HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗原の変化が抗好中球細胞質抗体や抗糸球体基底膜抗体の検出と自己免疫病態に及ぼす影響
Author(s)	西端, 友香
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	乙第7180号
Issue Date	2023-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7180
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90218
Type	doctoral thesis
File Information	Yuka_Nishibata.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

抗原の変化が抗好中球細胞質抗体や抗糸球体基底膜抗体の検出と

自己免疫病態に及ぼす影響

西 端　　友 香

北海道大学大学院保健科学院

２０２３年度

目次

略語表 2

要約 4

序章 7

第 1 章 間接蛍光抗体法の抗好中球細胞質抗体検出基板における好中球固定法の違いによる抗原性の変化 10

1-1. 緒言 11

1-2. 対象と方法 14

1-3. 結果 17

1-4. 考察 26

1-5. 結論 28

第 2 章 治療抵抗性抗糸球体基底膜抗体病の抗糸球体基底膜抗体が認識するエピトープ 29

2-1. 緒言 30

2-2. 対象と方法 31

2-3. 結果 35

2-4. 考察 42

2-5. 結論 45

第 3 章 抗好中球細胞質抗体に続き抗糸球体基底膜抗体が産生されるメカニズム 46

3-1. 緒言 47

3-2. 対象と方法 48

3-3. 結果 53

3-4. 考察 65

3-5. 結論 70

総括 71

謝辞 72

文献 73

業績一覧 82

略語表

AAV	:	anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis
ANA	:	anti-nuclear antibody
ANCA	:	anti-neutrophil cytoplasmic antibody
AP	:	alkaline phosphatase
APCs	:	antigen-presenting cells
BPI	:	bactericidal permeability increasing protein
c-ANCA	:	cytoplasmic ANCA
CBB	:	Coomassie brilliant blue
Col(IV)	:	type IV collagen
CRP	:	C-reactive protein
DAB	:	3,3'-diaminobenzidine
DAPI	:	4,6-diamidino-2-phenylindole
EGPA	:	eosinophilic granulomatosis with polyangiitis
EIA	:	enzyme immunoassay
ELISA	:	enzyme-linked immunosorbent assay
FCM	:	flow cytometry
FEIA	:	fluorescence enzyme immunoassay
FFPE	:	formalin-fixed paraffin-embedded
FITC	:	fluorescein isothiocyanate
GBM	:	glomerular basement membrane
GPA	:	granulomatosis with polyangiitis
HE	:	hematoxylin and eosin
HRP	:	horseradish peroxidase
IBD	:	inflammatory bowel diseases
IF	:	immunofluorescence
Ig	:	immunoglobulin
IgAN	:	immunoglobulin A nephropathy
IHC	:	immunohistochemistry
IIF	:	indirect immunofluorescence

LAMP-2	:	lysosome-associated membrane protein-2
MFI	:	mean fluorescence intensity
MHC	:	major histocompatibility complex
MMP-9	:	matrix metalloproteinase-9
MPA	:	microscopic polyangiitis
MPO	:	myeloperoxidase
MS	:	multiple sclerosis
NE	:	neutrophil elastase
p-ANCA	:	perinuclear ANCA
PBS	:	phosphate-buffered saline
PBS-T	:	phosphate-buffered saline with 0.05% Tween-20
PC	:	positive control
PFA	:	paraformaldehyde
PMA	:	phorbol myristate acetate
PMNs	:	polymorphonuclear leukocytes
PN	:	periarteritis nodosa
PR3	:	proteinase 3
PVDF	:	polyvinylidene difluoride
RR	:	repeat relapse
SA	:	single attack
SD	:	standard deviation
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
SE	:	standard error
TMB	:	3,3,5,5-tetramethylbenzidine
TNF-α	:	tumor necrosis factor-α
WKY	:	Wistar-Kyoto
α3(IV)NC1	:	α3-subunit non-collagenous domain of type IV collagen

要約

抗好中球細胞質抗体（anti-neutrophil cytoplasmic antibody: ANCA）は好中球細胞質抗原を認識する病原性自己抗体であり、主な抗原はミエロペルオキシダーゼとプロテイナーゼ 3 である。抗糸球体基底膜（glomerular basement membrane: GBM）抗体が認識する主要なエピトープは糸球体および肺胞の基底膜を構成する IV 型コラーゲン｛type IV collagen: Col(IV)｝の α3 サブユニット非コラーゲンドメイン、α3(IV)NC1 に存在する。NC1 ドメインの六量体形成によって立体構造的に分子内に潜在している GBM 抗原のエピトープは、同六量体が解離することにより表出し、抗体と結合する。

本研究では、ANCA 抗原および GBM 抗原の変化が ANCA や抗 GBM 抗体の検出と自己免疫病態へ与える影響について検討した。

第1章　間接蛍光抗体法の抗好中球細胞質抗体検出基板における好中球固定法の違いによる抗原性の変化

【背景と目的】ANCA の検出には間接蛍光抗体法（indirect immunofluorescence: IIF）や酵素免疫測定法（enzyme immunoassay: EIA）が用いられてきた。精度の向上により近年は EIA が ANCA 検出のゴールドスタンダードとなっているが、EIA では固相化された抗原以外を認識する ANCA は検出できないため、IIF も依然として必要とされている。IIF ではエタノール固定もしくはホルマリン固定した好中球を基板として用いる。エタノール固定には推奨プロトコールがあるが、ホルマリン固定には推奨プロトコールがない。そこで、いくつかのホルマリン固定プロトコールについて、保存期間が基板の細胞数、抗原分布および抗原性にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

【方法】エタノール固定の推奨プロトコールならびに、既報およびオリジナルのホルマリン固定プロトコールに従って ANCA-IIF 用好中球基板を作製した。作製直後、2 週間後、1 か月後、2 か月後に ANCA-IIF を施行し、細胞数、抗原分布および抗原性を解析した。

【結果】細胞数および抗原分布は固定法によらず 2 か月間変化がなかったが、抗原性にはプロトコール依存的な経時的減衰が認められた。

【結論】経時的な抗原性の減衰は ANCA-IIF の判定に影響を及ぼす恐れがあり、抗体価評価の際には注意が必要である。

第2章　治療抵抗性抗糸球体基底膜抗体病の抗糸球体基底膜抗体が認識するエピトープ

【背景と目的】抗 GBM 抗体病（抗 GBM 病）の抗 GBM 抗体が認識する主要なエピトープは α3(IV)NC1 である。抗 GBM 病は通常は単回発症（single attack: SA）の経過をとり、治療抵抗性を示し再燃を繰り返す（repeat relapse: RR）ことは稀である。そこで、RR 患者と SA 患者の抗 GBM 抗体が認識するエピトープの違いを明らかにすることを目的とした。

【方法】ホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE）正常腎

組織切片の免疫組織化学（immunohistochemistry: IHC）と、リコンビナントヒトα3(IV)NC1 を用いたウェスタンブロッティングを実施した。
【結果】RR 患者の免疫グロブリン G（immunoglobulin G: IgG）を一次抗体とした IHC は、SA 患者の IgG を一次抗体とした IHC で観察された染色像とは異なる染色像を呈した。ウェスタンブロッティングでは、RR 患者の IgG は whole のα3(IV)NC1 に相当する 56.8 kDa の抗原以外に 18 kDa の抗原にも反応した。α3(IV)NC1 をプロテアーゼで消化すると 56.8 kDa のバンドは消失したが、18 kDa のバンドは消失しなかった。また、市販の抗α3(IV)NC1 モノクローナル抗体では 18 kDa のバンドは検出されなかった。
【結論】RR 患者の IgG は、SA 患者や抗α3(IV)NC1 モノクローナル抗体が認識するエピトープとは異なる GBM エピトープを認識しており、それが臨床経過の違いに反映されている可能性が示唆された。

第3章　抗好中球細胞質抗体に続き抗糸球体基底膜抗体が産生されるメカニズム
【背景と目的】ANCA 関連血管炎（ANCA-associated vasculitis: AAV）は抗 GBM 病を合併することがある。本研究では、AAV における抗 GBM 抗体産生メカニズムを明らかにすることを目的にした。
【方法】ANCA により活性化された好中球から放出されるエラスターゼなどのプロテアーゼが AAV の病態に関与することが知られている。そこで、FFPE 正常腎組織切片と Col(IV)を好中球エラスターゼなどのプロテアーゼで消化し、α3(IV)NC1 が表出するかどうかを IHC と enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）を用いて検討した。次に、AAV 患者などの腎病変部におけるα3(IV)NC1 の表出と CD11c 陽性マクロファージの浸潤を IHC および蛍光抗体法により評価した。最後に、AAV モデルラットの抗 GBM 抗体産生を ELISA で評価した。
【結果】FFPE 正常腎組織切片と Col(IV)をプロテアーゼで消化することによりα3(IV)NC1 が表出した。α3(IV)NC1 の表出は原因疾患に関係なく硬化糸球体で認められたが、α3(IV)NC1 近傍に浸潤する CD11c 陽性マクロファージは AAV に特徴的であった。一部の AAV ラットでは、ANCA に続いて抗 GBM 抗体が産生された。IHC では、障害された腎組織中にα3(IV)NC1 が検出され、その近傍に CD11c 陽性マクロファージが浸潤していることが確認された。
【結論】AAV において、ANCA によって活性化された好中球から放出されるプロテアーゼが Col(IV)を消化して糸球体のα3(IV)NC1 を表出させ、CD11c 陽性マクロファージが GBM エピトープを提示し、最終的に免疫系が抗 GBM 抗体を産生することが示唆された。本研究は AAV における抗 GBM 抗体産生に分子間エピトープ拡散 intermolecular epitope spreading が関与すること示唆した初めての研究である。

抗原の変化は ANCA や抗 GBM 抗体といった病原性自己抗体の検出結果ならびに自己免

疫病態へ影響を与える。AAV や抗 GBM 病において、自己抗体が認識する抗原エピトープの違いや産生される自己抗体の種類の増加は、病態の重症化や修飾に関与することが示唆された。

序章

小型血管炎

細動脈、毛細血管、細静脈といった小型血管が主として侵される血管炎を小型血管炎という。国際的な血管炎分類であるチャペルヒル分類 2012 では、小型血管炎は抗好中球細胞質抗体（anti-neutrophil cytoplasmic antibody: ANCA）関連血管炎（ANCA-associated vasculitis: AAV）と免疫複合体性血管炎に大別されている（Jennette et al., 2013)。AAV は ANCA 産生を伴う壊死性血管炎と定義され、血管壁への免疫グロブリン(immunoglobulin: Ig)や補体の沈着はほとんど認められない。主な ANCA 抗原には、ミエロペルオキシダーゼ(myeloperoxidase: MPO）とプロテイナーゼ 3（proteinase 3: PR3）の 2 つがある。免疫複合体性血管炎は血管壁に Ig や補体が中程度から高度に沈着する血管炎と定義され、抗糸球体基底膜（glomerular basement membrane: GBM）抗体病（抗 GBM 病）やクリオグロブリン血症性血管炎などが含まれる。抗 GBM 病では患者腎組織を用いた免疫蛍光染色(immunofluorescence: IF）において GBM に沿った線状の IgG 沈着が観察される。

AAV と ANCA 抗原

AAV には、顕微鏡的多発血管炎（microscopic polyangiitis: MPA)、多発血管炎性肉芽腫症（granulomatosis with polyangiitis: GPA)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: EGPA）などが含まれる。MPA は、糸球体係蹄の壊死と半月体形成を伴う急速進行性の糸球体腎炎を発症し、肺では毛細血管炎による肺出血が起こる。本邦における全国規模のコホート研究により、MPA の平均発症年齢は 70 歳代であること、ほとんどの患者が MPO-ANCA 陽性であることが分かっている（Sada et al., 2014)。GPA は、上・下気道に壊死性肉芽腫、全身小型血管に壊死性肉芽腫性血管炎をきたし、60 歳代に好発する。また、GPA では MPO-ANCA 陽性患者と PR3-ANCA 陽性患者の割合がほぼ等しい。EGPA は、気管支喘息や好酸球増多などのアレルギー症状を伴う全身性の壊死性肉芽腫性血管炎で、50 歳代に発症のピークがある。EGPA 患者の約半数は MPO-ANCA 陽性であるが、残りの約半数は ANCA 陰性である。

MPO-ANCA も PR3-ANCA も検出されない AAV 患者もおり、このような場合、MPO と PR3 以外の好中球細胞質抗原である抗菌タンパク質 BPI（bactericidal permeability increasing protein)、好中球エラスターゼ（neutrophil elastase: NE)、カテプシン G、ラクトフェリン、リソソーム関連膜タンパク-2 (lysosome-associated membrane protein-2: LAMP2)などのいわゆるマイナー抗原が ANCA の抗原となっている（Kain & Rees, 2013; Talor et al., 2007)。ANCA は全身性エリテマトーデスなどの膠原病や炎症性腸疾患（inflammatory bowel diseases: IBD）の患者でも検出され（Hauschild et al., 1993)、これらの非 AAV 疾患の ANCA はマイナー抗原を認識する場合が多い。

