各種血管炎における抗内皮細胞抗体 (AECA) と内皮細胞障害について

藤枝 幹也^{*1}・大石 尚文^{*1}・倉繁 隆信^{*1}・伊藤 克己^{*2}

要 旨

川崎病 (KD, $n=19$), アレルギー性紫斑病 (HSP, $n=9$), 紫斑病性腎炎 (HSPN, $n=9$) および IgA 腎症 (IgAN, $n=18$), 対照として健康小人 ($n=20$) を用い, EILSA 法で免疫グロブリン型別抗内皮細胞抗体 (AECA) と内皮細胞障害性を検討した。その結果, 1) KD は急性期に IgG 型, IgM 型共に AECA 値は対照に比して有意 ($P<0.01$) に高値を示し, IgM 型 AECA が検出される割合が多かった。IgA 型 AECA 値は, HSPN と IgAN が対照に比して有意 ($P<0.05$) に高値で, 蛋白尿の多い例が高値であった。2) 細胞障害性は, 補体要求性で KD で有意に認められた。3) 内皮細胞を TNF- α で前処理すると, KD では細胞障害性の増強が認められた。4) KD では, IgM 型 AECA 値と細胞障害度は正の相関を示した。KD の細胞障害性は γ -グロブリン (γ -Glb) 添加により減弱した。以上, KD では, AECA (特に IgM 型) が検出され, 補体依存性の内皮細胞障害性が認められた。HSPN と IgAN は IgA 型 AECA 値が病勢の指標になる可能性が示唆された。

序 言

川崎病 (KD) とアレルギー性紫斑病 (HSP) は, 小児科領域における代表的な血管炎である。前者は冠動脈瘤, 後者は腎炎の合併があり, これら合併症によりその生命予後は大きく左右される。両者の発症機序に関しては, KD で, 抗内皮細胞抗体 (AECA) の関与が報告¹⁾されているものの, いまだ十分な解明は行われていない。今回, 著者らは, 血管炎の発症機序を探る目的で, 免疫グロブリン型別に AECA の存在を検出すると同時に, 内皮細胞障害性の有無を調べ, 一部の症例で TNF- α 処理による結合能と細胞障害性への影響をみ, KD では, 細胞障害に及ぼす γ -グロブリン (γ -Glb) の効果についても検討したので報告する。

対象・方法

1) 対象

KD19例 (男児10例, 女児9例, 平均年齢2歳1カ月), HSP9例 (男児3例, 女児6例, 平均年齢6歳6カ月), 紫斑病性腎炎 (HSPN) 9例 (男児5例, 女児4例, 平均年齢9歳10カ月) および IgA 腎症 (IgAN) 18例 (男児13例, 女児5例, 平均年齢12歳6カ月) さらに健康小人20例 (男児10例, 女児10例, 平均年齢6歳6カ月) を対象とした。血清は, KD の急性期は発病5日以内, 同回復期は発病1カ月以上経過した時点に行い, HSP は, 発病2週間以内, HSPN と IgAN は, 発病 (検尿異常出現) 1カ月以内に, 採取し測定まで -80°C

^{*1}高知医科大学 小児科

(〒783 高知県南国市岡豊町小蓮)

^{*2}東京女子医科大学 腎臓病総合医療センター 小児科
Antiendothelial cell antibodies and cytotoxicity against endothelial cell in various vasculitis of childhood.

Mikiya Fujieda^{*1}, Naobumi Oishi^{*1}, Takanobu Kura-shige^{*1}, Katsumi Ito^{*2}

^{*1}Department of Pediatrics, Kochi Medical School

^{*2}Department of Pediatrics, Kidney Center, Tokyo Women's Medical College

Key Words : 川崎病

アレルギー性紫斑病

IgA 腎症

抗内皮細胞抗体

内皮細胞障害

図1 a IgG calss anti-endothelial cell antibody (IgG-AECA) in the patients with various vasculitis and IgA nephropathy (IgAN)

