アレルギー性紫斑病と IgA 腎症における抗内皮細胞抗体 (AECA) と臨床像との関連について

藤枝 幹也*¹・大石 尚文*¹・倉繁 隆信*¹・伊藤 克己*²

要 旨

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, ELISA 法で牛糸球体内皮細胞 (GEN) に対する抗内皮細胞抗体 (AECA) の存在と, その臨床的意義について検討した。その結果, AECA 値は, 対照の平均値+2SD 以上を陽性とした場合, 1)IgA 型 AECA は, HSPN 9 例中 5 例, IgAN 18 例中 5 例に検出され, それぞれの IgA 型 AECA 値も, 対照に比して有意 ($P<0.01$, $P<0.05$) に高値を示した。2)IgG 型 AECA は HSP の 1 例のみで検出された。3)IgA 型 AECA の GEN に対する結合は, GEN lysate と線維芽細胞 lysate により抑制されたが, 牛血清アルブミン添加では抑制はみられなかった。4)IgA 型 AECA 陽性例は, 1g/日以上蛋白尿あるいは細胞性半月体が10%以上存在する例であった。以上, GEN に対する AECA の存在は, HSPN や IgAN における腎炎の活動性の指標になる可能性が示唆された。

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 in Henoch-Schonlein purpura and IgA nephropathy in childhood: Frequency and clinicopathologic significance.

Mikiya Fujieda*¹, Naobumi Oishi*¹, Takanobu Kurashige*¹, Katsumi Ito*²

*¹Department of Pediatrics, Kochi Medical School

*²Department of Pediatric Nephrology, Kidney Center, Tokyo Women's Medical College

序 言

抗内皮細胞抗体 (AECA) は, SLE に代表される膠原病¹⁾²⁾や, Wegener 肉芽腫症や microscopic polyarteritis の全身性血管炎³⁾さらに, 小児科領域では川崎病でその存在が報告されている⁴⁾。

著者らは, 小児科領域の代表的な血管炎である川崎病, アレルギー性紫斑病 (HSP) と紫斑病性腎炎 (HSPN), 又 IgA 腎症 (IgAN) でヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) に対する AECA を検討し, HSPN と IgAN では, IgA 型 AECA 値が病勢の指標になる可能性を報告した⁵⁾。今回は, HSP, HSPN および IgAN において, 牛糸球体内皮細胞 (GEN) に対する AECA の存在を調べ, 同時にその臨床病理学的意義についても検討したので報告する。

対象・方法

1)対象

HSP 9 例 (男児 3 例, 女児 6 例, 平均年齢 6 歳 6 カ月), HSPN 9 例 (男児 5 例, 女児 4 例, 平均年齢 9 歳 10 カ月) および IgAN 18 例 (男児 13 例, 女児 5 例, 平均年齢 12 歳 6 カ月) さらに対照として健康小児 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。血清採取時は, 全例腎機能は正常範囲内 ($\text{Ccr} \geq 80 \text{ ml/min/1.73m}^2$) であった。血清採取は, HSP は発病 2 週間以内, HSPN と IgAN は発病 (検尿異常出現) 1 カ月以内に行い, 測定まで -80°C で保存した。

2)方法

Key Words : アレルギー性紫斑病

IgA 腎症

抗内皮細胞抗体

腎糸球体血管内皮細胞

図1 IgG AECA binding activity in patient groups and normal controls. The broken line indicates the upper limit of the normal range.

①AECA の測定

GEN は既報⁶⁷⁾の如く採取し、 1×10^4 個/well の濃度で0.1%ゼラチン被覆の96 well microtiter plate に蒔き、1%グルタルアルデヒドで固定した。被検血清 ($\times 200$) $100\mu\text{l}$ を加え、室温で18時間反応後、horseradish peroxidase (Cappel 社) 標識抗ヒト IgG あるいは抗ヒト IgA (それぞれ $\times 5,000$) を $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で1時間培養後十分に洗浄し、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)/ H_2O_2 (Vector 社) を $100\mu\text{l}$ 加えた。10分間反応後、OD 450nm で吸光度を測定した。陽性対照との比率を AECA 値 (%) とした。健康小児の平均 + 2 SD 以上 (IgG 型 AECA 値は32.8%以上, IgA 型 AECA 値は30.6%以上) を陽性とした。

②抑制試験

AECA の GEN に対する結合の特異性を確認する目的で、種々の濃度の GEN lysate, ヒト線維芽細胞 lysate および牛アルブミンと共に IgA 型 AECA 陽性血清を 4°C , 2時間反応させた後 AECA 測定を行った。各 lysate は、それぞれの細胞を冷 lysis buffer (0.5% Triton X-100, $1\mu\text{M}$ EDTA) で溶解させることにより得た⁸⁾。抑制度は、PBS のみと反応させた時の AECA 値との比率で求めた。