抗 GBM 病と抗 GBM 抗体が認識するエピトープ

抗 GBM 抗体は、糸球体や肺胞の基底膜を構成している IV 型コラーゲン｛type IV collagen: Col(IV)｝に対する自己抗体である。抗 GBM 抗体が産生されることにより、びまん性の半月体形成性壊死性糸球体腎炎や肺出血をきたす臓器特異的自己免疫疾患である抗 GBM 病が発症する（McAdoo & Pusey, 2017)。1919 年に Goodpasture がインフルエンザ感染に関連した肺出血と半月体形成性壊死性糸球体腎炎を呈した症例を初めて報告したことから（Goodpasture, 1919)、以前は Goodpasture 症候群と呼称されていた（Stanton & Tange, 1958)。

Col(IV)は 3 つの α サブユニットからなり、C 末端側から、非コラーゲンドメイン（NC1 ドメイン)、コラーゲンドメイン（三重鎖ドメイン)、7S ドメインに分けられる（Zhou et al., 1994)。三重鎖ドメインは、α サブユニットコラーゲンが三重らせん状に束ねられたものである（Figure 1A)。Col(IV)を構成している α サブユニットの組み合わせは α1、α1、α2（1-1-2)、α3、α4、α5 (3-4-5)、α5、α5、α6 (5-5-6）の 3 種類ある。1-1-2 の α サブユニットを含む Col(IV)は全身に広く分布し、5-5-6 の α サブユニットを含む Col(IV)は皮膚や平滑筋細胞、腎臓など多臓器に渡って分布しているのに対し、3-4-5 の α サブユニットを含む Col(IV)は腎臓の GBM や肺の肺胞基底膜など限られた部位にしか分布していない。

抗 GBM 抗体によって認識される主要なエピトープは E_A と E_B であり、これらは α3 サブユニットの NC1 ドメイン｛α3-subunit non-collagenous domain of type IV collagen: α3(IV)NC1｝に存在する（Pedchenko et al., 2010)。2 つの 3-4-5 の α サブユニット三量体の NC1 ドメイン同士がスルフィルイミン結合により連結して六量体を形成しており、α3(IV)NC1 の GBM エピトープは立体構造上の潜在（cryptic）領域に存在し（Vanacore et al., 2011)、スルフィルイミン結合が切断されることで初めて表出する（Figure 1B)。抗ペルオキシダシン抗体が、3-4-5α サブユニット三量体の NC1 ドメイン連結におけるスルフィルイミン結合のミスフォールディングに寄与することが示唆されているが（McCall et al., 2018)、抗 GBM 病患者で潜在抗原が表出するメカニズムは未だ不明である。何らかの原因により Col(IV)の NC1 ドメインの六量体が解離すると、抗 GBM 抗体がエピトープに結合し、補体カスケードが活性化され、補体依存性の組織破壊が起こる。

本研究では抗原の変化が自己抗体の測定や自己免疫病態に及ぼす影響について、3 つの異なる視点から検討を行った。第 1 章では好中球の固定法の違いによる抗原性の経時的減衰が間接蛍光抗体法による ANCA の検出に与える影響について述べる。第 2 章では治療抵抗性を示した抗 GBM 病患者の抗 GBM 抗体が認識するエピトープについて述べる。第 3 章では、ANCA に続き抗 GBM 抗体が産生されるメカニズムに分子間エピトープ拡散 intermolecular epitope spreading が関与していることを述べる。

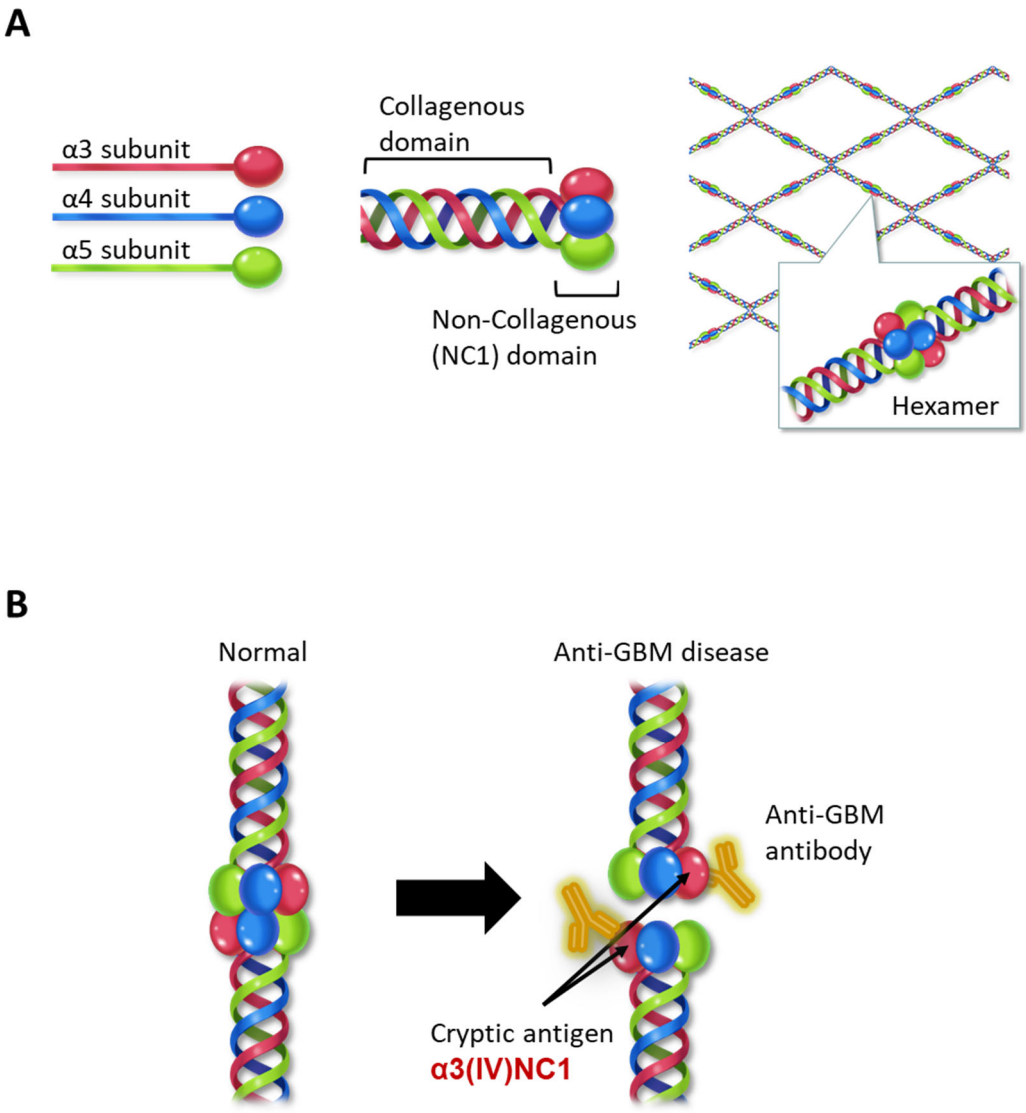

Figure 1. Col(IV)の構造

Col(IV)は糸球体基底膜の構成要素である（A)。α3、α4、α5 の 3 つのαサブユニットからなる三量体を形成し（左)、Col(IV)の C 末端側には、コラーゲン領域からなる三重鎖ドメインと非コラーゲン領域からなる NC1 ドメインが存在する（中央)。N 末端側は 4 つの 7S ドメインが結合し、C 末端側は 2 つの NC1 ドメインの三量体同士が結合して六量体を形成することで、基底膜は Col(IV)の網目状構造をとる（右)。

正常な NC1 ドメインと抗 GBM 病患者の NC1 ドメイン（B)。正常では 2 つの 3-4-5α サブユニットの NC1 ドメイン同士がスルフィルイミン結合により結合して六量体を形成しており、抗 GBM 抗体が認識するエピトープは cryptic antigen として立体構造的に潜在しているが、何らかの原因により NC1 ドメインのスルフィルイミン結合が切断されて表出することで、抗 GBM 抗体と結合する。

第 1 章

間接蛍光抗体法の抗好中球細胞質抗体検出基板における好中球固定法の違いによる抗原性の変化

本章の内容は、以下の論文で公表した。

Nishibata Y, Matsuzawa S, Satomura Y, Ohtsuka T, Kuhara M, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Neutrophil fixation protocols suitable for substrates to detect anti-neutrophil cytoplasmic antibodies by indirect immunofluorescence. Pathol Res Pract 228: 153661, 2021.

1-1. 緒言

ANCA は、MPO および PR3 を主な抗原とする。ANCA 産生を伴う壊死性小型血管炎を AAV と呼び（Jennette et al., 2013）、MPA、GPA、EGPA などが含まれる。本邦では、ほとんどの MPA 患者が MPO-ANCA 陽性である（Sada et al., 2014）。GPA 患者では MPO-ANCA 陽性と PR3-ANCA 陽性の割合がほぼ等しい。また、EGPA 患者の約半数は MPO-ANCA 陽性であるが、残りの約半数は ANCA 陰性である。

EGPA 以外でも、MPO-ANCA と PR3-ANCA のいずれも検出されない AAV 患者が存在する。このような場合、いわゆるマイナー抗原（抗菌タンパク質 BPI、NE、カテプシン G、ラクトフェリン、LAMP-2 など）が ANCA に認識されている（Kain & Rees, 2013; Talor et al., 2007）。また、全身性エリテマトーデスなどの膠原病や IBD の患者でもマイナー抗原を認識する ANCA が検出される場合がある（Hauschild et al., 1993）。

ANCA の検出には、間接免疫蛍光法（indirect immunofluorescence: IIF）と酵素免疫測定法（enzyme immunoassay: EIA）が適用されている。IIF は、健常者の末梢血由来好中球をスライドガラスに固定し、被験血清の後に蛍光標識した抗ヒト IgG 抗体と反応させ、蛍光顕微鏡で観察する検査法である。IIF は定性的かつ主観的な検査であるが、抗原特異性に依存せず ANCA の存在を検出することができる。一方、EIA は、固相化した好中球細胞質抗原と被検血清中の抗体との反応性を、酵素標識抗ヒト IgG 抗体を用いて測定する定量的かつ客観的な検査法である。近年は精度が向上し、EIA が ANCA 検出のゴールドスタンダードとなっており、本邦においてはほとんどの医療機関で MPO-ANCA と PR3-ANCA をルーチンに測定することが可能である。EIA の問題点は、固相化された抗原以外の抗原を認識する ANCA を検出できないことである。したがって、IIF と EIA は、ANCA 検出における互いの欠点を補うものである。

IIF では、二種類の異なる方法で固定した好中球基板を用いて ANCA の有無を判定する。一つはエタノール固定で、ANCA の反応性は「p-ANCA パターン」と呼ばれる核周囲（perinuclear）に蛍光を呈するパターンと「c-ANCA パターン」と呼ばれる細胞質内（cytoplasmic）に蛍光を呈するパターンに分けられる。p-ANCA の主要抗原は MPO であり、c-ANCA の主要抗原は PR3 である。また、マイナー抗原を認識する ANCA にも p-ANCA パターンを示すものがある（Savige et al., 2000）。もう一つはホルマリン固定で、MPO-ANCA と PR3-ANCA はともに c-ANCA パターンを示す。これらの染色パターンの違いは抗原タンパクの荷電によるものと考えられている。正電荷されている MPO は、ホルマリンによる急速かつタイトな固定では c-ANCA パターンを示すのに対し、比較的緩やかなエタノール固定では、固定されるまでの間に抗原が負電荷の核膜に接近するため p-ANCA パターンを呈する（Sinico & Radice, 2014）。IIF-ANCA における抗原と関連疾患の一覧を Table 1 に示す。

エタノール固定された好中球基板を用いる場合、被験血清に抗核抗体（anti-nuclear

antibody: ANA）が含まれていると p-ANCA の判定が困難なことがある。エタノール固定好中球で p-ANCA として検出される ANCA は、ホルマリン固定好中球では c-ANCA パターンを示す。これに対し、ANA はホルマリン固定好中球では検出されない。したがって、エタノール固定された好中球基板を使用した IIF において ANA の存在により p-ANCA が判定できない場合は、ホルマリン固定された好中球基板を使用し、ANCA の存在を確認する必要がある。

IBD 患者の中には、核内抗原を認識する抗好中球抗体を保有する人がいる（Terjung et al., 2000）。この抗体は、エタノール固定された好中球基板を使用した IIF で典型的な p-ANCA として検出されず、ホルマリン固定された好中球基板では核辺縁に縁取り状の染色が検出される（Terjung et al., 2001）。エタノール固定された好中球基板を使用した IIF で IBD 患者の血清中に異型 ANCA が検出された場合、ホルマリン固定された好中球基板を用いて、その染色性を確認する必要がある。

IIF 基板として好中球をエタノール固定するプロトコールは Wiik によって確立されている（Wiik, 1989）。一方で、ホルマリン固定は Lock のプロトコール（Lock, 1994）、Billing のプロトコール（Billing et al., 1995）など、様々なプロトコールが適用されている。これらのプロトコールに重大な問題があるとは限らないが、施設間のデータ比較のためには、固定方法の標準化が望ましい。ANCA-IIF 基板の適格性には、細胞数、抗原分布、抗原性を一定期間保持することが重要である。本研究では、エタノール固定では Wiik のプロトコール、ホルマリン固定では Lock と Billing のプロトコールおよび独自のプロトコールに従って好中球基板を作製し、保存期間が基板の細胞数、抗原分布、抗原性に及ぼす影響について検討した。