で保存した。

2) 方法

①AECA の測定

Tizard らの方法²⁾に準じ、ELISA 法で行った。即ち、ヒト臍帯静脈から得た2～3継代目の内皮細胞 (EC) 1×10^5 個/ml100 μ lを0.1%ゼラチン被覆の96穴プラスチックプレートに蒔き、2～3日後、1%グルタルアルデヒドで固定した。被検血清 ($\times 200$) 100 μ lを加え、室温で18時間反応後、Horse raddish peroxidase (Cappel 社) 標識抗ヒト IgG ($\times 5,000$), 抗ヒト IgM ($\times 6,000$), 抗ヒト IgA ($\times 6,000$) を100 μ lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間培養後十分に洗浄し、3, 3', 5'-tetramethylbenzidine (TMB)/H₂O₂ (Vector 社) を100 μ l加え、10分間反応後、1 Mリン酸100 μ lを加えて反応を停止させ OD450nmで吸光度を測定した。陽性対照との比率を AECA 値 (%) とした。健康小人の平均 $\pm$ 2 SD以上 (IgG 型, IgM 型, IgA 型 AECA 値すべて40%以上)を陽性とした。

②EC 障害性の測定

Leung ら¹⁾の方法に準じた。即ち、EC を96穴プレートに蒔き、2～3日後に被検血清 ($\times 100$) 50 μ lを加え、37 $^{\circ}$ C, 6時間培養後、ウサギ補体 (Cappel 社) 10 μ lを添加し、37 $^{\circ}$ C, 30分間反応させた。細胞障害度は、3 - (4, 4-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyl tetrasodium bromide (MTT) 還元法で行った³⁾。MTT 5 mg/mlを各 well に10 μ l添加し、4時間反応後、培養液を除去し、洗浄後 DMSO100 μ lを加え OD570nmで吸光度を測定した。血清のかわりに PBS を加えた時

の吸光度で各検体の吸光度を割った値を生存率とし、EC 障害度 (%) は、100 - 生存率 (%) で表示した。

③TNF- α 前処理の影響

一部の症例で、EC を TNF- α (持田製薬) 100IU/ml で4時間前処理をし、AECA の EC 結合性と、EC 障害性に及ぼす影響をみた。

④ γ -Glb の影響

一部の KD 症例で、EC 障害性の測定系に、被検血清と共に γ -Glb (ミドリ十字) 10mg/mlを加え抑制効果の有無を検討した。

結 果

1) AECA 値 (図1)

①IgG 型 AECA (図1 a)

IgG 型 AECA は、急性期 KD19例中5例で検出され、IgG 型 AECA 値は $40.6 \pm 12.8\%$ (平均 $\pm$ SD) と健康小児20例の $26.3 \pm 6.8\%$ に比して有意 ($P < 0.01$) に高値を示した。また KD の IgG 型 AECA 値は、急性期から回復期にかけて有意 ($P < 0.01$) な低下がみられた。HSP, HSPN および IgAN では、HSP の1例のみ陽性であったが、他はすべて陰性で、AECA 値は、それぞれ、 $32.6 \pm 13.0\%$ ($n = 9$), $28.9 \pm 6.2\%$ ($n = 9$), $22.4 \pm 7.4\%$ ($n = 18$) と HSP で高値の傾向がみられたが、健康小児と有意差は認められなかった。

②IgM 型 AECA (図1 b)

IgM 型 AECA は、急性期 KD19例中8例で検出され、IgM 型 AECA 値は $41.2 \pm 18.5\%$ で、健康小児20例の $23.4 \pm 8.3\%$ に比して有意 ($P < 0.01$) に高値を示し

図 1 b IgM class anti-endothelial cell antibody (IgM-AECA) in the patients with various vasculitis and IgAN

図 1 c IgA class anti-endothelial antibody (IgA-AECA) in the patients with various vasculitis and IgAN

た。さらに KD の IgM 型 AECA 値は、IgG 型 AECA 値同様に、急性期から回復期にかけて有意 ($P < 0.01$) な低下が認められた。HSP, HSPN および IgAN の IgM 型 AECA 陽性者は、それぞれ 0 例/9 例, 2 例/9 例, 3 例/18 例で、AECA 値は、それぞれ、 $26.6 \pm 7.2\%$ ($n = 9$), $31.8 \pm 7.8\%$ ($n = 9$), $30.2 \pm 8.5\%$ ($n = 18$) と HSPN と IgAN で高値の傾向がみられたが、有意差は認められなかった。

