ELISA による抗ヒト好中球細胞質抗体 (ANCA) の測定

—— Wegener 肉芽腫症における有用性 ——

北海道大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 犬山征夫教授)

滝沢昌彦, 間口四郎, 劉沢周

折館伸彦, 福田諭, 犬山征夫

北海道大学癌研究施設生化学部門 (主任教授: 牧田章)

本家孝一

AN ELISA FOR THE DETECTION OF ANTI-NEUTROPHIL
CYTOPLASMIC ANTIBODIES USING THE CYTOPLASMIC α -FRACTION
—— CLINICAL USE FOR THE DIAGNOSIS OF WEGENER GRANULOMATOSIS
AND FOR MONITORING ITS ACTIVITY ——

MASAHICO TAKIZAWA, M.D., SHIRO MAGUCHI, M.D., TAKUSYU RYU, M.D.
NOBUHIKO ORIDATE, M.D., SATOSHI FUKUDA, M.D. and YUKIO INUYAMA, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo

KOICHI HONKE, M.D.

Biochemistry Laboratory, Cancer Institute, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo

Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) have been reported to be a disease-specific marker for Wegener's granulomatosis (WG). In the present study we developed an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting and quantifying ANCA. The cytoplasmic α -fraction of neutrophils obtained from healthy human donors was used as an antigen. The α -fraction was purified from supernatants of homogenized neutrophils by sucrose gradient centrifugation. Peroxidase conjugated rabbit anti-human IgG was used as a secondary antibody. Diluted sera from 13 patients with WG, 15 with Sjögren syndrome, 1 with polymorphic reticulosis, 3 with relapsing polychondritis, 4 with other collagen diseases, 4 with sinusitis and 18 healthy donors were examined. It was concluded that this ELISA was sufficiently specific and sensitive for WG, and the ELISA units correlated individually with the ANCA titers as determined by an indirect immunofluorescence technique. This ELISA provides precise ANCA quantitation and will be useful for the diagnosis of WG and for monitoring its activity.

Wegener 肉芽腫症

Key words: anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)

A97-0020-90142

ELISA, α -fraction

はじめに

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 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ヒト好中球細胞質抗体, Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (以下ANCAと略す)を報告した¹⁾。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²⁾³⁾⁴⁾。我々も平成2年以降、間接蛍光抗体法(以下IIFと略す)にて、ANCAの測定を行ってきた。しかしIIFは厳密な定量ができず(半定量である)、また判定は肉眼で行い熟練を要する。さらに抗核抗体などの他の自己抗体が共存する場合、判定が困難となるなどいくつかの問題点がある。そこで今回我々は、ヒト好中球 α -fractionを抽出しこれを抗原として酵素免疫測定法(ELISA)でANCAの測定を行い有用な結果を得たので報告する。

対象および実験方法

1. 対象

平成2年1月より平成4年9月までに当科外来受診したWG患者13例(活動期9例, 寛解期10例, ただし6例は活動期から寛解期への移行例), polymorphic reticulosis 1例, relapsing polychondritis 3例, Sjögren 症候群15例, 鼻副鼻腔炎4例, WG以外の膠原病4例(PN 1例, SLE 2例, Sweet 症候群1例)の患者血清を使用した。また, negative controlとして, 健常人18例の血清を使用した。

2. 間接蛍光抗体法(IIF)

Woudeらの方法¹⁾に若干の変更を加え, 間接蛍光抗体法によりANCAの測定を行った。すなわち健常人よりヘパリン採血した血液を3% Dextranにて赤血球と分離し, さらにFicoll-Pacqueによる比重遠沈法にて好中球を分離した。この分離した好中球を無蛍光スライドグラスに伸展し, 95%エタノールにて固定した。このプレパラートに段階希釈した被検者の血清をかけ, 37°Cにて30分反応後リナ酸緩衝生理食塩水にて

C-ANCA

P-ANCA

図1 間接蛍光抗体法によるANCA陽性像
(—— 5 μm)