Table 1. IIF-ANCA で検出される主な抗原と関連する疾患

エタノール固定	ホルマリン固定	主な抗原	疾患
c-ANCA	c-ANCA	PR3	GPA, MPA
		BPI	Cystic fibrosis, IBD, RA
p-ANCA	c-ANCA	MPO	MPA, EGPA, drug-induced AAV, SLE, RA
		BPI, elastase, lactoferrin, cathepsin G, defensin, HMG 1/2, LAMP-2, etc.	IBD, RA, drug-induced AAV, SLE
Atypical p-ANCA	Atypical p-ANCA or c-ANCA	BPI, elastase, lactoferrin, cathepsin G, defensin, HMG 1/2, LAMP-2, etc.	IBD, RA, drug-induced AAV

HMG 1/2: high mobility group protein 1/2, RA: rheumatoid arthritis, SLE: systemic lupus erythematosus

1-2. 対象と方法

1-2-1. 血清

株式会社医学生物学研究所（MBL, Tokyo, Japan）より提供された MPO-ANCA 陽性血清（n=3）と PR3-ANCA 陽性血清（n=3)、ANA 陽性血清（n=3)、ANCA 陰性血清（n=5）を用いた。各血清における MPO-ANCA と PR3-ANCA の抗体価は MBL で測定された。

1-2-2. 末梢血好中球

健康なボランティアから、書面によるインフォームドコンセントを得た後、末梢血を採取し、Polymorphprep (Serumwerk Bernburg , Bernburg, Germany）を用いた密度勾配遠心法により多核顆粒球（polymorphonuclear leukocytes: PMNs）を分離した。PMNs として回収した細胞の大半が好中球であることを確認し、本研究では PMNs を好中球として使用した。本研究は北海道大学大学院保健科学研究院倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号: 19-86)。

1-2-3. 好中球基板の作製

10% ウシ胎児血清添加 RPMI-1640 を用いて好中球を 1×10^6 /ml に調整し、Poly-L-lysin コートされた 12 ウェルのスライドガラスに播種して 37℃、5% CO_2 環境下で 30 分間静置した。上清を除去し、スライドガラスを PBS（phosphate-buffered saline）で洗浄後すぐに風乾した。続いて、スライドガラスをエタノール固定またはホルマリン固定し、すぐに風乾した。作製した基板は使用時まで乾燥剤とともに密閉し、4℃で遮光保存した。

1-2-4. エタノール固定

エタノール固定（e1）は Wiik のプロトコールに準じた。好中球を貼り付けたスライドガラスを 4℃に冷却した 95% エタノールに 5 分間浸漬し、すぐに風乾した。

1-2-5. ホルマリン固定

ホルマリン固定は Lock のプロトコール、Billing のプロトコール、そしてパラホルムアルデヒド（paraformaldehyde: PFA)-PBS 法、PFA-エタノール法、PFA-アセトン法と名付けた独自の方法で作製した（Table 2)。

Lock のプロトコール（f1): 好中球を貼り付けたスライドガラスをホルマリン-アセトン（36 ml ホルマリン、180 ml アセトン、184 ml PBS）に 50 秒間室温で浸漬した後に、4℃に冷却した無水エタノールに 15 分間浸漬し、すぐに風乾した。

Billing のプロトコール（f2): 好中球を貼り付けたスライドガラスを 1% PFA に 10 分間室温で浸漬した後に、-20℃に冷却したアセトンに 1 分間浸漬し、すぐに風乾した。

PFA-PBS 法（f3): 好中球を貼り付けたスライドガラスを 4% PFA に 15 分間室温で浸漬し

た後に、PBS で洗浄し、すぐに風乾した。
PFA-エタノール法 (f4): 好中球を貼り付けたスライドガラスを 4% PFA に 15 分間室温で浸漬した後に、4℃に冷却した無水エタノールに 1 分間浸漬し、すぐに風乾した。
PFA-アセトン法 (f5): 好中球を貼り付けたスライドガラスを 4% PFA に 15 分間室温で浸漬した後に、-20℃に冷却したアセトンに 1 分間浸漬し、すぐに風乾した。

Table 2. 本研究で使用した好中球基板の作製プロトコール

プロトコール	第一段階	第二段階	文献
e1	95% エタノール 5 分間, 4℃	-	(Wiik, 1989)
f1	ホルマリン-アセトン 50 秒間, 室温	100% エタノール 15 分間, 4℃	(Lock, 1994)
f2	1% PFA 10 分間, 室温	アセトン 1 分間, -20℃	(Billing et al., 1995)
f3	4% PFA 15 分間, 室温	PBS	-
f4	4% PFA 15 分間, 室温	100%エタノール 1 分間, 4℃	-
f5	4% PFA 15 分間, 室温	アセトン 1 分間, -20℃	-

1-2-6.　ANCA-IIF

好中球基板を室温に戻した後に、MPO-ANCA、PR3-ANCA 各陽性血清または ANCA 陰性血清を 20 倍に希釈し、基板上のウェルに添加して 30 分間室温で反応させた。ANA 陽性血清も同様に添加し、反応させた。PBS で洗浄後、エバンスブルー入りの fluorescein isothiocyanate（FITC）標識抗ヒト IgG 抗体を各ウェルに添加して遮光し、30 分間室温で反応させた。PBS で洗浄後、スライドガラスを 4,6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）入り封入剤（Vector Laboratories, Burlingame, CA）で封入した。ANCA-IIF は四重測定で実施し、結果の再現性を確認した。各ウェルを蛍光顕微鏡で撮影し、撮影した画像を用いて、細胞数、抗原分布、細胞の蛍光強度を評価した。画像解析は ImageJ ソフトウェアバージョン 1.53a（https://imagej.nih.gov/ij/; NIH, Bethesda, MD）を使用した。

1-2-7.　統計学的解析

一元配置分散分析または Student の *t*-検定を用いて、基板作製後 14 日目、30 日目、60 日目の細胞数および抗原性を 1 日目と比較した。$p<0.05$ を統計学的な有意とみなした。

1-3.　結果

1-3-1.　細胞数

スライドガラスに貼り付けた好中球に、Wiik 法のエタノール固定（e1)、Lock 法のホルマリン固定（f1)、Billing 法のホルマリン固定（f2)、オリジナルのホルマリン固定として PFA-PBS 法（f3)、PFA-エタノール法（f4)、PFA-アセトン法（f5）をそれぞれ施し、IIF 用基板を作製した。基板は使用時まで 4℃で保存し、基板作製翌日（1 日目)、2 週間後（14 日目)、1 か月後（30 日目）に ANCA-IIF を実施した。低倍率視野内の細胞数をカウントし、1 日目の細胞数を 100 とした時の相対値で結果を表示した（Figure 2)。細胞数は固定法によらず 1 か月間保持された。

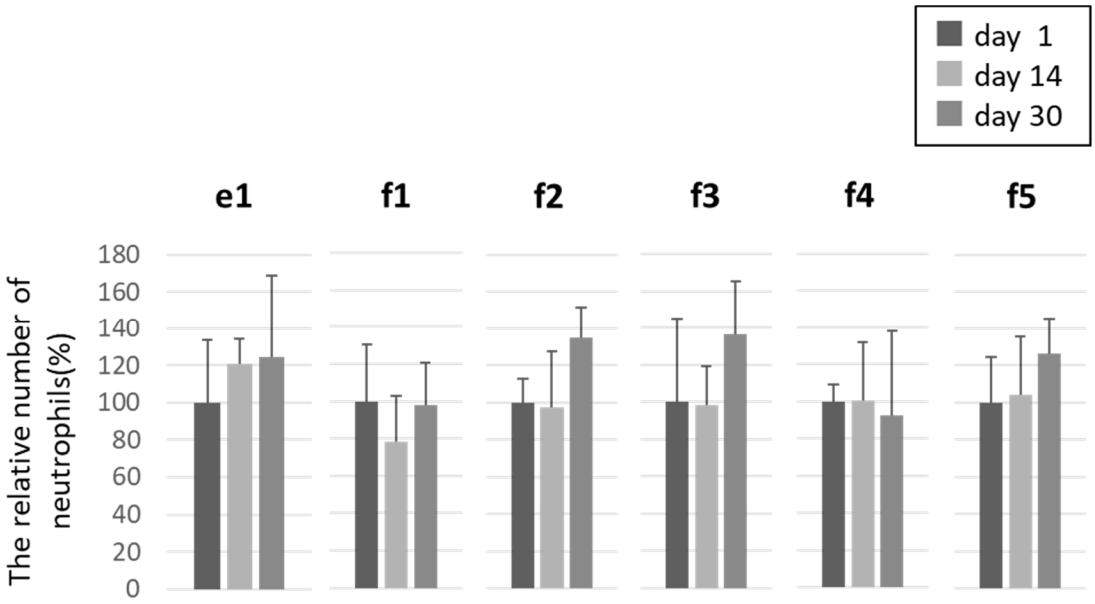

Figure 2. 好中球基板上の細胞数

各固定法で作製した好中球基板上の各ウェルを低倍率視野（倍率：100 倍）にて撮影し、細胞数をカウントした。棒グラフは 4～5 ウェルの平均を示し、エラーバーは標準偏差（standard deviation: SD）を示す。基板作製 2 週間後（day 14)、1 か月後（day 30）の細胞数を、基板作製翌日（day 1）の細胞数を 100 とした時の相対値で表した。

e1: Wiik 法、f1: Lock 法、f2: Billing 法、f3: PFA-PBS 法、f4: PFA-エタノール法、f5: PFA-アセトン法。

1-3-2.　抗原分布

次に、各条件での抗原分布について評価した。エタノール固定された好中球基板を用いた場合（e1)、MPO-ANCA と PR3-ANCA は、1 日目、14 日目、30 日目それぞれ同様に p-ANCA と c-ANCA パターンを示した（Figure 3A)。ホルマリン固定された好中球基板（f1〜f5）を用いた場合、MPO-ANCA と PR3-ANCA はいずれも、1 日目、14 日目、30 日目それぞれ同様に c-ANCA パターンを示した（Figure 3B-F)。ANCA を含まない陰性対照血清の非特異反応は測定上の問題とならない程度であることを確認した。

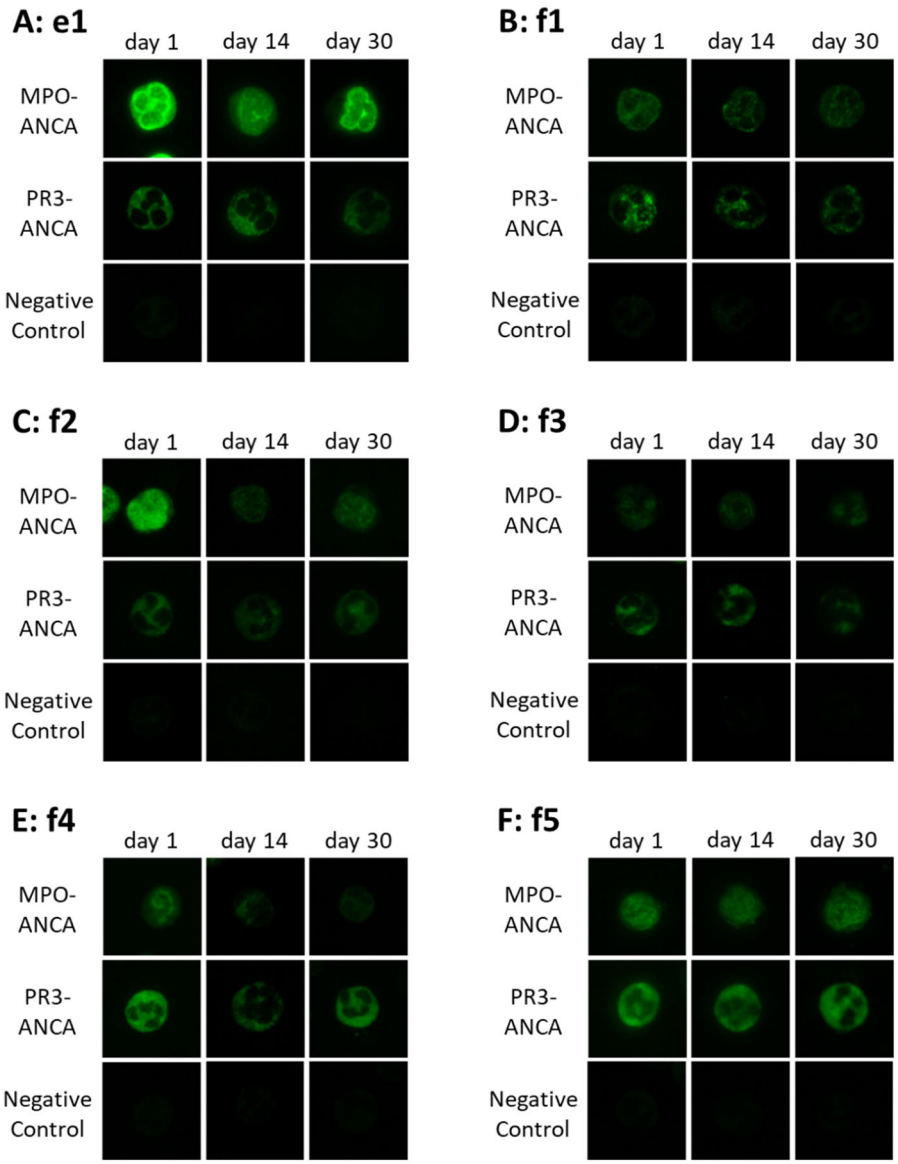

Figure 3. ANCA 抗原の分布

作製した好中球基板を用いて IIF を実施した。20 倍希釈した MPO-ANCA 陽性血清、PR3-ANCA 陽性血清、ANCA 陰性血清を反応させ、FITC 標識抗ヒト IgG で検出した。それぞれ 13.0 U/ml および 135.0 U/ml の EIA 抗体価の MPO-ANCA および PR3-ANCA を使用した。代表的な顕微鏡写真を示す。Wiik 法（e1）では 1 日目、14 日目、30 日目を通して MPO-ANCA は p-ANCA パターンを、PR3-ANCA は c-ANCA パターンを呈した（A)。すべてのホルマリン固定法で 1 日目、14 日目、30 日目を通して、MPO-ANCA および PR3-ANCA ともに c-ANCA パターンを呈した（B-F)。

