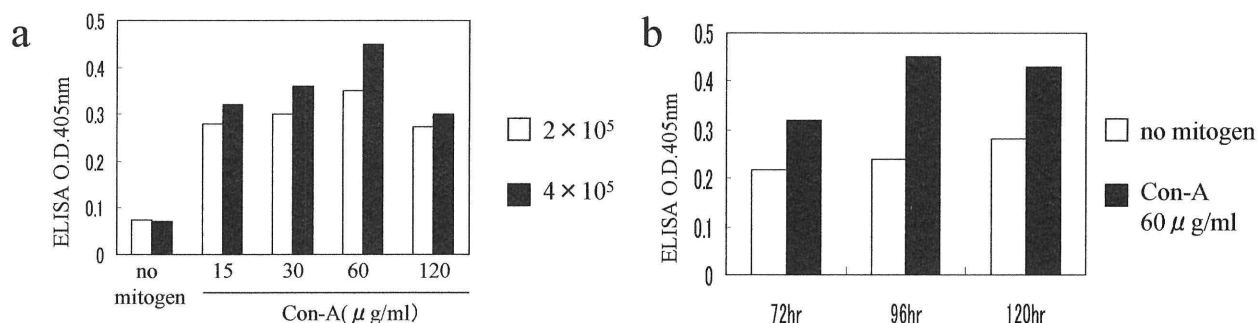


Fig. 2 Effect of Con-A concentration, cell number and incubation time on *in vitro* MPO-ANCA production.
 a) The optimum cell number and concentration of Con-A were 2×10^5 /well and $60 \mu\text{g/ml}$, respectively.
 b) The optimum incubation time was 96 hr.

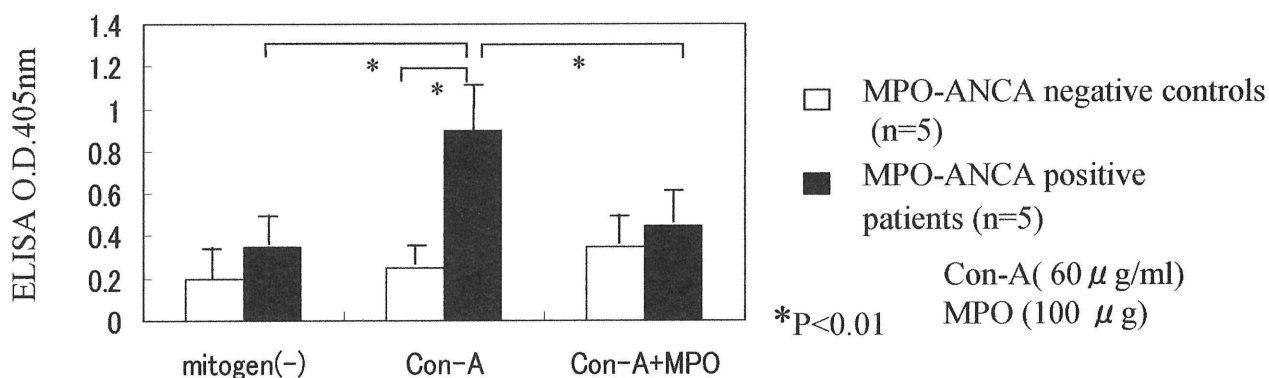


Fig. 3 The absorption test of MPO on *in vitro* MPO-ANCA production was positive.

体依存性に除去し、これに Con-A $60 \mu\text{g/ml}$ を添加培養すると、MPO-ANCA 産生が除去前の PBMC に比し有意に低かった。さらに MPO-ANCA 患者 PBMC の Con-A 添加培養時の細胞増殖能は Fig. 5 に示すように、CyA 濃度依存性に抑制された。