洗浄した。2次抗体として20倍希釈した FITC 標識ウサギ抗ヒト IgG 抗体 (DAKO 社) をかけ、37°C30分反応後洗浄し、蛍光顕微鏡にて鏡検した。好中球細胞質全体が顆粒状に染色されるものを cytoplasmic-ANCA (C-ANCA)、好中球の核周辺が強く染色されるものを perinuclear-ANCA (P-ANCA) とした。図 1 に共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による C-ANCA および P-ANCA 陽性像を示す。なお、陽性を示す被験者血清の最大希釈倍率をもって ANCA 力価とした。

3. 抗原の精製

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⁵⁾。そこで Brown らの方法⁶⁾ に基づきアズール顆粒の含まれる α -fraction をヒト好中球より精製した。

好中球を 0.34M ショ糖液にて洗浄後、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を破壊した。細胞が 70~80%壊れたことを確かめた後、2000×g で10分間遠心して核と未破壊細胞を除去した。この上清をニトロセルロース遠心管内に形成したショ糖密度勾配 (20~55%W/v) の上に重層し、19000×g で1時間遠心した。遠心後試料を上層より 1ml ずつ分取し、Triton x-100 (最終濃度0.1%) を加え、30秒 sonication (20W, 28KHz) を行った。各 fraction の β -glucuronidase 活性 (アズール顆粒の分画を示す) を phenolphthalein- β -glucuronide を基質として測定した。 β -glucuronidase 活性の高い 5 画分を混合して α -fraction と

した。 α -fraction は使用時まで -80°C で保存した。

4. ELISA

マイクロタイタープレート (Nunk 社) の各 well に、脱イオン水で10倍に希釈した α -fraction を 100 μ l 加え、4°C over night で吸着させた。washing buffer (50mM phosphate buffer saline, 0.05% Tween20, pH 7.4) にて3回洗浄後、10倍希釈の正常ウサギ血清 100 μ l 加え、室温にて2時間 blocking を行った。washing buffer にて3回洗浄後、10倍希釈した測定血清 100 μ l を加え室温にて2時間反応させた。washing buffer にて4回洗浄後、2次抗体として1000倍希釈した peroxidase 標識ウサギ抗ヒト IgG 抗体 (DAKO 社) を 100 μ l 加え再び室温にて2時間反応させた。washing buffer で5回洗浄後、基質 (10mM citrate buffer, o-phenylenediamine dihydrochloride, H₂O₂) を加えた。十分発色した時点で、2N H₂SO₄ で反応を停止し、ELISA reader (MPR-A4, Toyo Soda 社) にて 490nm の吸光度を測定した。なお、測定はすべて triplicate で行った。

結 果

1. 抗原の精製

ショ糖密度勾配による遠心後の各 fraction (上層よりの番号) の β -glucuronidase 活性を図 2 に示す。fraction No. 30 付近に peak を認めた。各 fraction を抗原として ELISA を行くと (1次抗体には IIF にて

図 2 ショ糖密度勾配遠心法にて分離した好中球各 fraction の β -glucuronidase 活性と ELISA での optical density

C-ANCA 陽性の WG 患者血清を使用), β -glucuronidase 活性と一致して ELISA の吸光度が高かった。以上より β -glucuronidase 活性の高値を示す fraction に C-ANCA の抗原が存在することを確認し, β -glucuronidase 活性の高値を示す 5 fraction を混合したものを α -fraction (蛋白量約 400 μ g/ml) として以下の実験の抗原として用いた。

2. ELISA 標準曲線の作成

IIF で高い titer を示す活動期 WG の患者血清より

図3 ANCA-ELISA 標準曲線

イオン交換クロマトグラフィーにて IgG を精製し ANCA 標準液 (蛋白量約 780 μ g/ml) とした。ANCA 標準液を段階希釈して ELISA を行うと図 3 に示す曲線が得られ, これを ANCA-ELISA 標準曲線とした。ELISA を行う際にはプレートごとに ANCA-ELISA 標準曲線を作成した。ここでこの ANCA 標準液を 100 units と定義し, この ANCA-ELISA 標準曲線より患者血清の ANCA の値を求めた。なお ANCA の値が大きすぎ ANCA-ELISA 標準曲線よりはずれる場合は, 血清をさらに 10 倍希釈して再度測定し, 得られた値を 10 倍して ANCA の値とした。