Lock 法（f1, B)、Billing 法（f2, C)、PFA-PBS 法（f3, D)、PFA-エタノール法（f4, E)、PFA-アセトン法（f5, F)。

1-3-3.　抗原性

本研究で採用したエタノール固定およびホルマリン固定の方法（e1、f1～f5）は、1 か月間の保存において、基板上の好中球の細胞数および抗原分布に影響を与えなかった。しかし、抗原性を表す細胞内蛍光強度は、固定法に依存して経時的に減衰した（Figure 4A)。1 日目の細胞あたりの平均蛍光強度（mean fluorescence intensity: MFI）を 100 とし、14 日目、30 日目の相対値を解析した。その結果、Billing 法（f2)では 14 日目の MPO-ANCA 検出において、PFA-エタノール法（f4)では 14 日目と 30 日目の PR3-ANCA 検出において、細胞あたりの MFI が、1 日目の値の 50%以下となった(Figure 4B)。

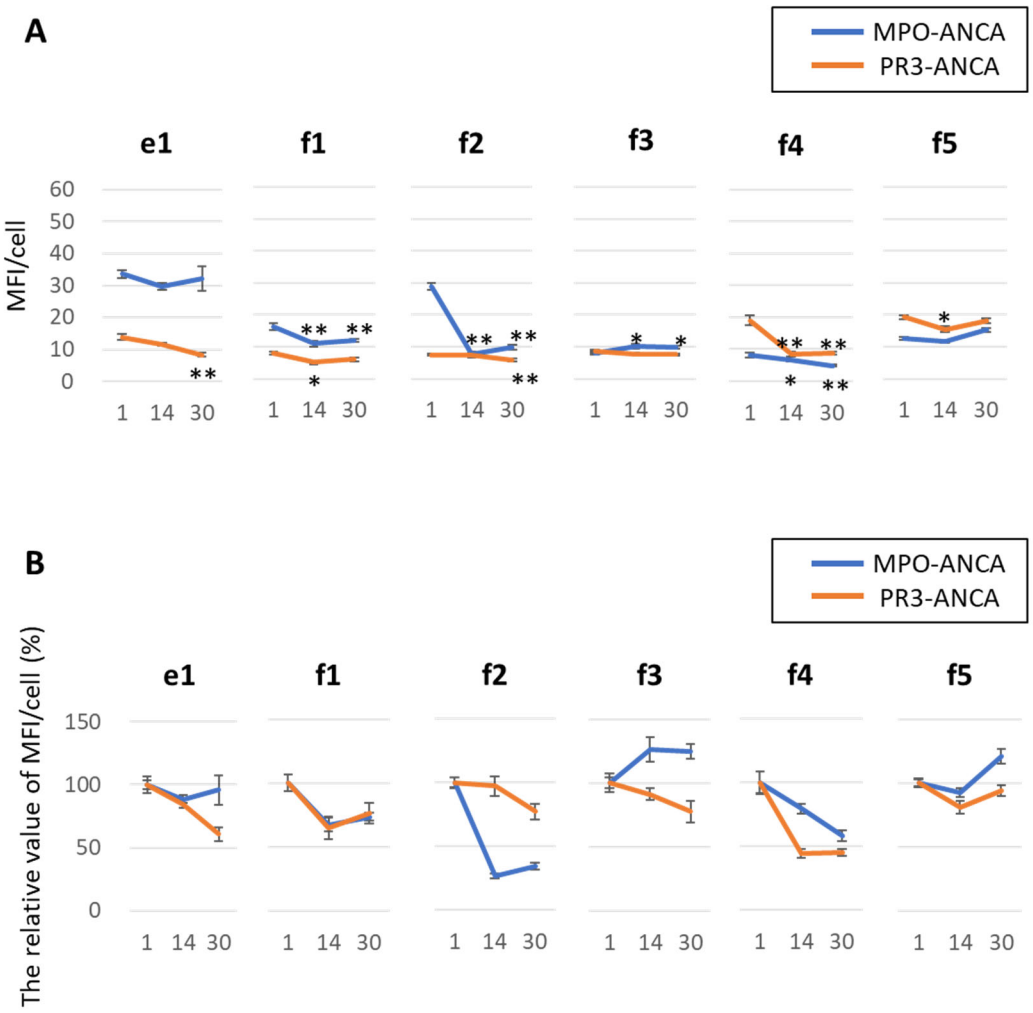

Figure 4. 抗原性の変化

高倍率視野（倍率：400 倍）で撮影した画像から細胞当たりの MFI を計測した。*p<0.05、**p<0.01。

各点は細胞あたりの MFI を示し、エラーバーは標準誤差（standard error: SE）を示す。14 日目と 30 日目の抗原性の減少を統計学的に解析した（A）。1 日目の MFI を 100 とした時の、14 日目、30 日目の相対値を算出した（B）。

e1: Wiik 法、f1: Lock 法、f2: Billing 法、f3: PFA-PBS 法、f4: PFA-エタノール法、f5: PFA-アセトン法。

1-3-4.　長期保存後の細胞数と抗原分布

1 か月までの保存で細胞あたりの MFI の減少が 50%未満であった ANCA-IIF 基板（e1、f1、f3、f5）について、保存期間をさらに 1 か月延長し、細胞数および抗原分布への影響を検討した。60 日目の細胞数および抗原分布に有意な変化は認められなかった(Figure 5)。

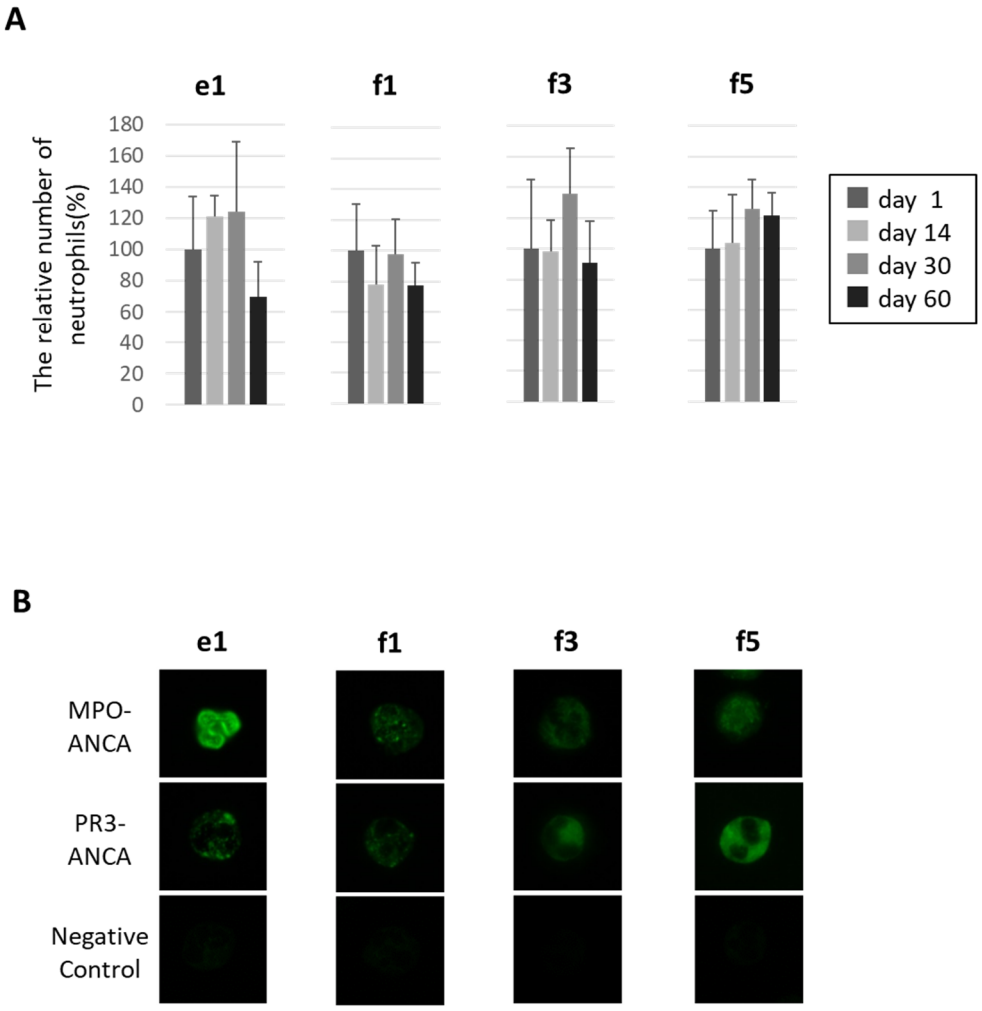

Figure 5. 長期保存後の細胞数と抗原分布

2 カ月間保存した好中球基板上の各ウェルを低倍率視野（倍率：100 倍）にて撮影し、細胞数をカウントした。

60 日目にウェルに残存した細胞は、1 日目の細胞数を 100 とした相対値で表した（A)。棒グラフは 4〜5 ウェルの平均を示し、エラーバーは SD を示す。それぞれ 13.0 U/ml および 135.0 U/ml の EIA 抗体価の MPO-ANCA および PR3-ANCA を使用した、60 日目の代表的な顕微鏡写真（B)。

e1: Wiik 法、f1: Lock 法、f3: PFA-PBS 法、f5: PFA-アセトン法。

1-3-5.　長期保存後の抗原性

1 か月までの保存で細胞あたりの MFI の減少が 50%未満であった ANCA-IIF 基板（e1、f1、f3、f5）について、同様に 60 日目の抗原性を検討した。Wiik 法（e1）、Lock 法（f1）、PFA-アセトン法（f5）で固定された好中球基板では、2 か月後の抗原性が大きく減衰したものの、Wiik 法（e1）と PFA-アセトン法（f5）における 60 日目の MPO-ANCA、PR3-ANCA の細胞あたりの MFI は 1 日目の 50%以上であった。一方、Lock 法（f1）で固定された好中球基板を用いた場合、60 日目の MPO-ANCA の細胞あたりの MFI は 1 日目の 50%未満であった（Figure 6）。

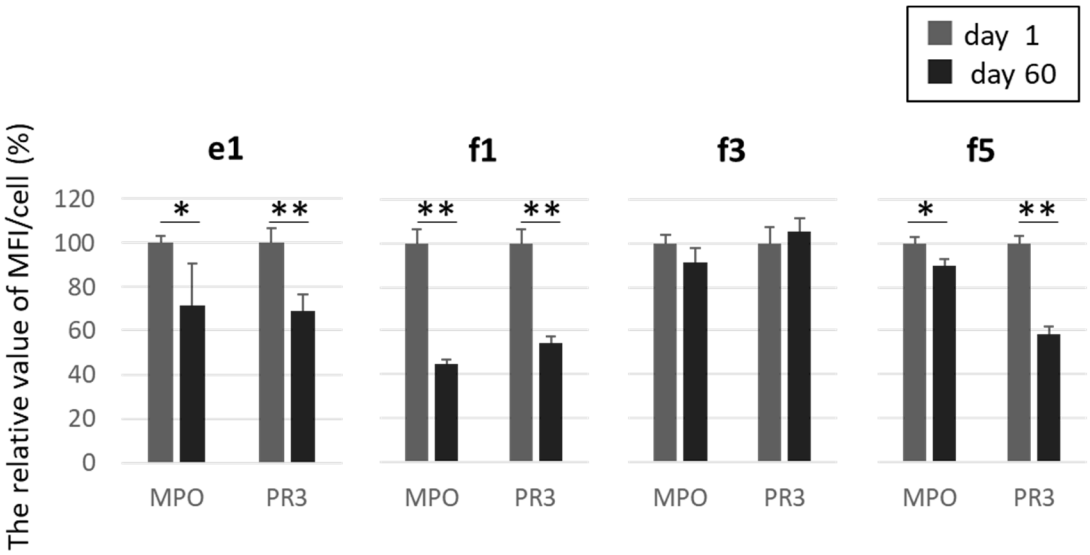

Figure 6. 長期保存後の抗原性

高倍率視野（倍率：400 倍）で撮影した画像から細胞当たりの MFI を計測した。1 日目の MFI を 100 とした時の 60 日目の相対値を算出した。棒グラフは細胞あたりの MFI を示し、エラーバーは SE を示す。*p<0.05、**p<0.01。

e1: Wiik 法、f1: Lock 法、f3: PFA-PBS 法、f5: PFA-アセトン法。

1-3-6.　好中球を用いた基板 IIF における ANA の反応

Wiik 法（e1）と Billing 法（f2）で固定された好中球基板では ANA が検出されたが、Lock 法（f1）、PFA-PBS 法（f3）、PFA-エタノール法（f4）、PFA-アセトン法（f5）で固定された基板では、ANA は検出されなかった（Figure 7）。