2) 培養上清中の IL-4, IFN- γ 産生の検討

T 細胞機能を検討する目的で Con-A 刺激後の培養上清中の IL-4, IFN- γ 量を ELISA にて測定した結果を Fig. 6 に示した。Con-A を添加した際の IL-4 産生量は MPO-ANCA 陽性患者群・陰性コントロール群間および、陽性患者群での Con-A 添加群・非添加群間に有意差はなかった。一方 Con-A を添加した際の IFN- γ 産生量は陽性患者群が 12 pg/ml と陰性コントロールおよび陽性患者 Con-A 非添加群の 2 pg/ml 以下に比較して有意に産生が亢進していた。

考 察

最近、血管炎症候群の中でも毛細血管、細動静脈を主として侵し、肺、腎の血管炎症候を示す MPA, NCGN の疾患活動性と MPO-ANCA の力価との相関が見出され注目されている¹²⁾。特に、血管炎症候群の中でも ANCA が病因、病態と密接に関連する諸疾患は ANCA 関連血管炎と呼ばれ、血管炎発症機序として ANCA-サイトカイン-sequence 説が想定されている^{12, 13)}。一方、自己抗体の産生については多発性硬化症でのミエリン随伴性糖蛋白抗体や SLE での抗 DNA 抗体など疾患特異的自己抗体を産生する自己免疫疾患では、自己抗体の産生機序に molecular mimicry¹⁴⁾ や epitope spreading¹⁵⁾ などが一役を担っている可能性があると言われている。しかし、ANCA 関連血管炎の ANCA 産生機序に関し

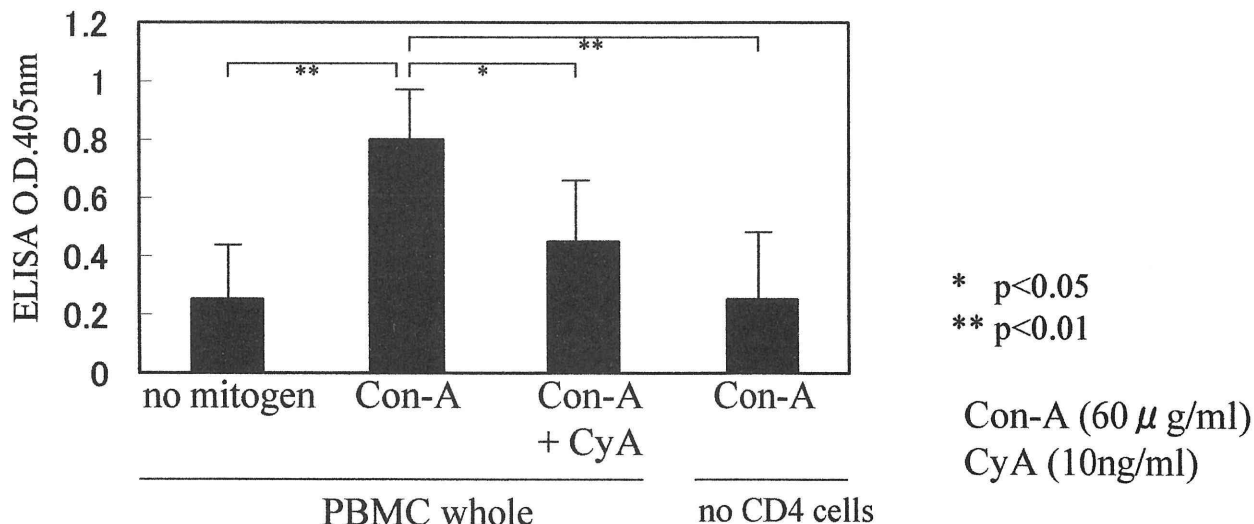


Fig. 4 Effect of cyclosporin-A and CD4 cell depletion of MPO-ANCA production from MPO-ANCA associated vasculitis (n = 5). Cyclosporin-A (CyA) or depletion of CD4 cells inhibited *in vitro* MPO-ANCA production stimulated by Con-A.