3. 疾患別 ELISA の結果

図 4 に疾患別の ELISA による ANCA の値を示す。健常人 18 名はいずれも 10 units 未満であった。そこで 10 units を cut off 値とし, 10 units 以上を陽性, 10 units 未満を陰性とした。

活動期 WG は 9 例中 8 例で陽性で, そのうち 4 例は 100 units 以上の高値を示した。寛解期 WG は 10 例中 2 例が陽性であったが, その 2 例は 30 units, 20 units とあまり高い値ではなかった。relapsing polychondritis は 3 例とも陰性, polymorphic reticulosis の 1 例は陰性であった。Sjögren 症候群は, IIF で P-ANCA 陽性の 5 例を含め, 15 例すべて陰性であった。鼻副鼻腔炎の 3 例はいずれも陰性であった。collagen disease では, Sweet 症候群の 1 例 (P-ANCA 陽性) のみ 70 units と陽性値であった。SLE の 2 症例は P-

図4 疾患別 ELISA の結果
(IIF で ○ C-ANCA 陽性, △ P-ANCA 陽性, ● ANCA 陰性)

図5 WG 患者血清の IIF 力価と ELISA 値の相関

ANCA 陽性であったが、ELISA は陰性であった。

4. IIF と ELISA の相関

図5にWGのIIFでのC-ANCA力価とELISAによる値との相関を示す。相関係数は0.537でIIF力価とELISAの値はある程度の相関を認めるが、同じ力価でもELISAの値は低値から高値までばらつきがあり、逆にELISAで同程度であってもIIFの力価はばらついていた。

しかしながら、図6に経過を追えたWG3症例のIIF力価とELISAによる値の推移を示すが、同一患者においてIIFとELISAは非常によく相関し、疾患活動性をよく反映していた。

考 察

WGは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とする自己免疫疾患である。以前は発症1年以内に腎不全、呼吸不全等で死亡するという極めて予後の悪い疾患であったが、1983年Fauciらの発表したprednisoloneとcyclophosphamide併用による免疫抑制療法の導入により多くの症例において完全寛解が望めるようになった⁷⁾。しかしこの治療法が奏功するのは発症早期までであり、WGの早期発見、早期治療の重要性が以前にも増して高まっていると考えられる。

WGの診断には病理組織所見が重要であるが、典型的なWGの病理所見すなわち巨細胞を伴う壊死性肉

芽腫とフィブリノイド血管炎を生検中に認めることはまれである⁸⁾。耳鼻咽喉科領域における鼻を中心とする壊疽性疾患として悪性リンパ腫、polymorphic reticulosis等と鑑別が必要であるが、犬山らは病理組織学的確定診断がしばしば困難であることを指摘している⁹⁾。そこで生検以外の診断法が求められてきた。

1985年WoudeらがWGに特異的なIgG型自己抗体ANCAを報告¹⁾して以来、臨床的にその有用性が確かめられている²⁾³⁾⁴⁾。ANCAは蛍光抗体間接法による測定で染色パターンにより2種類に分けられる。すなわち細胞質が顆粒状に染色されるcytoplasmic pattern (C-ANCA)、核の周囲のみ染色されるperinuclear pattern (P-ANCA)で、このうちWGに特異的なのはC-ANCAであり、P-ANCAは結節性動脈周囲炎(PN)や特発性半月体形成性腎炎(ICr-GN)、川崎病などで陽性となるとされている¹⁰⁾¹¹⁾。C-ANCAの対応抗原は好中球内α顆粒中のproteinase-3(一部は57kD cationic proteinとの報告もある)、P-ANCAは同顆粒内のmyeloperoxidaseなどであることが確認されている⁵⁾¹²⁾¹³⁾。