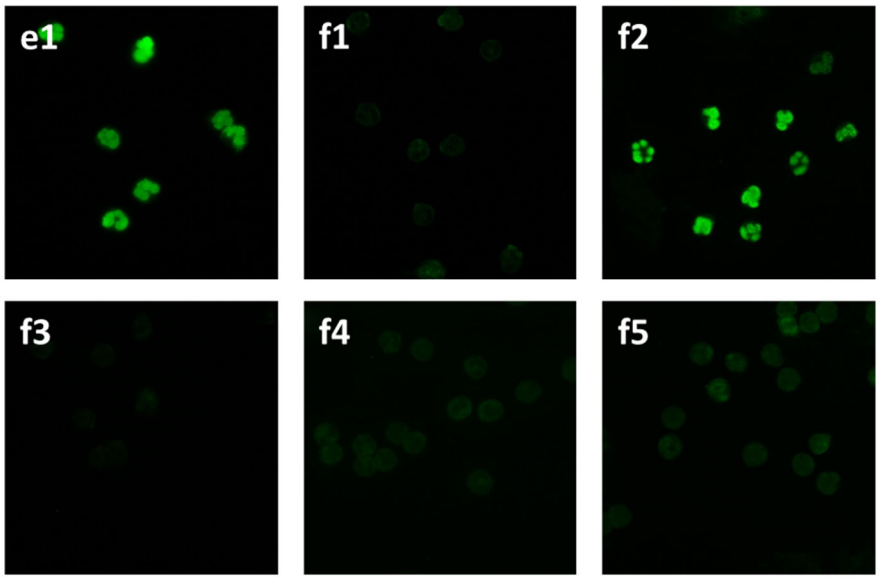

Figure 7. 好中球基板を用いた IIF における ANA の反応

作製 1 日目の好中球基板を用いて IIF を実施した。調整済みの ANA 血清と反応させた後、FITC 標識抗ヒト IgG 抗体と反応させた。代表的な顕微鏡写真を示す。

e1: Wiik 法、f1: Lock 法、f2: Billing 法、f3: PFA-PBS 法、f4: PFA-エタノール法、f5: PFA-アセトン法。

1-4. 考察

ANCA は 1982 年に Davies らによって発見された自己抗体である（Davies et al., 1982)。結節性動脈周囲炎（periarteritis nodosa: PN）と診断された中小型血管炎の中に ANCA 陽性を特徴とする小型血管炎が存在することが明らかとなり、AAV として PN から独立した。ANCA は AAV の疾患マーカーであるだけでなく、その病態形成に重要な役割を果たす病原性自己抗体でもある（Nakazawa et al., 2019)。

1999 年のコンセンサスでは、ANCA の評価のためには IIF と EIA を組み合わせるか、まず IIF でスクリーニングし、その後 EIA で抗体価を測定することが推奨されてきた（Savige et al., 1999)。初期に製品化された EIA は、供給元によって感度や特異度にばらつきがあったため、当初は補助的な検査としての位置づけであった。しかし、抗原固相法の改良と高感度検出システムの開発により、現在では EIA の精度は IIF と同等かそれ以上になっている。このような現状を踏まえ、2017 年のコンセンサスでは、臨床的に AAV が疑われる場合はまず EIA でスクリーニングすることが推奨され、MPO-ANCA または PR3-ANCA が検出されれば IIF は必ずしも行う必要がなくなった（Bossuyt et al., 2017)。臨床的に AAV が疑われるが、EIA で明確な陽性所見が得られない場合は、IIF を行うことが推奨されている。

本研究では、推奨されるエタノール固定である Wiik 法（e1)、ホルマリン固定としては Lock 法（f1）および Billing 法（f2）の他に、4%PFA を用いた 3 つの独自の方法、すなわち PFA-PBS 法（f3)、PFA-エタノール法（f4)、PFA-アセトン法（f5）で ANCA-IIF 基板を作製した。PFA の濃度は、現在細胞固定に一般的に使用されている 4%を採用した。

基板作製翌日（1 日目)、2 週間後（14 日目)、1 か月後（30 日目）に ANCA-IIF を実施し、得られた画像を解析した。その結果、いずれの固定法でも、細胞数の減少や抗原分布の変化は観察されなかった。一方、Billing 法（f2）の MPO-ANCA および PFA-エタノール法（f4）の PR3-ANCA の MFI は経時的に 50%以下に低下しており、抗原性の減衰を意味した。保存期間を 2 か月に延長すると、Lock 法（f1）でも MPO-ANCA の MFI が 50%以下に低下した。MPO と PR3 の抗原性の減衰の違いが、どのような要因に依存しているのかは現時点では判明しておらず、今後の研究で明らかにする必要がある。いずれにせよ、ANCA-IIF では血清を 2 倍ずつ段階希釈して半定量的に抗体価を測定するため、抗原性を表す蛍光強度が 50%以上低下すると抗体価測定結果に影響を与える可能性がある。

本研究では、エタノール固定の Wiik 法（e1）とホルマリン固定の PFA-PBS 法（f3)、PFA-アセトン法（f5）が抗原性の保持に優れていた。しかし、PFA-PBS 法（f3）は PFA-アセトン法（f5）と比べると、1 日目から細胞あたりの MFI が低くなるという欠点があった。PFA-PBS 法（f3）で作製した好中球基板を顕微鏡で観察すると、ウェル内に塩の析出が散見され、析出した塩と重なる好中球もあった。風乾工程で形成された PBS 由来の結晶により好中球細胞膜が損傷し、細胞質内の抗原が細胞外に流出したため、IIF における細胞あたりの MFI が低くなった可能性がある。

エタノール固定された好中球基板を使用する ANCA-IIF では、p-ANCA と ANA のパターンが類似するために両者を区別しづらいことがある。p-ANCA 陽性と判定するためには、ホルマリン固定された好中球基板を使用する IIF で ANCA が存在することを確認する必要がある。この問題に関しては、本研究で検討したホルマリン固定法では、Billing 法（f2）を除いて ANA 陰性の結果が得られた。以上のことから、今回検討したホルマリン固定法のうち，PFA-アセトン法（f5）は、Wiik 法（e1）よりは感度が劣るものの、最も推奨されるホルマリン固定法であると考えられる。今後、感度を上げるためにプロトコールを改善する必要がある。

本研究により、エタノール固定には推奨プロトコールがあるが、ホルマリン固定には推奨プロトコールがない理由として、ホルマリン固定した好中球基板では長期間に渡って抗原性を保持することが難しいことが挙げられる。細胞や組織を固定する一般的な方法には、メタノールやアセトンなどの有機溶媒の強力な脱水作用と脂質の溶解によるタンパク質の凝固作用を利用した固定法と、ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドなどのアルデヒドを用いた架橋固定法がある。ホルマリン固定は、タンパク内の既存結合の解離、アミノ酸残基の末端へのホルムアルデヒドの付加、メチレン架橋を介したタンパクの立体構造の変形、タンパクにホルムアルデヒドを纏わせることによる変性の防止による固定法である。そのため、ある程度の抗原性の低下は避けられない。ホルマリン固定の独自法のうち、PFA-アセトン法（f5）が比較的良好な抗原性の保持を示したのは、アセトンのタンパク凝固作用が抗原性の保持に有利に働いた可能性がある。

本研究には二つの限界がある。第一に、MPO と PR3 以外の抗原を認識する ANCA を含む血清を使用していない。したがって、固定法と保存期間が、マイナー抗原を認識する ANCA の検出にどのように影響するかは、依然として不明である。第二に、2 か月より長い保存期間の影響が検討されていない。各固定法で作製した好中球基板が 2 か月以上の保存に耐えられるかについて、さらなる研究が必要である。

本研究では、ANCA-IIF 用好中球基板を、エタノール固定では Wiik 法、ホルマリン固定では Lock 法、Billing 法および 3 つの独自法の合計 6 種類のプロトコールに従って作製し、保存期間が基板の細胞数、抗原分布、抗原性に及ぼす影響を検討した。細胞数および抗原分布は固定法によらず 2 か月まで保存しても変化しなかったが、ANCA 抗原の抗原性は固定法の違いにより経時的に減衰した。IIF による ANCA 評価では、スライドガラスへの好中球の固定法と基板が作製されてから使用するまでの時間に注意を払う必要がある。

1-5.　結論

本研究により、以下のことが明らかとなった。

- いずれの固定法も 2 か月までの保存により細胞数や抗原分布に変化はなかった。
- 抗原性については、経時的かつ固定法依存的な減衰が認められた。
- 今回検討したホルマリン固定法では、Wiik 法に比べて感度は劣るものの PFA-アセトン法が最も推奨される固定法である。

経時的な抗原性の減衰は ANCA-IIF の判定に影響を及ぼす恐れがあり、評価の際には注意が必要である。

第 2 章

治療抵抗性抗糸球体基底膜抗体病の抗糸球体基底膜抗体が認識するエピトープ

本章の内容は、以下の論文で公表した。

Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Nergui M, Jia X, Cui Z, Zhao MH, Nakabayashi K, Ishizu A. Epitope recognized by anti-glomerular basement membrane (GBM) antibody in a patient with repeated relapse of anti-GBM disease. Exp Mol Pathol 107: 165-170, 2019.

2-1. 緒言

抗 GBM 抗体が認識する主要なエピトープである E_A と E_B は、抗原分子の立体構造上、正常では潜在状態にある（Vanacore et al., 2011）。抗 GBM 病では、何らかの原因によりこれらエピトープが表出することで、抗 GBM 抗体がエピトープに結合し、組織が障害される。

抗 GBM 病は稀な疾患とされており、急速進行性腎炎症候群の全国的な調査に登録された患者の原因疾患で最も多いのは pauci-immune 型半月体形成性糸球体腎炎と AAV であり、両者が約半数を占めるが、抗 GBM 病は約 6%にすぎない（Hirayama et al., 2008; Koyama et al., 2009）。本邦における発症年齢のピークは 50〜60 歳台で、男性よりも女性にやや多い。AAV と比較すると抗 GBM 病は腎予後が不良で生存率が低いことが知られている一方で、通常は単発に発症（single attack: SA）し、十分な治療を行えば、寛解後に再燃することはほとんどない。初期治療には、副腎皮質ステロイドパルス、免疫抑制剤、血漿交換療法の併用が推奨されており（Cui et al., 2011）、一定期間を経過すれば免疫抑制療法を中止することも可能である。本研究では、治療抵抗性を示し再燃を繰り返す（repeat relapse: RR）抗 GBM 病患者の抗 GBM 抗体に着目した。抗 GBM 病患者血漿中の抗 GBM 抗体の多くは α3(IV)NC1 領域内のエピトープを認識するが、他の α サブユニットに対する抗体を同時に持ち合わせることもある（Hellmark et al., 1994; Yang et al., 2007）。Zhao らは、血清中の抗 GBM 抗体と反応する α サブユニットの数が抗 GBM 病の重症度と関連することを報告している（Zhao, Cui, et al., 2009）。そこで、RR 患者の血清 IgG は他の α サブユニット（α1、α2、α4、α5）にも反応する可能性があると推測したが、結果は予想に反し、α3 サブユニットとしか反応しなかった。

本研究では、ホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE）正常腎組織切片の免疫組織化学（immunohistochemistry: IHC）とリコンビナントヒト α3(IV)NC1 を用いたウェスタンブロッティングにより、抗 GBM 病の RR 患者と SA 患者の抗 GBM 抗体が認識するエピトープを比較した。

2-2.　対象と方法

2-2-1.　対象

RR 症例は杏林大学病院を受診した 21 歳女性、非喫煙者。7 年前に、急速進行性腎障害、血清抗 GBM 抗体陽性（234 U/ml; 正常値<10 U/ml)、血清 C 反応性タンパク質（C-reactive protein: CRP）高値（21.0 mg/dl; 正常値<0.30 mg/dl)、そして腎生検によるびまん性半月体形成性糸球体腎炎より抗 GBM 病と診断された。緊急的な血液透析と、血漿交換 10 回を実施し、グルココルチコイド治療（初回プレドニゾロン投与: 40 mg/日）を行った。治療開始 1 か月後、抗 GBM 抗体と CRP は 34 U/ml と 3.0 mg/dl に低下し、さらに 5 か月後には 10 U/ml と検出感度以下になった。疾患活動性はコントロールされていたが、重度の腎機能障害により定期的な透析が必要であった。数か月後（プレドニゾロン投与: 10 mg/日)、38〜39℃の高熱と血清抗 GBM 抗体価（152 U/ml）および CRP（8.13 mg/dl）の上昇を伴い再燃した。その際はプレドニゾロンの増量（30 mg/日）により再燃は収まった。その後、数回肺出血をきたし、その都度グルココルチコイドの増量とシクロホスファミドの追加投与で治療を行った。腎生検については繰り返されなかった。

入院時の検査では、身長 155 cm、体重 45 kg、体温 36.8℃、血圧 130/70 mmHg、脈拍 82 回/分であった。ヘモグロビン濃度 10.7 g/dl、白血球数 9,500 /μl、血小板数 22.3×10^4 /μl であった。血中尿素窒素 57.5 mg/dl、クレアチニン 10.8 mg/dl で腎不全状態であった。血清抗 GBM 抗体価は 11.6 U/ml であり、CRP は検出感度以下であった。その他の自己抗体（ANA、抗 DNA 抗体、リウマトイド因子、ANCA、抗 SS-A 抗体）は陰性であった。