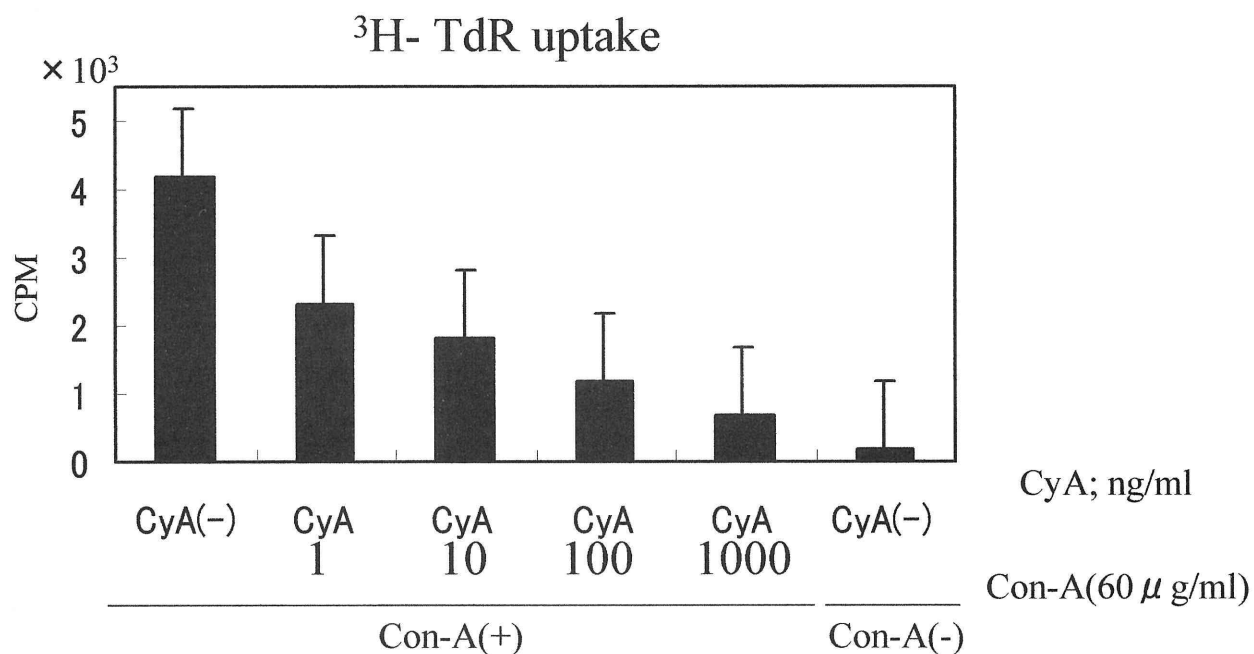


Fig. 5 Effect of CyA on proliferation of PBMC from MPO-ANCA-associated vasculitis (n = 5). CyA inhibited the proliferation of PBMC stimulated with Con-A dose dependently.

では現在までのところまったく不明である。そこで、今回 MPO-ANCA 陽性肺腎症候群をきたした MPO-ANCA 関連血管炎患者を対象として、MPO-ANCA 産生に関わる T 細胞の解析を免疫学的に検討した。

その結果、MPO-ANCA 陽性患者未治療期 PBMC に Con-A を加え、MPO 抗原を固層化したプレート

上で培養することにより、*in vitro* で MPO-ANCA の産生が有意に上昇していたが (Fig. 1)、他の mitogen (LPS, IL-1 β , TNF- α) では MPO-ANCA 産生に変化がみられなかった。しかし、Con-A は非特異的な T 細胞 mitogen であること、および抗原抗体反応と無関係に抗体がウエルに結合したことによる非特異陽性の可能性がある。そこで特異性を