③ヒト線維芽細胞に対する結合

ヒト線維芽細胞に対する IgA の結合能を、GEN と同様 ELISA 法で行い、OD 450nm で吸光度を測定した。

④臨床病理像との関連

IgA 型 AECA 存在と、検尿所見および病理組織像との関連について、主に HSPN と IgAN の患児で検討した。

結 果

1) AECA 値

①IgG 型 AECA

IgG 型 AECA 陽性者は、HSP の1例のみであった。IgG 型 AECA 値は、HSP, HSPN および IgAN と対照の間に差は認められなかった (図1)。

②IgA 型 AECA

IgA 型 AECA 陽性者は、HSPN 9例中5例, IgAN 18例中5例認められた。IgA 型 AECA 値は、HSPN 9例が $28.4 \pm 8.7\%$, IgAN 18例は $23.8 \pm 10.6\%$ で対照20例の $18.2 \pm 6.2\%$ に比して有意 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) に高値であったが、HSP 9例は $20.2 \pm 4.4\%$ で対照と有意差は認められなかった (図2)。

2) 抑制試験

IgA 型 AECA 陽性の HSPN と IgAN それぞれ5例ずつ計10例の血清で検討した。GEN lysate とヒト線維芽細胞 lysate で GEN を前処置した場合、IgA 型 AECA の GEN に対する結合は阻害された。牛アルブミン前処置による結合阻害は軽度であった (図3)。

3) ヒト線維芽細胞に対する結合

IgA 型 AECA 陽性者10例 (HSPN 5例, IgAN 5

図2 IgA AECA binding activity in patient groups and normal controls. The broken line indicates the upper limit of the normal range.

図3 Inhibition curve derived from five HSPN and five IgAN patients who were positive for IgA AECA. Values are percentage inhibition $\pm$ SD.

例), IgA 型 AECA 陰性者10例 (HSPN 4例, IgAN 6例) および対照10例のヒト線維芽細胞に対する IgA 結合能を OD 値で示すと, それぞれ 0.51 ± 0.15 , 0.30 ± 0.06 および 0.28 ± 0.08 で, IgA 型 AECA 陽性者の OD 値は, 他2群に比して有意 ($P < 0.01$) に高値を示した (図4)。

4) 臨床病理学的検討

図4 IgA binding to fibroblasts in IgA AECA positive (five HSPN and five IgAN patients) and IgA AECA negative sera.

血清 IgG, IgA 値と IgG 型, IgA 型 AECA 値の間には, 相関は認められなかった。HSP と HSPN の間で, IgA 型 AECA 陽性例は全例 HSPN であった。HSPN と IgAN において, IgA 型 AECA の存在と 1 日蛋白尿 1 g 以上の間には有意 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) な相関がみら

表1 Associations between the presence of IgA AECA and clinicopathologic parameters in HSPN and IgAN patients.

	HSPN (n = 9)			IgAN (n = 18)		
	AECA- Positive	AECA- Negative	P Value	AECA- Positive	AECA- Negative	P Value
Urinalysis						
Urine red blood cell						
< 20/HPF	0/5 (0 %)	1/4 (25 %)	NS	2/5 (40 %)	5/13 (38 %)	NS
≥ 20/HPF	5/5 (100 %)	3/4 (75 %)	NS	3/5 (60 %)	8/13 (62 %)	NS
Proteinuria						
< 1.0 g/day	0/5 (0 %)	3/4 (75 %)	p < 0.05	0/5 (0 %)	12/13 (92 %)	p < 0.01
≥ 1.0 g/day	5/5 (100 %)	1/4 (25 %)	p < 0.05	5/5 (100 %)	1/13 (8 %)	p < 0.01
Histology						
Pattern						
MGA + FGN	0/5 (0 %)	2/4 (50 %)	NS	0/5 (0 %)	11/13 (85 %)	p < 0.01
DPGN	5/5 (100 %)	2/4 (50 %)	NS	5/5 (100 %)	2/13 (15 %)	p < 0.01
Cellular crescents						
> 10 %	4/5 (80 %)	1/4 (25 %)	NS	4/5 (80 %)	1/13 (8 %)	p < 0.01

MGA : minor glomerular abnormality. FGN : focal glomerulonephritis
DPGN : diffuse proliferative glomerulonephritis. NS : not significant

れた。さらに IgAN では、IgA 型 AECA 存在と細胞性半月体の割合 (10%以上) の間に有意 (P<0.01) な相関が認められた (表1)。また IgAN で、糸球体毛細血管壁に IgA の沈着がみられた例は、IgA 型 AECA 陽性例であった。