C-ANCAの陽性率に関しては、吉田らは未治療活動期のWGでほぼ100%陽性と報告している¹⁴⁾。報告により多少のばらつきがあるが、WGの60~100%でC-ANCA陽性であり、特に活動期および腎症状を含む全身型WGでANCA力価が高値であることが示されている³⁾¹¹⁾。我々の施設において間口らが、ANCAが

図6 経過を追えたWG 3症例のIIF力価とELISA値の推移

WGの早期診断に有用であるかどうかをみる目的で、ANCA陽性9症例の診断までの経過をretrospectiveに検討した¹⁵⁾。その結果ANCAはWGの早期診断に不可欠な検査法であることを確認している。

ところで、ANCA力価はWGの疾患活動性と相関するといわれているが²⁾³⁾⁴⁾、血沈やCRPが他の併発感染症時にも上昇するのに対し、ANCAは純粹にWGの疾患活動性と相関するとされている。このことはWGの免疫抑制療法を施行する上で、ANCAが疾患活動性のモニターとしても非常に有用な臨床検査であることを意味し、自験例でも確認することができた¹⁶⁾。

間接蛍光抗体法(IIF)でのANCAの測定にはいく

つかの問題点がある。一つは半定量的な検査法であることである。またIIFは肉眼で判定するために、その測定には熟練を要し、プレパラートの状態によっては非特異的蛍光が強く出て判定が困難になることがある。さらに、P-ANCA、抗核抗体等が併存する場合は、IIFでのC-ANCAの判定は不可能となる。以上の問題点より、さらに客観的定量的なANCA測定法が望まれていた。

1987年Savageらは好中球にsodium acetateを加えた後、超音波にて破碎した上清を抗原としてradioimmunoassayを行った¹⁷⁾。しかしこの方法での抗原はcrudeなため、抗核抗体などにも反応しfalse positiveが多かった。そこで1988年Lüdemannらは好中球をphorbol esterで脱顆粒させ、さらにプールした患者血清によるaffinity chromatographyにて精製したpureな抗原を用いてELISA (affinity purified ELISA)を行った¹⁸⁾。このaffinity purified ELISAはfalse positiveもなく、IIFとほぼ相関する結果を得たが、精製できる抗原の量が労力の割には非常に少量であるところに問題があった。そこでRasmussenらは1989年好中球の α -fractionを用いたELISA (α -ELISA)を発表した¹⁹⁾。まず好中球をnitrogen bomb cavitationで破碎し、その上清をPercoll不連続密度勾配にて遠心し分取した。C-ANCAの抗原は α -fraction (β -glucuronidase活性が高い画分で、ここにアズール顆粒が含まれる)にあり、これを抗原としてELISAを行った。affinity purified ELISAに比べ α -ELISAは抗原の収量も多く、また同等の結果を得ることができたと報告している²⁰⁾。

今回我々はRasmussenらの α -ELISAの方法に若干の改良を加えて行った。すなわち抗原の精製の際にPercoll不連続密度勾配のかわりにショ糖密度勾配を使用した。我々の方法でも抗原の精製は十分であり満足できるELISAの結果を得ることができた。疾患特異性に関してみると、活動期WGでIIF C-ANCA陽性のすべての患者血清でELISAも陽性であった。寛解期WGの内2例はIIFでC-ANCA陰性にもかかわらずELISAは低値ながらも陽性であり、IIFよりELISAの方が感度が高いと考えられた。しかし、極めて限局型のWGでも非常に高値を示す例もあり、ANCA IgGのexpressionには個人差があるものと推測される。

ところで、今回のELISAではP-ANCA陽性のSjögren症候群5例はすべてELISAは陰性であり、

myeloperoxidase を認識する P-ANCA は測定しないことが確認できた。Sweet 症候群の 1 例は IIF では P-ANCA 陽性であったが ELISA でも陽性 (70 units) であった。解釈は難しいが、IIF では P-ANCA の強い蛍光のために同時に存在する C-ANCA が隠されてしまった可能性が考えられた。