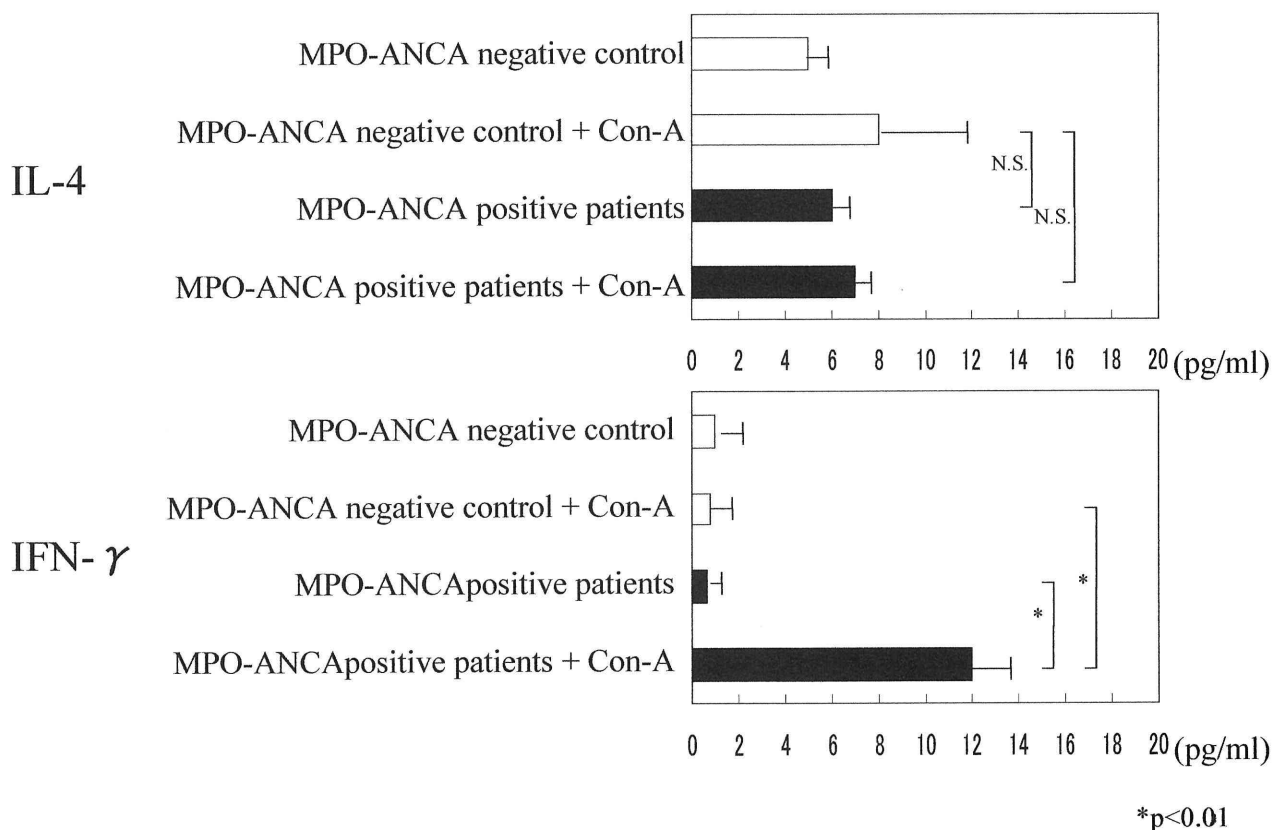


Fig. 6 Analysis of cytokine secretion pattern from PBMC of MPO-ANCA-associated vasculitis (n = 5). Con-A significantly elevated the secretion level of IFN- γ in MPO-ANCA vasculitis but did not change the secretion level of IL-4, compared with normal controls.

検討する目的で、精製 MPO 抗原添加による吸収試験をおこなったところ MPO 抗原 10 μ g を添加することで MPO-ANCA 産生量を表わす O.D. 405 値が有意に低下し、吸収試験陽性であった (Fig. 3)。その他の β -lactoglobulin などの非特異的蛋白では抑制がかからず低下しなかったことより、MPO-ANCA に特異的な *in vitro* 産生系を確立し得たと考えた。一方 B 細胞 mitogen である LPS で MPO-ANCA が産生されなかったのは、MPO-ANCA 産生に T 細胞からのシグナルが必要と考えた。しかし IL-1 β でも MPO-ANCA が産生されていないことより IL-1 β 以外の液性因子が関与しているか、あるいは直接 T 細胞と B 細胞のクロストークが MPO-ANCA 産生に関与していることも推定された。ただ今回は MPO-ANCA 産生に関わる B 細胞に関する知見は得られず、今後検討していく必要がある。次に至適 Con-A 濃度と至適培養細胞数、至適培養時間を決定するために基礎的検討を行ったところ、Con-A 濃度が 60 μ g/ml、細胞数が 4 \times 10⁵ 個/ウエル、培養時間が 96 時間で MPO-ANCA の最大量の産生を