対照として、杏林大学病院で抗 GBM 病と診断、治療された症例（SA1, SA2）の血清と北海道大学病院で抗 GBM 病と診断、治療された症例（SA3, SA4）の血清を用いた。血清は、患者から文書によるインフォームドコンセントを得た後に採取した。本研究は北海道大学大学院保健科学研究院倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号: 17-24)。

2-2-2.　抗 GBM 抗体の抗体価測定

血清中の抗 GBM 抗体価は、リコンビナントヒト α3(IV)NC1 を抗原とした Fluorescence enzyme immunoassay（FEIA）法を用いて株式会社 岸本第一検査センター（Sapporo, Japan）で測定した（Table 3)。血清から IgG を抽出するために Protein G を担体とした免疫吸着カラム（Protein G HP SpinTrap, Cytiva, Tokyo, Japan）を使用した。抽出した IgG 溶液の抗 GBM 抗体価を FEIA 法にて測定した後に、IgG 溶液の濃度を 100 mU/ml または 1 U/ml に調整した。

Table 3. 患者血清の抗 GBM 抗体価

Patient ID	Titer (U/ml)
RR	57.3
SA1	355.2
SA2	131.9
SA3	234.4
SA4	156.0

2-2-3.　試薬

5 種類のαサブユニットのリコンビナントヒト IV 型コラーゲンα鎖 NC1 ドメイン｛α(IV)NC1｝である、α1(IV)NC1、α2(IV)NC1、α3(IV)NC1、α4(IV)NC1、α5(IV)NC1 は Cloud-Clone（Katy, TX, USA）より購入した。ラット抗ヒトα3(IV)NC1 抗体（clone: H31, IgG2a）は Chondrex（Redmond, WA, USA）より購入した。Horseradish peroxidase（HRP）標識ヤギ抗ラット IgG2a 抗体は Bio-Rad Laboratories（Hercules, CA, USA）より購入した。HRP 標識ウサギ抗ヒト IgG 抗体は Gene Tex（Irvine, CA, USA）より購入した。*Streptomyces griseus* 由来のプロテアーゼは Sigma-Aldrich（St. Louis, MO, USA）より購入した。

2-2-4.　ウェスタンブロッティング

α1〜5(IV)NC1（500 または 200 ng/lane）を還元条件下で 15% sodium dodecyl sulfate (SDS)-ポリアクリルアミドゲルに泳動し、ゲルに含まれるタンパクを Coomassie brilliant blue（CBB）で染色（500 ng/lane)、または polyvinylidene difluoride（PVDF）膜に転写（200 ng/lane）した。転写した膜は、抗体の非特異結合を阻止するために 1% スキムミルクを添加した PBS with 0.05% Tween-20（PBS-T）でブロッキングした後に、患者 IgG 溶液（抗 GBM 抗体価：100 mU/ml）で一晩、4℃で反応させた。PBS-T で洗浄後、膜を HRP 標識ウサギ抗ヒト IgG 抗体（10000 倍希釈）に 1 時間、室温で反応させた。PBS-T で洗浄後、膜上の HRP 活性を、化学発光法を用いて ImageQuant LAS 4000（Cytiva）で検出した。

別の実験として、リコンビナントヒトα3(IV)NC1（100 μg/ml）を等量のプロテアーゼ（1 μg/ml）と混合させ、一晩 37℃に静置した後に、プロテアーゼを不活化させるために 80℃で 15 分間加温した。得られたサンプル（500 または 200 ng/lane）を還元条件下で 15% SDS-ポリアクリルアミドゲルに泳動し、ゲルに含まれるタンパクを CBB で染色（500 ng/lane)、または PVDF 膜に転写（200 ng/lane）した。ブロッキングした後に、一次抗体として RR 患者 IgG 溶液（抗 GBM 抗体価：100 mU/ml）または抗α3(IV)NC1 抗体（50000 倍希釈）を、二次抗体として HRP 標識ウサギ抗ヒト IgG 抗体（10000 倍希釈）または HRP 標識ヤギ抗ラット IgG2a 抗体（500000 倍希釈）を反応させた。膜上の HRP 活性を、化学発光法を用いて ImageQuant LAS 4000 で検出した。

2-2-5.　FFPE 組織標本

ユーイング肉腫で死亡したが腎病変を示さなかった患者の腎組織を、病理学的な異常所見がないことを確認の上、正常腎組織として使用した。腎組織を 10% ホルマリンで固定した後にパラフィンで包埋した。腎組織は約 4 μm に薄切し、シランコートされたスライドガラスに貼り付けた。

2-2-6.　IHC

キシレンで脱パラフィンした FFPE 腎組織切片に対し、Naito らの既報に基づき酸性条件下（0.2 M HCl, pH 0.9）でオートクレーブを用いて 121℃、6 分間の熱処理を加えた（Naito et al., 2003）。内在性のペルオキシダーゼを失活させるために 3% 過酸化水素加メタノールに切片をさらし、抗体の非特異結合を避けるために Protein Block Serum-free (Agilent, Santa Clara, CA, USA）でブロッキングを行った。一次抗体として患者 IgG 溶液（抗 GBM 抗体価：1 U/ml）を 1 時間、室温で反応させた。PBS で洗浄後、HRP 標識ウサギ抗ヒト IgG 抗体（1000 倍希釈）を 1 時間、室温で反応させた。PBS で洗浄後、切片上の HRP 活性を 3,3'-diaminobenzidine (DAB）で検出した。対比染色としてマイヤーのヘマトキシリン液により核を染色した。陽性対照（positive control: PC）として、一次抗体に抗 α3(IV)NC1 抗体（1000 倍希釈）を、二次抗体に HRP 標識ヤギ抗ラット IgG2a 抗体（1000 倍希釈）をそれぞれ使用した。

2-2-7.　Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

RR 患者における抗 GBM IgG サブクラスの検出や IgG 中の抗 E_A 抗体と抗 E_B 抗体の検出は、Hu らの既報に基づき ELISA で実施した（Hu et al., 2017）。

2-3.　結果

2-3-1.　α1～5(IV)NC1 に対する抗 GBM 抗体の反応性

初めに、抗 GBM 病患者から抽出した IgG が α3(IV)NC1 以外の α(IV)NC1 にも反応するか、リコンビナントヒト α(IV)NC1 のウェスタンブロッティングで検討した（Figure 8）。RR 患者では α3(IV)NC1 にのみ反応が認められたが、SA 患者では α3(IV)NC1 の他に 2～4 種類の α(IV)NC1 にも反応が認められた。

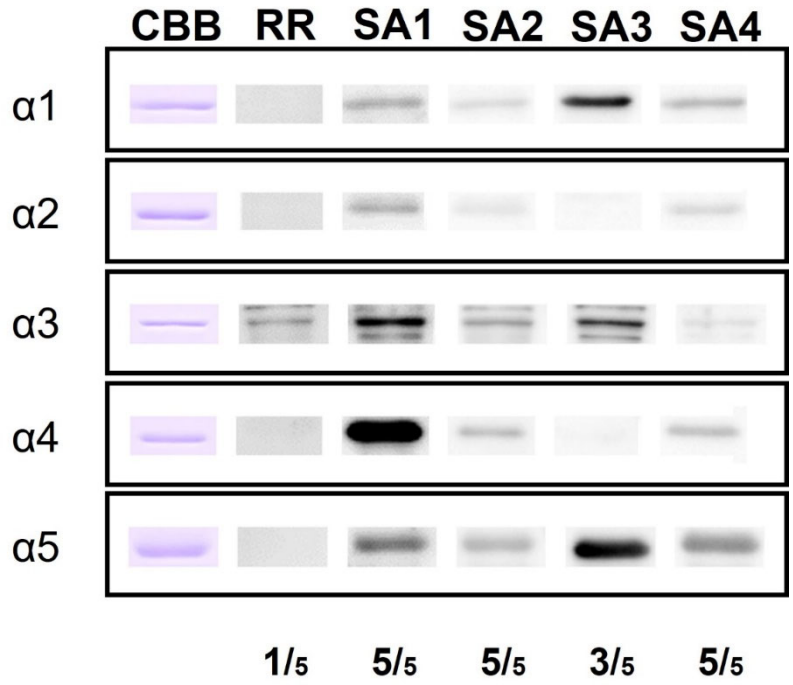

Figure 8. ウェスタンブロッティングでの α1～5(IV)NC1 に対する抗 GBM 抗体の反応性
5 種類のリコンビナントヒト α(IV)NC1 である α1(IV)NC1、α2(IV)NC1、α3(IV)NC1、α4(IV)NC1、α5(IV)NC1 を還元条件下で SDS-ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し、CBB 染色（500 ng/ml）または転写した PVDF 膜（200 ng/ml）を抗 GBM 病患者 IgG と反応させた。下部に各患者 IgG と反応した α(IV)NC1 の数を表記した。

2-3-2.　FFPE 腎組織切片における賦活化したα3(IV)NC1 に対する抗 GBM 抗体の反応性

α3(IV)NC1 に存在する抗 GBM 抗体の主要なエピトープは、通常、Col(IV)の立体構造上、潜在状態にある。そのため、IHC において抗原賦活化処理をしない場合には、抗α3(IV)NC1 モノクローナル抗体は FFPE 正常腎組織切片上のエピトープに結合できない(Figure 9A)。Naito らによって、α3(IV)NC1 を賦活化するには酸性条件下（0.2 M HCl, pH 0.9）での熱処理が必要であると報告されている（Naito et al., 2003)。本検討においても、IHC で一般的な熱賦活化処理である pH 6.0 条件下（0.01 M クエン酸緩衝液)ではα3(IV)NC1 の陽性所見は得られなかった一方、既報（Naito et al., 2003）に従い事前に酸性熱処理することで、GBM とボウマン嚢基底膜の血管極側に陽性所見が観察され、特にボウマン嚢基底膜の血管極側に強い陽性像が認められた。

酸性熱処理により FFPE 腎組織切片の GBM 抗原が賦活化されることを確認した後、抗 GBM 病患者 IgG (1 U/ml) が GBM 抗原と結合するか IHC で検証した。その結果、SA 患者 IgG ではいずれも抗α3(IV)NC1 モノクローナル抗体同様の明瞭な陽性像が観察されたのに対し、RR 患者の IgG では弱い反応しか観察されなかった（Figure 9B)。

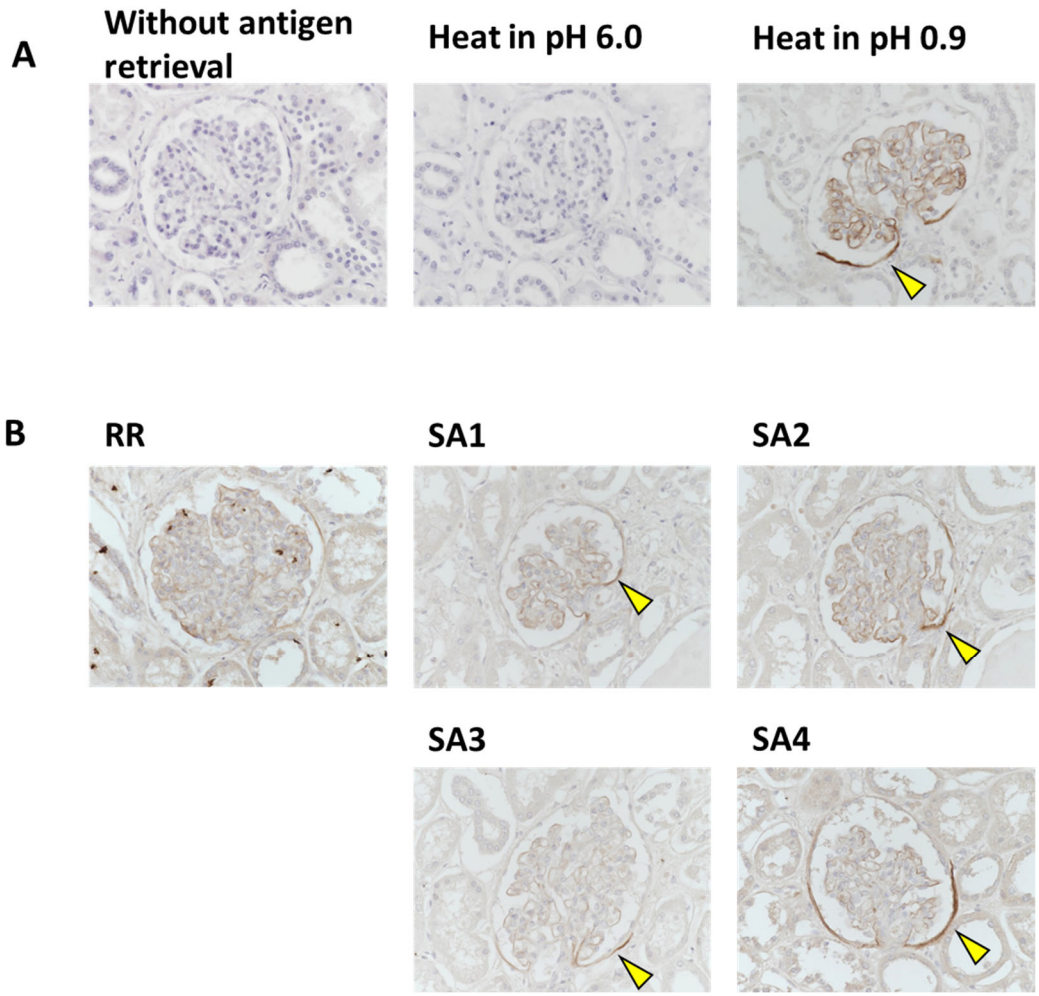

Figure 9. IHC での FFPE 腎組織切片上の α3(IV)NC1 に対する抗 GBM 抗体の反応性

FFPE 正常腎組織切片を脱パラフィン後、抗 α3(IV)NC1 モノクローナル抗体（A）または抗 GBM 病患者 IgG（B）を一次抗体とした IHC を施行した。