IIF の C-ANCA 力価と ELISA による値は、IIF による力価が高いほど ELISA の値が高い傾向があるものの非常にばらつきが多かった。Rasmussen らも我々同様に必ずしも相関しない結果を報告している²¹⁾。しかし同一患者に関してみると、IIF と ELISA はよく相関していた。Goldschmeding らは、C-ANCA antigen に 3 つの isoenzyme form が存在する可能性を示しているが¹²⁾、今回我々が IIF で detect したものと ELISA で detect したものは、別の isoenzyme form である可能性も考えられる。

最後に WG 発症に関する C-ANCA の役割についていまだ確認されている知見をもとに考察する。(1) 臨床的に WG の初発症状は感冒様症状が多いこと、感染が relapse を誘発することより、C-ANCA の産生にはある種の感染 (ウイルス?) が先行するものと思われる。(2) 活動期 WG の患者血清中では、IL-1 β , TNF- α , IL-6 の上昇が報告されている¹³⁾²²⁾。Gross らは感染により誘発されたこれらのサイトカインが好中球側の接着分子 (LFA-1) および血管内皮細胞側の接着分子 (E-LAM1) の発現を増加させ、好中球と血管内皮細胞の接着がおこると推察している¹³⁾。(3) C-ANCA の抗原である proteinase 3 はアズール顆粒以外にも好中球、単球の細胞膜にも少量ながら存在することが免疫電顕で確認されている²³⁾。(4) in vitro で、C-ANCA により刺激された好中球の化学発光が促進したとの報告がある²⁴⁾。また、好中球が C-ANCA と結合することにより proteinase 3, myeloperoxidase, 活性酸素などの chemical mediator が放出されることが確認されている²⁵⁾。おそらく血管内皮細胞に接着した好中球より放出されたこれらの chemical mediator が血管炎を誘発するものと思われる。(5) C-ANCA および IL-1, TNF- α などが単球を刺激し、多核巨細胞、肉芽腫の形成をおこすことも推測される。(6) WG の患者の HLA 抗原は、HLA-B8, HLA-DR2 の発現が多いとの報告がある²⁶⁾²⁷⁾。WG の発症には遺伝的要素も考えられる。

以上のように、最近の研究の進歩はめざましく、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 の全容が明らかにされるものとする。

ま と め

- 1) ヒト好中球 α -fraction を抽出し、これを抗原として酵素免疫測定法 (ELISA) により抗ヒト好中球細胞質抗体 (ANCA) を測定した。
- 2) Wegener 肉芽腫症の診断において、ELISA の specificity は間接蛍光抗体法 (IIF) と同等の結果であった。
- 3) Wegener 肉芽腫症の診断において、ELISA の sensitivity は間接蛍光抗体法 (IIF) と同等かそれ以上であった。
- 4) 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。

文 献

- 1) van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S et al: Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* i: 425-429, 1985.
- 2) Lüdemann J, Gross WL: Autoantibodies against cytoplasmic structures of neutrophil granulocytes in Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 69: 350-357, 1987.
- 3) Specks U, Christine L, Wheatley BA: Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow-up of Wegener's granulomatosis. *Mayo Clin Proc.* 64: 28-36, 1989.
- 4) Cohen Tervaert JW, Huitema M, Hené RJ et al: Prevention of relapses in Wegener's granulomatosis by treatment based on antineutrophil cytoplasmic antibody titer. *Lancet* 336: 709-711, 1990.
- 5) Lüdemann J, Utecht B, Gross WL: Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J Exp Med* 171: 357-362, 1990.
- 6) Brown WJ, Shannon WA, Snell WJ: Specific and azurophilic granules from rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biology* 96: 1030-1039, 1983.
- 7) Fauci AS, Hynes BF, Katz P et al: Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. *Ann Intern Med* 98: 76-85, 1983.