③IgA 型 AECA (図 1 c)

IgA 型 AECA は、KD 急性期で 1 例のみを検出されたが、AECA 値は $27.4 \pm 7.2\%$ ($n = 19$) で健康小人 20 例の $23.4 \pm 8.3\%$ と差はみられなかった。一方、HSP,

HSPN および IgAN の IgA 型 AECA 陽性者は、HSP ではみられないが、HSPN と IgAN は、3 例/9 例, 5 例/18 例と比較的高頻度に認められ、これらの例は、高度蛋白尿 (1 g/日以上) 例であった。AECA 値は、HSP $26.0 \pm 5.4\%$ ($n = 9$), HSPN $34.6 \pm 5.9\%$ ($n = 9$) および IgAN $36.7 \pm 6.9\%$ ($n = 18$) で、後 2 者は健康小人に比して有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。

④TNF- α 前処理の影響 (表 1, 2)

EC を TNF- α 100IU/ml で 4 時間前処理した時の、AECA の EC 結合能の変化を検討した。急性期 KD 10 例で、IgG 型 AECA 値は、無処理 $40.0 \pm 14.3\%$ で、処理後 $42.2 \pm 14.1\%$ であり、IgM 型 AECA 値は、無処理

表1 Effect of TNF- α on binding of HUVEC with AECA in the patients with KD

Serum donor			HUVEC treatment	
			None	TNF- α
IgG - AECA	Acute KD	1	32.0	39.0
		2	62.1	63.5
		3	33.7	39.1
		4	35.0	38.2
		5	66.0	66.7
		6	48.2	50.0
		7	39.0	36.1
		8	32.5	35.2
		9	22.0	20.5
		10	29.6	33.8
		40.0 $\pm$ 14.3	42.2 $\pm$ 14.1	
Control (n = 20)		26.3 $\pm$ 6.8	26.8 $\pm$ 5.0	
IgM - AECA	Acute KD	1	76.2	77.0
		2	60.0	61.2
		3	70.4	68.5
		4	64.0	84.2
		5	40.0	41.5
		6	41.2	42.0
		7	63.1	64.2
		8	23.4	23.0
		9	22.6	21.7
		10	20.0	20.8
		48.1 $\pm$ 21.3	50.4 $\pm$ 23.8	
Control (n = 20)		28.4 $\pm$ 5.7	29.8 $\pm$ 5.0	

48.1 $\pm$ 21.3%で、処理後50.4 $\pm$ 23.8%と処理後結合能の増加が認められた(表1)。一方、IgA型AECAの結合能は処理による変化はみられなかった。HSPN 9例とIgAN10例での検討では、IgG型とIgM型AECAの結合能に変化はみられなかった。IgA型AECA値は

表2 Effect of TNF- α on binding of HUVEC with IgA class AECA in the patients with IgAN and HSPN

Serum donor		HUVEC treatment	
		None	TNF- α
IgAN	1	55.0	55.2
	2	50.2	60.3
	3	54.1	53.0
	4	54.2	54.0
	5	26.8	27.1
	6	39.7	38.5
	7	42.3	44.1
	8	29.0	29.0
	9	40.0	41.4
	10	34.1	35.0
		42.5 $\pm$ 10.5	43.8 $\pm$ 11.5
HSPN	1	37.0	38.0
	2	41.2	40.7
	3	29.3	29.5
	4	48.7	50.2
	5	43.0	44.0
	6	37.1	38.0
	7	42.1	43.0
	8	33.2	33.2
	9	37.3	37.8
		38.8 $\pm$ 5.7	39.4 $\pm$ 6.1
	Control (n = 20)	25.6 $\pm$ 4.6	28.4 $\pm$ 10.3

HSPNでは処理前38.8 $\pm$ 5.7%、処理後39.4 $\pm$ 6.1%で、IgANはそれぞれ42.5 $\pm$ 10.5%、43.8 $\pm$ 11.5%と両者とも有意ではないが、増加が認められた(表2)。

2) EC 障害

①EC障害性(図2)