みたので本研究の至適 Con-A 使用量を 60 μ g/ml、至適細胞数を 4 \times 10⁵ 個/ウエル、至適培養時間を 96 時間とした (Fig. 2, 3)。

これまで Wegener 肉芽腫症にて T 細胞機能異常が指摘されたり⁸⁾、ANCA 関連血管炎にて対応抗原の MPO や PR3 にて T 細胞が増殖する⁹⁾ といった ANCA 関連血管炎での T 細胞関与の可能性が示唆されている。しかし ANCA 産生に関する T 細胞関与の報告は現在までのところ見出されていない。今回の実験結果は MPO-ANCA 関連血管炎における MPO-ANCA 産生に T 細胞が直接関与している可能性を示唆するものである。そこで次に、MPO-ANCA が産生される際の T 細胞機能についてさらに解析を試みた。Fig. 1 で示したとおり、T 細胞のレクチンである Con-A でのみ MPO-ANCA が産生されており、T 細胞が MPO-ANCA 産生に何らかの作用を果たしている事が考えられる。そこで我々は、PBMC から CD4 細胞を除去し、またヘルパー T 細胞を選択的に抑制する薬剤である CyA を用いて検討した (Fig. 4)。その結果 CD4 細胞除去で

Con-A のマイトジェン活性をほぼ完全に、CyA 添加で Con-A による MPO-ANCA 産生を前値に比し 55% に抑制した。さらに Fig. 5 に示すように、患者 PBMC を Con-A 60 μ g/ml で刺激した後に CyA を添加することで用量依存的に細胞増殖能が抑制されたことより、ヘルパー T 細胞が MPO-ANCA 産生に密接に関与している可能性が示唆された。また患者 PBMC の培養上清中のサイトカイン量を測定したところ (Fig. 6)、IL-4 量は健常人コントロールと患者間にも、また患者における Con-A 非刺激群と Con-A 刺激群との間にも有意差は認められなかった。しかし、IFN- γ 量は、患者 PBMC を Con-A 刺激した場合にのみ健常人コントロールおよび Con-A 非刺激群と比較し有意な産生亢進を認めた。今回の実験結果から MPO-ANCA 産生に関わる T 細胞は Th1 タイプのヘルパー T 細胞であると推定された。

今後、MPO 抗原特異的 T 細胞株を樹立しさらに検討を加え、ANCA 関連血管炎の病態形成への抗原誘導 T 細胞の関与について検討することは、ANCA 関連血管炎の発症機序の解明および特異的制御につながる重要な研究課題と考えられた。

結 論

1. MPO-ANCA 関連血管炎患者 PBMC を Con-A 刺激することで *in vitro* に MPO-ANCA が産生され、MPO 抗原の添加で吸収されることより、特異的な MPO-ANCA が産生されていると考えられた。

2. *in vitro* での MPO-ANCA 産生は、CyA 添加と CD4 細胞除去により抑制された。

3. MPO-ANCA 関連血管炎患者 PBMC を Con-A 刺激することで培養上清に IFN- γ は産生が亢進したが IL-4 は変化がみられず、MPO-ANCA 産生に Th1 タイプの T 細胞の関与が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜った八王子医療センター長蓮江正道教授および直接指導賜った吉田雅治部長に深甚なる謝意を表します。また終始御協力を頂いた八王子医療センター腎臓科教室の各位ならびに横浜市立大学大学院今川由香利氏に心より感謝致します。