- 8) 近藤信雄, 吉木 敬: ウェゲナー肉芽腫症の病理所見. リウマチ科 2: 649-656, 1989.
- 9) 犬山征夫, 福田 諭, 熊谷雅彦: ウェゲナー肉芽腫症の耳鼻咽喉科的病変. リウマチ科 2: 623-629, 1989.
- 10) Falk RJ, Jennette JC: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *New Engl J Med* 318, 1988.
- 11) Falk RJ, Jennette JC: Wegener's granulomatosis, systemic vasculitis, and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Annu Rev Med* 42: 459-469, 1991.
- 12) Goldschmeding R, van der Schoot CE, ten Bokkel Huinink D et al: Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J Clin Invest* 84, 1989.
- 13) Gross WL, Csernok E, Schmitt WH et al: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: immunobiological aspects. *Klin Wochenschr* 69: 558-566, 1991.
- 14) 吉田雅治: ウェゲナー肉芽腫症と自己抗体, リウマチ科 2: 659-662, 1989.
- 15) 間口四郎, 滝沢昌彦, 劉 沢周, 福田 諭, 犬山征夫他: Wegener 肉芽腫症早期診断のための抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 測定の重要性. 日耳鼻 96: 1288-1296, 1993.
- 16) 滝沢昌彦, 間口一郎, 折館伸彦, 福田 諭, 犬山征夫他: 抗ヒト好中球細胞質抗体の推移を追えた Wegener 肉芽腫症の 1 例. 耳鼻と臨床 39: 422-428, 1993.
- 17) Savage COS, Winearls CG, Jones S et al: Prospective study of radioimmunoassay for antibodies against neutrophil cytoplasm in diagnosis of systemic vasculitis. *Lancet* ii: 1389-1393, 1987.
- 18) Lüdemann J, Utecht B, Gross WL: Detection and quantitation of anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis by ELISA using affinity-purified antigen. *J Immunol Methods* 114: 167-174, 1988.
- 19) Rasmussen N, Borregaard N, Wieslander J et al: Alpha-ELISA determination of ANCA and characterization of the ANCA-related antigen. *APMIS* 97 (suppl 6): 40, 1989.
- 20) Rasmussen N, Lüdemann J, Utecht B: ELISA examination for IgG-ANCA in sera submitted for the 1st international workshop on ANCA. *APMIS* 97 (Suppl 6): 21-22, 1989.
- 21) Rasmussen N, Sjölin C, Isaksson B et al: An ELISA for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). *J Immunol Methods* 127: 139-145, 1990.
- 22) Yoshida M, Nagasawa T: Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in collagen diseases associated with vasculitic syndrome in Japan. *Japa J Nephrology* 34: 371-378, 1992.
- 23) Carnok E, Lüdemann J, Gross WL et al: Ultrastructural localization of proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. *Am J Pathol* 137: 1113, 1990.
- 24) Keogan MT, Esnault VLM, Lockwood CM et al: Activation of normal neutrophils by anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Clin exp Immunol* 90: 228-234, 1992.
- 25) Falk RJ, Terrell R, Jennette JC et al: Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) stimulate neutrophil activation in vitro. *Kidney Int* 35: 346, 1989.
- 26) Katz P, Alling DW, Haynes BP et al: Association of Wegener's granulomatosis with HLA-B8. *Clin Immunopathol* 14: 268-271, 1979.
- 27) Elkon KB, Sutherland DC, Rees AJ: Brief report: HLA antigen frequencies in systemic vasculitis: increase in HLA-DR2 in Wegener's Granulomatosis. *Arthritis Reum* 26: 102-103, 1983.

稿を終えるにあたり, この研究に対しご指導, ご助言とご協力をいただきました北海道大学癌研究施設生化学部門 牧田 章教授に深く感謝いたします。また, buffy coat をご提供いただいた北海道赤十字血液センター所長, 関口定美博士に深く感謝いたします。

なお, 本論文の要旨は第11回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会および第94回日本耳鼻咽喉科学会総会にて発表した。

(1993年4月14日受稿 1993年7月29日受理)

別刷請求先 〒060 札幌市北区北15条西7丁目

北海道大学医学部耳鼻咽喉科学教室 滝沢昌彦