KD急性期、HSP、HSPNおよびIgAN全例、補体非存在下では、EC障害は認められなかった。補体存在下では、KD急性期19例36.6 $\pm$ 14.8%、HSP 9例

図2 Cytotoxicity against HUVEC in the patients with various vasculitis and IgAN

表3 Effect of TNF- α with gammaglobulin (γ -Glb) on cytotoxicity against HUVEC in the patients with KD

Serum donor		HUVEC cell treatment			
		None	γ -Glb	TNF- α	TNF- α + γ -Glb
Acute KD	1	60.0	40.8	67.8	43.5
	2	78.5	48.5	90.0	52.3
	3	59.2	50.3	63.8	56.2
	4	33.6	26.9	36.2	33.8
	5	14.6	14.9	14.8	12.8
Control	1	18.2	16.4	20.4	19.0
	2	14.0	12.7	14.3	13.4

17.6 $\pm$ 5.6%, HSPN 9例22.3 $\pm$ 9.6%およびIgAN18例25.1 $\pm$ 8.9%で、健康小人20例の20.2 $\pm$ 8.5%に比して、KDのみ有意 ($P < 0.01$) に高値を示した。健康小人の平均+2SD以上 (37.2%以上) を陽性とする、KDは6例/19例、HSPはなく、HSPN 2例/9例、IgAN 4例/18例の頻度で陽性者がみられた。KDでは冠動脈病変を有する例はEC障害性が高度であり、EC障害度とIgM型AECA値は正の相関 ($P < 0.05$) がみられた。また、HSPNとIgANのEC障害陽性者は、全例、高度蛋白尿 (1g/日以上) の例であったが、EC障害度とIgA型AECA値に相関は認められなかった。

②TNF- α 前処理の影響 (表3)

HSPN 9例とIgAN10例では、TNF- α 前処理により、EC障害性増強は認められなかった。一方、KD急性期5例では、処理前49.2 $\pm$ 25.1%、処理後54.5 $\pm$ 29.3%と有意 ($P < 0.05$) なEC障害の増強がみられた。

③ γ -Glb添加の影響 (表3)

KD急性期5例で γ -Glb無添加時、49.2 $\pm$ 25.1%で γ -Glb添加により36.3 $\pm$ 15.1%と、EC障害を抑制させることができた。TNF- α で前処理した系においても、54.5 $\pm$ 29.3%から39.7 $\pm$ 17.3%と γ -Glb添加よりEC障害の抑制が認められた。

考 察

AECAは、SLEなどの膠原病で検出されることが多く、血管炎発症の一因とする報告がみられる⁴⁾。KDにおいてもAECAの存在が報告され、AECAによる血管内皮細胞障害が示唆されている¹⁾。今回、著者らの検討でもAECAが急性期に多くの例で検出され、AECA値も、IgG型とIgM型では急性期に有意な高値を示した。IgA型AECA値は、健康小人に比して若干高値であったが、有意差はみられなかった。EC障害性は、Leungらの報告¹⁾と異なり、ECをサイトカイン前処理するこ

となく、補体存在下にKD急性期1/3の例で認められた。そして、IgM型AECA値とEC障害度の間に正の相関がみられたことから、KD急性期は、補体依存性で、AECA (特にIgM型) によるEC障害性が存在することが示唆された。

今回の検討で、KD急性期に、IgG型AECA値が高値であったことは、過去の報告¹⁾⁵⁾と異なる点であるが、この理由として、急性期の血清採取時期が早期である点、被検血清の稀釈倍数が低いことため検出されやすいことが考えられた。また、サイトカインの前処理なくEC障害性がみられたことは、Kanekoら⁹⁾が指摘するように、KDのAECA対応抗原は、平常の状態 (非活性時) で表出しているEC表面抗原の可能性が強いと思われ、今後、対応抗原の検討を進めていく予定である。