考 察

AECA は SLE に代表される膠原病や川崎病で、免疫的機序による血管炎で多く報告^{1)~5)}されている。動物実験でも、モルモットに血管内皮細胞膜を接種することにより腎炎を惹起でき、かつ糸球体毛細血管とメサンギウムに IgG と C3 が沈着し、血清中に AECA が検出されることから、AECA による腎組織障害の可能性が報告されている⁹⁾。

HSP は皮膚に IgA の沈着がみられ、HSPN と IgAN では主としてメサンギウムに IgA が沈着しており、これらは糸球体毛細血管壁に、IgA や補体の沈着が認められる例もある。このように、上記疾患では発症に IgA の沈着が深く関与していると考えられている。

Yap ら¹⁰⁾や Frampton ら¹¹⁾は、成人の IgAN において、約1/3の症例で、HUVEC に対する IgA 型 AECA が検出されると報告した。今回の検討では、GEN に対する IgA 型 AECA は、その陽性頻度は IgAN の28%に認められ、前述の報告とほぼ同一の結果であった。HSP と HSPN における AECA の検討は、著者らは報告⁹⁾以外、検索しえた範囲では認められない。今回、両者の GEN に対する IgA 型 AECA は、HSP は検出例はなかったが、HSPN では約半数と比較的高率に認められた。

今回の検討で検出された IgA 型 AECA は、GEN lysate のみでなく線維芽細胞 lysate によっても GEN に対する結合が抑制されること、さらに、IgA 型 AECA 陽性血清が、同陰性血清よりも線維芽細胞への結合が強いことから、GEN に対して特異的に結合しているといえず、GEN と線維芽細胞の双方の表面抗原を認識していることが示唆された。

IgA 型 AECA 陽性例の臨床病理学的検討では、HSPN と IgAN において、IgA 型 AECA の存在と、蛋白尿量 (1 g/日以上)、細胞性半月体の比率 (10%以上) の間で有意な相関が認められた。また、IgAN で、糸球体毛細血管壁に IgA の沈着がみられた例は、IgA 型 AECA 陽性例であった。これらのことは、IgA 型 AECA の存在は、腎炎の活動性を示す良き指標になると考えられた。一方、腎組織障害と IgA 型 AECA の関連では、IgA 型 AECA が糸球体毛細血管に結合することにより、炎症反応を誘導し、血管内皮障害を惹起するという機序が推測され、今後、IgA 型 AECA による糸球体毛細血管内皮障害について検討を重ねる予定である。

文 献

- 1) Cines DB, Lyss AP, Reeber M, Bina M, Dehoratius RJ : Presence of complement-fixing anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. J Clin Invest. 73 : 611-625, 1984.
- 2) Quadros NP, Roberts-Thomson PJ, Gallus AS : IgG and IgA anti-endothelial cell antibodies in patients with collagen disorders. Rheumatol Int. 10 : 113-119, 1990.
- 3) Frampton G, Jayne DRW, Perry GJ, Lockwood CM, Cameron JS : Auto-antibodies to endothelial cells and neutrophil

- cytoplasmic antigens in systemic vasculitis. Clin Exp Immunol. 82 : 227-232, 1990.
- 4) Leung DYM, Colins 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.
 - 5) 藤枝幹也, 大石尚文, 倉繁隆信, 伊藤克己 : 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. 日本小児腎臓病学会雑誌 8 : 145-150, 1995.
 - 6) Nitta K, Simonson MS, Dunn MJ : The role and regulation of prostaglandin biosynthesis in cultured bovine glomerular endothelial cells. J Am Soc Nephrol. 2 : 156-163, 1991.
 - 7) Uchida K, Ballermann BJ : Sustained activation of PGE₂ synthesis in mesangial cell cocultured with glomerular endothelial cells. Am J Physiol. 263 : C200-C209, 1992.
 - 8) Johnstone A, Thorpe R : Isolation fractionation of lymphocytes. Solubilization of cells and membranes, in Immunocytochemistry in Practice (ed 2). Blackwell, London, UK, p105, 1987.
 - 9) Matsuda M : Experimental glomerular tissue injury induced by immunization with cultured endothelial cell plasma membrane. Acta Pathol Jap. 38 : 823-839, 1988.
 - 10) 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 : 450-462, 1988.
 - 11) Frampton G, Jayne DRW, Perry GJ, Lockwood CM, Cameron JS : Auto-antibodies to endothelial cells and neutrophil cytoplasmic antigens in systemic vasculitis. Clin Exp Immunol 82 : 227-232, 1990.