なお、本論文の要旨は第 39 回および第 40 回日本リウマチ学会総会 (平成 7 年、8 年) において発表

した。

また、本研究は厚生省特定疾患免疫疾患調査研究班難治性血管炎分科会 (分科会長 橋本博史教授) の研究費の援助をうけたことを感謝する。

文 献

- 1) Davies DJ, et al. : Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil cytoplasmic antibody. Possible abovirus aetiology? Br Med J **285** : 606, 1982
- 2) 吉田雅治 : 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) サブセットと疾患. 臨床免疫 **28** : 1214~1222, 1996
- 3) 吉田雅治 : 血管炎と自己抗体. 臨床科学 **33** : 1450~1456, 1997
- 4) Kallenberg CG, et al. : Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies : Current diagnostic and pathophysiological potential. Kidney Intern **46** : 1~15, 1994
- 5) 長澤俊彦, 有村義宏, 吉田雅治 : Biocarb 社 ELISA Kit による抗好中球細胞質抗体 (C-ANCA) の測定法と Wegener 肉芽腫症の測定成績. 臨床検査機器・試薬 **15** : 503~510, 1992
- 6) 長澤俊彦, 有村義宏, 吉田雅治 : ニッショー社製 ELISA キットによる MPO-ANCA の基礎的・臨床的検討. 臨床検査機器・試薬 **18** : 127~135, 1995
- 7) Conn DL, Huder GC : Vasculitic syndromes. In Textbook of Rheumatology (Kelly WN, Harris ED, Ruddy S, et al.), pp1167~1198, WB Saunders, 1989
- 8) Brouwer E, et al. : T cell reactivity to proteinase 3 and myeloperoxidase in patients with Wegener's granulomatosis (WG). Clin Exp Immunol **98** : 448~453, 1994
- 9) Griffith ME, et al. : T cell responses to myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3 (PR3) in patients with systemic vasculitis. Clin Exp Immunol **103** : 253~258, 1996
- 10) Fujihashi K, et al. : Cytokine-specific ELISPOT assay-single cell analysis of IL-2, IL-4 and IL-6 producing cells. J Immunol Methods **160** : 181~189, 1993
- 11) Shou L, Schwartz SA and Good RA : Suppressor cell activity after concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors. J Exp Med **143** : 1100~1109, 1976
- 12) 吉田雅治 : 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) と血管炎. リウマチ **35** : 934~942, 1995
- 13) Falk RJ and Jennette JC : ANCA small-vessel vasculitis. J Am Soc Nephrol **8** : 314~322, 1997
- 14) Wucherpfennig KW and Strominger JL : Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity : Viral peptides activated human T cell clones spe-

cific for myelin basic protein. Cell **80** : 695~705, 1995
15) Lehmann PV, Sercarz EE, Forsthuber T, Dayan

CM, Gammon G : Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire. Immunol Today **14** : 203~208, 1993

The effects of T cell function on the production of myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis

Tohru IWAHORI

Department of Nephrology, Hachioji Medical Center of Tokyo Medical University
(Director: Prof. Masamichi HASUE and Chief Masaharu YOSHIDA)

Summary

We analyzed T cell function in patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated vasculitis who had renal or pulmonary microscopic vasculitis, (i.e. rapid progressive glomerulonephritis (RPGN), pulmonary bleeding and/or interstitial pneumonitis). At first we found *in vitro* MPO-ANCA production from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with acute phase MPO-ANCA-associated vasculitis after stimulation by concanavalin-A (Con-A). This specificity of MPO-ANCA production was confirmed by an additional native MPO inhibition test. *In vitro* MPO-ANCA production was inhibited by treatment with cyclosporin-A (CyA) and CD4 cells were depleted. The PBMC from MPO-ANCA secreted interferon- γ (IFN- γ) on stimulation by Con-A but not interleukin-4 (IL-4). These results suggested that the production of MPO-ANCA was mediated by Th1 type T cells.

〈Key words〉 Antineutrophil cytoplasmic antibody, Myeloperoxidase, Autoantibody production, T cell function, Vasculitis