（A）熱処理なし、中性または酸性条件下での熱処理後に、抗 α3(IV)NC1 を一次抗体とした IHC を施行した。左：熱処理なし、中央：pH 6.0（0.01 M クエン酸緩衝液）での熱処理、右：pH 0.9（0.2 M HCl）での熱処理。

（B）pH 0.9 での熱処理後に抗 GBM 病患者 IgG を一次抗体とした IHC を施行した。RR と SA では基底膜に対する染色性が異なっていた。

黄矢頭：ボウマン嚢基底膜の血管極側への強い線状の陽性像。画像は代表例。元画像の撮影倍率：400 倍。

2-3-3.　RR 患者の抗 GBM 抗体が認識するエピトープ

RR 患者 IgG を一次抗体としたヒトリコンビナント α3(IV)NC1 のウェスタンブロッティングを再検証したところ、whole の α3(IV)NC1 に相当する 56.8 kDa のバンドの他に、18 kDa の位置にもバンドが検出されていたことに気付いた（Figure 10A)。この 18 kDa のタンパク質は、自然に分解された α3(IV)NC1 の断片であると考えた。この仮説を検証するために、プロテアーゼ消化した α3(IV)NC1 を抗原として、RR 患者 IgG および抗 α3(IV)NC1 モノクローナル抗体を一次抗体としたウェスタンブロットを行った（Figure 10B)。一次抗体として RR 患者 IgG を使用した場合、プロテアーゼ消化に関わらず 18 kDa のバンドが検出されたが、プロテアーゼ消化により 56.8 kDa のバンドは消失した。膜に結合している抗体を除去した後、次に一次抗体として抗 α3(IV)NC1 モノクローナル抗体と反応させた。その結果、プロテアーゼ消化の前後で 18 kDa のバンドは検出されなかった。

さらに、18 kDa タンパクの IgG に対する反応性について RR 患者と SA 患者で比較した (Figure 11)。SA1 患者 IgG を一次抗体として用いた場合に 18 kDa のバンドが検出されたが、whole の α3(IV)NC1 に相当する 56.8 kDa のタンパクに対する反応に比べると明らかに弱いものであった。SA1 以外の SA 患者 IgG では、18 kDa のタンパク質に対する反応は認められなかった。

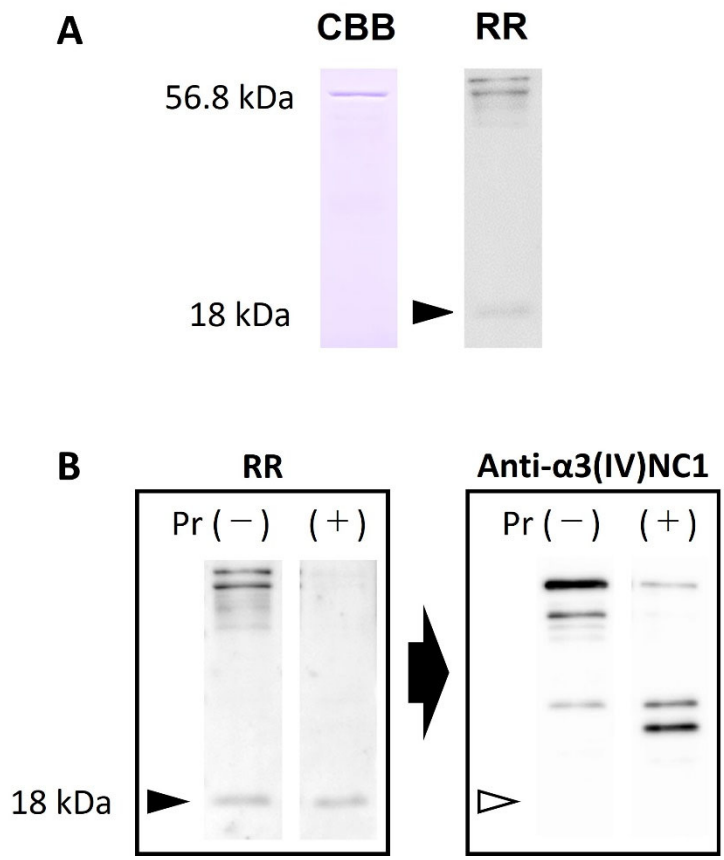

Figure 10. RR 患者の抗 GBM 抗体が認識するエピトープ

(A) RR 患者 IgG を一次抗体としたリコンビナントヒトα3(IV)NC1 のウェスタンブロッティング。CBB 染色で確認される whole のα3(IV)NC1 に相当する 56.8 kDa のバンドに加えて 18 kDa のバンド（▶）も検出されていた。

(B) RR 患者 IgG と抗 α3(IV)NC1 モノクローナル抗体を一次抗体として、プロテアーゼ（Pr）で消化したリコンビナントヒト α3(IV)NC1 を抗原としたウェスタンブロッティングを施行した。一次抗体として RR 患者 IgG を反応させた場合、プロテアーゼ消化に関係なく 18 kDa のバンドが検出された（▶）が、56.8 kDa のバンドはプロテアーゼ消化により消失した。検出後の PVDF 膜から抗体を剥離し、次に一次抗体として抗 α3(IV)NC1 モノクローナル抗体を反応させた。その結果、18 kDa のバンドはプロテアーゼ消化の前後で検出されなかった(▷)。

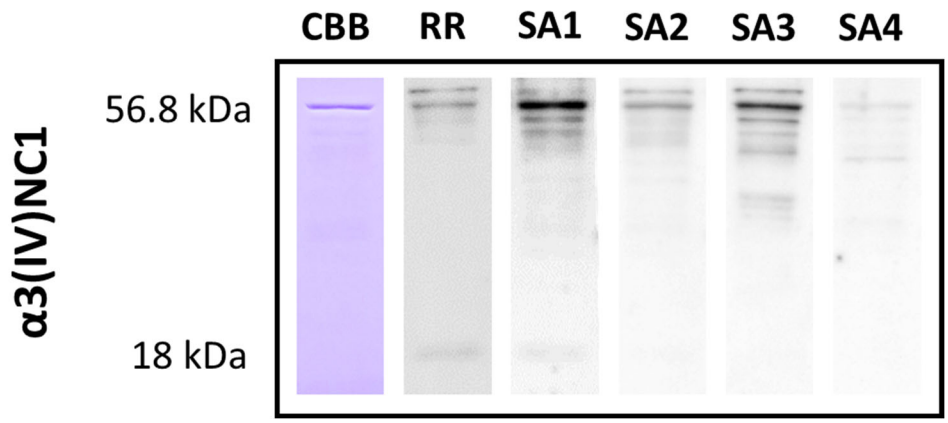

Figure 11. 患者 IgG を一次抗体としたα3(IV)NC1 のウェスタンブロッティング

抗 GBM 病患者 IgG を一次抗体としたリコンビナントヒトα3(IV)NC1 のウェスタンブロッティング。RR 患者では CBB 染色で確認される whole のα3(IV)NC1 に相当する 56.8 kDa のバンドに加えて 18 kDa のバンドも検出されたが、SA 患者では SA1 を除き 18 kDa のバンドは検出されなかった。

2-3-4.　RR 患者の抗 GBM 抗体と E_A、E_B との反応性

RR患者の抗GBM IgGサブクラスの解析と、抗GBM抗体の主要なエピトープであるE_A、E_B との反応性を検証するために、RR 患者 IgG を ELISA で測定した。その結果、RR 患者の抗 GBM IgG はすべてのサブクラスを含んでいた。E_A、E_B を固相化した ELISA には明らかな反応を示さなかった（データ非提示)。

2-4. 考察

抗 GBM 病は稀な疾患である。再燃を繰り返す抗 GBM 病はさらに稀で、再燃を経験する患者は約 3%とされている（Levy et al., 2001; McAdoo & Pusey, 2017)。頻回再燃症例の抗 GBM 病患者の報告はいくつかあるが（Borza et al., 2005; Levy et al., 1996; Liu et al., 2016)、それらの報告によるとタバコ煙や化学物質などの肺刺激物への継続的な曝露が再燃に関連している可能性が高いと推測されている。一方、本研究で提示した RR 患者は非喫煙者であり、原因となる汚染物質にも暴露されていない。したがって、本症例が再燃を繰り返した理由は不明である。

抗 GBM 病患者の抗 GBM 抗体の多くは α3(IV)NC1 領域内の潜在エピトープを認識するが、中には他の α サブユニットを認識する抗体を併せ持つ場合もある（Hellmark et al., 1994; Yang et al., 2007)。血清中の抗 GBM 抗体が認識する α サブユニットの数は、疾患の重症度と関連することが報告されている（Zhao, Cui, et al., 2009)。したがって、RR 患者の血清 IgG は、α3 サブユニットだけでなく、他の α サブユニット（α1、α2、α4、α5)も認識する可能性があると予想された。しかし、α1〜5(IV)NC1 を抗原としたウェスタンブロッティングの結果、SA 患者（SA1〜SA4) IgG は α3(IV)NC1 以外に少なくとも 2 種類の α(IV)NC1 に反応したが、予想に反して、RR 患者 IgG は α3(IV)NC1 にのみ反応した。このことは、抗 GBM 抗体が認識する α サブユニットの数は、疾患の重症度とは関連するが、必ずしも抗 GBM 病の臨床経過を反映するものではないことを示唆している。

そこで本研究では、RR 患者の抗 GBM 抗体が認識するエピトープは、SA 患者の抗 GBM 抗体が認識するエピトープとは異なると仮説を立てた。この仮説を検証するため、まず、患者 IgG を一次抗体とした FFPE 正常腎組織切片を用いた IHC を実施した。FFPE 切片を酸性条件下（0.2 M HCl, pH 0.9）で加熱することにより、α3(IV)NC1 領域にある潜在エピトープを表出できると報告されているが（Naito et al., 2003)、これは、加熱後の冷却過程における直線化タンパクのリフォールディングが酸性条件下で阻害され、その結果として潜在エピトープが表出されるためと考えられている（Emoto et al., 2005)。興味深いことに、SA 患者 IgG では、抗 α3(IV)NC1 モノクローナル抗体と同様、GBM の明瞭な染色像が観察されたのに対し、RR 患者 IgG では GBM の染色性は弱かった。この結果は、上記の仮説の妥当性を支持するものであった。

RR 患者の抗 GBM 抗体が認識するエピトープを解明するために、RR 患者 IgG を一次抗体として用いたリコンビナントヒト α3(IV)NC1 のウェスタンブロッティング結果を再検討し、whole の α3(IV)NC1 の分子量に相当する 56.8 kDa のバンドの他に検出された 18 kDa のバンドに注目した。α3(IV)NC1 をプロテアーゼで消化すると 56.8 kDa のバンドは消失したが、18 kDa のバンドは残存した。さらに、抗 α3(IV)NC1 モノクローナル抗体では 18 kDa のバンドは検出されなかった。これらのことから、RR 患者 IgG は、3-4-5α サブユニット六量体の単なる解離ではなく、NC1 ドメインの分解などの破壊的構造変化によ

り表出する、これ以上分解されないエピトープを認識していることが示唆された（Figure 12)。

SA1 患者でも 18 kDa のタンパクに対する IgG の反応性が観察されたが、その強度は 56.8 kDa の whole の α3(IV)NC1 に対するものに比べて弱かった。一方、RR 患者では、18 kDa のタンパクに対する IgG の反応性が whole の α3(IV)NC1 に対する反応性と同程度であった。したがって、18 kDa タンパクに対する抗 GBM 抗体の有無ではなく、血漿中の抗 GBM 抗体に占める 18 kDa タンパクに対する抗体の割合が抗 GBM 病の臨床経過と関連している可能性が考えられた。

α3(IV)NC1 の破壊的な変化を誘発する遺伝的あるいは環境的要因は不明である。しかし、先行する感染と抗 GBM 病の発症との関連はよく知られている（Craig et al., 2013; Kashif et al., 2013; Sakoda et al., 2011; Silvariño et al., 2014; Wen & Wen, 2013; Wu et al., 2005)。微生物由来のプロテアーゼは、α3(IV)NC1 の破壊を誘発する可能性がある。さらに、抗 GBM 病は、AAV に合併することがある（Chan & Leung, 2016; Srivastava et al., 2013)。AAV の病態には好中球の活性化が重要な役割を果たしており、活性化した好中球からはプロテアーゼ活性を有する数種類の酵素が放出される（Jennette & Falk, 2014)。したがって、活性化好中球由来のプロテアーゼによる GBM の破壊が、抗 GBM 病の発症に関与している可能性がある。

本研究では、RR 患者の抗 GBM 抗体が認識するエピトープが、SA 患者の抗 GBM 抗体が認識するエピトープとは異なることを証明した。本研究の限界は、RR 患者が 1 例のみであることである。前述したように抗 GBM 病は稀な疾患であり、その中で治療抵抗性を示す頻回再燃症例はさらに稀なため、例数を増やすには大規模かつ長期的な計画が必要となり、今後の研究課題である。