KDに対する大量 γ -Glbの有効性⁹⁾については、疑う余地のないところだが、その効果発現機序はいまだ不明な点が多い。今回、 γ -Glbの作用機序を探る目的のために、Leungら⁷⁾の方法に準じ、被検血清と同時に γ -Glb (最終濃度10mg/ml) を添加することによるEC障害度の変化をみた。その結果、 γ -Glb添加によりEC障害の抑制が観察された。このことは、低濃度 (0.1~10mg/dl) の γ -Glb添加では、AECAのEC結合に影響を及ぼさない (データ未発表) ことを考え併せると、 γ -GlbによるEC障害抑制は、AECAと補体の結合を阻止あるいは、補体依存性のEC障害系を促進させる血清中サイトカインなどの因子を中和させた結果によることが推測された。

HSPとHSPNにおけるAECAの検討は、検索しえた範囲内では、みあたらないが、IgANに関しては、1988年のYapらの報告以来⁸⁾、散見され、IgANの多数例でIgA型AECAが検出されている⁴⁾⁸⁾。著者らの検討では、HSPの1例を除き、他のHSPおよびHSPNとIgANの全例でIgG型とIgM型AECAは検出されなかった。IgA型AECAは、HSPでは検出されなかったが、HSPNの9例中3例、IgANの18例中5例と比較的高頻度に検出され、かつHSPNとIgANのIgA型AECA値も対照に比して有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。さらにIgA型AECA陽性例は、いずれも高度蛋白尿 (1g/日) の例であり、組織像では半月体形成の割合が多い例であった。これはYapらが指摘した、成人期IgANでは、40歳以下の症例で、半月体形成率 (10%以上) の多い例、巣状壊死病変を有する例にIgA型AECAが有意に検出されるという報告⁸⁾を一部肯定する結果であり、IgA型AECA値はHSPNとIgANの疾患活動性の良き指標になると思われた。

HSP, HSPN および IgAN における, 補体依存性の EC 障害性は, HSPN の 9 例中 2 例, IgAN の 18 例中 4 例に認められるものの, その障害度は低値で, IgA 型 AECA 値と EC 障害度に相関がみられなかった点から, これらの疾患においては, AECA による EC 障害性の存在は確認しえなかった。今後, KD 同様, IgA 型 AECA の対応抗原と, AECA の EC 結合の特異性を検討していく必要があると思われる。

文 献

- 1) Leung DYM, Collins T, Lapierre LA, Geha RS, Pober JS. : Immunoglobulin M antibodies present in the acute phase of Kawasaki syndrome lyse cultured vascular endothelial cells stimulated by gamma interferon. *J Clin Invest.* 77 : 1428—1435, 1986.
- 2) Tizard EJ, Baguley E, Hughes GRV, Dillon MJ. : Antiendothelial cell antibodies detected by a cellular based ELISA in Kawasaki disease. *Arch Dis Child.* 66 : 189—192, 1991.
- 3) Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. : Reexamination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, 119 : 203—210, 1989.
- 4) Wang MW, Walker RG, Kincaid-Smith P. : Clinicopathologic association of antiendothelial cell antibodies in immunoglobulin A nephropathy and lupus nephritis. *Am J Kid Dis.* 22 : 378—386, 1993.
- 5) Kaneko K, Savage COS, Pottinger BE, Shah V, Pearson JD, Dillon MJ. : Antiendothelial cell antibodies can be cytotoxic to endothelial cells without cytokine pre-stimulation and correlate with ELISA antibody measurement in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 98 : 264—269, 1994.
- 6) Furusho K, Kamiya T, Nakano H, Kiyosawa N, Shinomiya K, Hayashidera T, Tamura T, Hirose O, Manabe Y, Yokoyama T, Kawarano M, Baba K, Baba K, Mori C. : High-dose intravenous gammaglobulin for Kawasaki disease. *Lancet*, ii : 1055—1057, 1984.
- 7) Leung DYM, Cotran RS, Kurt-Jones E, Burns JC, Newburger JW, Pober JS. : Endothelial cell activation and high interleukin-1 secretion in the pathogenesis of acute Kawasaki disease. *Lancet*, ii : 1298—1302, 1989.
- 8) Yap HK, Sakai RS, Bahn L, Rappaport V, Woo KT, Ananthuraman V, Lim CH, Chiang GSC, Jordan SC. : Antivascular endothelial cell antibodies in patients with IgA nephropathy ; Frequency and clinical significance. *Clin Immunol Immunopathol.* 49 : 450—453, 1988.