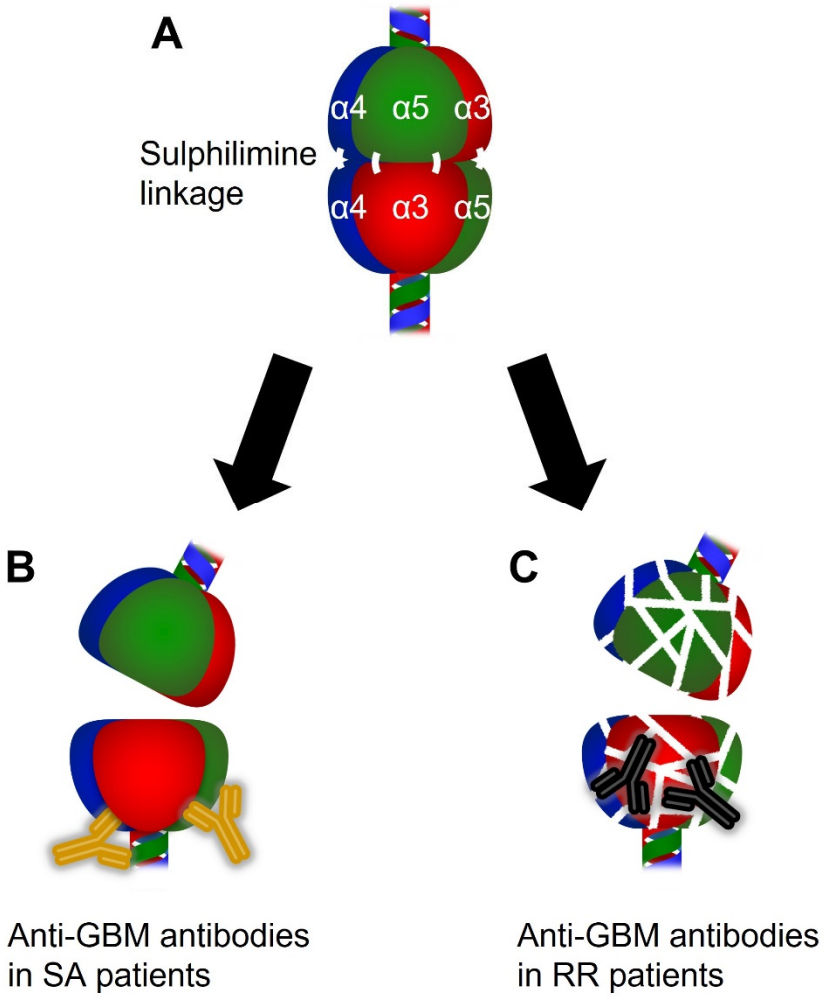

Figure 12. SA 患者と RR 患者の抗 GBM 抗体のエピトープ認識の違いについての仮説

(A) Col(IV)の NC1 ドメインでは、2 つの 3-4-5 α サブユニット三量体がスルフィルイミン結合により六量体を形成している。

(B) 抗 GBM 抗体が認識する一般的なエピトープは、NC1 ドメインの六量体形成によって立体構造上、潜在状態にある。スルフィルイミン結合が切断されることで六量体形成が解離した場合、抗 GBM 抗体が表出したエピトープに結合し、補体カスケードが活性化され、補体依存性の組織破壊が起こる。

(C) RR 患者の抗 GBM 抗体は、3-4-5 α サブユニットの単純な解離ではなく NC1 ドメインの破壊的構造変化（プロテーゼ消化など）によって表出するエピトープを認識していると推測される。

2-5. 結論

本研究により、以下のことが明らかとなった。

- SA 患者からは複数の α サブユニットに対する抗体が検出された一方で、RR 患者からは $\alpha 3$ サブユニットに対する抗体のみが検出された。
- 酸性熱処理法を用いた正常腎 GBM に対する染色性については、SA 患者血清から抽出した IgG は抗 $\alpha 3$(IV)NC1 モノクローナル抗体同様の明瞭な染色性を示したが、RR 患者から抽出した IgG は弱い染色性しか示さなかった。
- RR 患者の血清中に whole の $\alpha 3$(IV)NC1 に加え、18 kDa のタンパクに対する抗 GBM 抗体を検出した。18 kDa のタンパクはプロテアーゼ消化後も残存した。

RR 患者の抗 GBM 抗体は、NC1 ドメイン六量体の単なる解離ではなく、NC1 ドメインの破壊により表出するエピトープを認識していることが示唆された。さらなる研究が必要であるが、抗 GBM 抗体によって認識されるエピトープの違いは抗 GBM 病の臨床経過の違いに反映される可能性がある。

第 3 章

抗好中球細胞質抗体に続き抗糸球体基底膜抗体が産生されるメカニズム

本章の内容は、以下の論文で公表した。

Nishibata Y, Nonokawa M, Tamura Y, Higashi R, Suzuki K, Hayashi H, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of intermolecular epitope spreading in the production of anti-glomerular basement membrane antibody in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Clin Exp Rheumatol 40(4): 691-704, 2022.

3-1. 緒言

AAV は血漿中の ANCA 陽性を特徴とする全身性の小型血管炎である（Felicetti et al., 2020; Jennette et al., 2013)。ANCA による好中球の活性化は AAV の病態形成に重要な役割を果たしており(Nakazawa et al., 2019)、ANCA によって活性化された好中球は NE などのプロテアーゼを放出する。実際に MPO-AAV では、糸球体病変部に好中球をはじめとする MPO 陽性細胞の浸潤と細胞外 MPO の沈着が確認されている（Kawashima et al., 2013)。

抗 GBM 病は、抗 GBM 抗体の産生を伴うびまん性半月体形成性壊死性糸球体腎炎および肺出血を特徴とする臓器特異的自己免疫疾患である（McAdoo et al., 2017)。抗 GBM 病患者の血清は、正常腎組織の凍結切片を用いた免疫蛍光法（immunofluorescence: IF)で GBM に結合することが示されている（Hara et al., 1986)。一方、FFPE 正常腎組織切片を用いた IHC では、抗 α3(IV)NC1 モノクローナル抗体は適切な抗原賦活化なしには GBM 抗原のエピトープに結合しない（Naito et al., 2003)。第 2 章で示したように、酸性条件下で熱処理をすることにより、加熱によって直線化したタンパクの冷却に伴うリフォールディングが阻害される結果（Emoto et al., 2005)、GBM 抗原の潜在エピトープが表出する。興味深いことに、プロテアーゼ処理によっても FFPE 正常腎組織切片の α3(IV)NC1 を表出させることができたという報告がある（Guan et al., 2008)。

抗 GBM 病患者の約 30%は血漿中に ANCA を保有し、AAV 患者の 5%は循環抗 GBM 抗体が陽性である（Levy et al., 2004)。Olson らは、抗 GBM 抗体検出の少なくとも 1 年前に ANCA が産生されている抗 GBM 病患者がいることを指摘している（Olson et al., 2011)。これらの知見は、AAV と抗 GBM 病の関連を示唆するものである。Xie らは、MPO-ANCA と抗 GBM 抗体の二重陽性の患者を報告した（Xie et al., 2015)。腎生検で GBM 上に線状の IgG 沈着が認められ、ELISA によって血清の抗 GBM 抗体が α3(IV)NC1 を認識していることが確認されている。腎組織切片を用いた IHC で抗 GBM 抗体保有患者の糸球体における α3(IV)NC1 の表出を直接示すことは、エピトープが血漿中の抗体によって既に占拠されているため困難であるが、Xie らの報告は、抗 GBM 抗体を持つ AAV 患者の糸球体において α3(IV)NC1 が表出していることを間接的に示していると言える。

これらの証拠から、ANCA によって活性化された好中球から放出されるプロテアーゼが、Col(IV)の 3-4-5α サブユニット NC1 ドメインの三量体同士を繋いでいるスルフィルイミン結合に隣接するペプチド結合を切断することで α3(IV)NC1 の潜在エピトープの表出につながり、結果として、免疫システムが GBM エピトープを認識すると仮説を立てた。

本研究では、ANCA に続き抗 GBM 抗体が産生されるメカニズムについて、前述した仮説を検証するべく *in vivo* および *in vitro* で検討を行った。

3-2.　対象と方法

3-2-1.　ヒト由来の検体

剖検によって得られた FFPE 腎組織を使用した。腎疾患は、MPA（n=4)、IgA 腎症（IgA nephropathy: IgAN; n=2)、高血圧性動脈硬化症（Arteriosclerosis; n=3）である。ユーイング肉腫で死亡したが腎病変を示さなかった患者の腎組織を、病理学的な異常所見がないことを確認の上、正常腎組織として使用した。抗 GBM 抗体は全例陰性であった。健康なボランティアから、書面によるインフォームドコンセントを得た後、末梢血（10 ml）を入手した。本研究は北海道大学大学院保健科学研究院における研究倫理審査委員会の承認を受けて実施した（承認番号: 17-85, 18-7, 18-34)。

3-2-2.　動物

3 週齢、雄性の Wistar-Kyoto (WKY）ラットを三協ラボラトリー（Sapporo, Japan）より購入し、使用した。動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認を得て（承認番号: 15-0034)、「北海道大学動物実験に関する規定」に従い実施した。

3-2-3.　試薬

百日咳毒素と phorbol myristate acetate（PMA）は Sigma-Aldrich より購入した。NE は Abcam (Cambridge, UK）より購入した。リコンビナントヒト MPO 軽鎖は Cloud-Clone より購入した。ヒト由来 MPO は RayBiotech (Peachtree Corners, GA, USA）または Elastin Products Company (Owensville, MO, USA）より購入した。

3-2-4.　抗体

一次抗体として、ラット抗 α3(IV)NC1 モノクローナル抗体（clone H31, IgG2a)、ウサギ抗 α3(IV)NC1 ポリクローナル抗体（Cloud-Clone)、マウス抗 tumstatin, α3(IV)NC1 モノクローナル抗体（clone MAB7546, IgG1; Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA)、ウサギ抗 CD11c ポリクローナル抗体（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、マウス抗 CD68 モノクローナル抗体（clone KP1, IgG1; Abcam）を使用した。二次抗体として、HRP 標識ヤギ抗ラット IgG1 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)、IgG2a (Bio-Rad Laboratories)、IgG2b (Bio-Rad Laboratories）抗体や、HRP 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Bethyl Laboratories)、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)、HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（SeraCare Life Sciences, Milford, MA, USA)、FITC 標識ウサギ抗ラット IgG 抗体（Agilent)、Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（Abcam)、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（Abcam）を使用した。

3-2-5.　FFPE 正常腎組織切片の抗原賦活化

FFPE 正常腎組織を約 4 μm に薄切してシランコートされたスライドガラスに載せた。キシレンによる脱パラフィン後、酸性条件下（0.2 M HCl、pH 0.9、6 分間）、中性条件下（クエン酸緩衝液、pH 6.0、10 分間）、アルカリ性条件下（Tris-EDTA、pH 9.0、20 分間）でオートクレーブにより 121℃に加熱した。対照として加熱しなかった切片を使用した。

別の実験では、FFPE 正常腎組織切片を脱パラフィン後、中性条件下で加熱し、*S. griseus* 由来のプロテアーゼ（0.5 mg/ml）に 37℃で 30 分間反応させた。5 分間流水洗した後、α3(IV)NC1 の IHC を実施した。

3-2-6.　FFPE 正常腎組織切片を用いたα3(IV)NC1 の IHC

抗原賦活後、切片を 3% 過酸化水素加メタノールにさらして組織中のペルオキシダーゼを不活化した。抗体の非特異的結合をブロックした後、ラット抗 α3(IV)NC1 抗体（1000 倍希釈）と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、HRP 標識ヤギ抗ラット IgG2a 抗体（1000 倍希釈）と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、切片上の HRP 活性を DAB 基質で検出し、マイヤーのヘマトキシリン液で対比染色を行った。

3-2-7.　プロテアーゼによる Col(IV)分解

Col(IV) 1 mg/ml と等量の *S. griseus* 由来のプロテアーゼ（終濃度 0、1.25、12.5、125、1250 μg/ml）または NE（終濃度 0、125、250、500、1000、2000 μU/ml）を 37℃で 30 分間反応させた。その後、80℃で 15 分間加熱して酵素を失活させた。検体は ELISA に供し、α3(IV)NC1 を検出した。

3-2-8.　ELISA によるα3(IV)NC1 検出

96 ウェルプレート（Thermo Fisher Scientific）のウェルに 5 μg/ml のラット抗 α3(IV)NC1 抗体（50 μl/well）を 4℃で一晩、固相した。PBS-T で 4 回洗浄後、抗体の非特異結合を阻止するために 1% スキムミルク含有 PBS-T（150 μl/well）をウェルに加えて、室温で 1 時間静置した。ブロッキング液を除去した後、PC として α3(IV)NC1（1.25 μg/ml）または試料（50 μl/well）を加え、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、1 μg/ml ウサギ抗 α3(IV)NC1 ポリクローナル抗体（50 μl/well）を加え、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、さらに 20000 倍に希釈した HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（50 μl/well）と共に室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、3,3,5,5-tetramethylbenzidine（TMB）をウェルに添加し、遮光状態で静置した。30 分後に 1 M H_2SO_4 を加えて反応を停止させ、Multiskan FC（Thermo Fisher Scientific）を用いて 450 nm の吸光度を測定した。PC の吸光度を 100 とし，試料の相対値（反応率）を算出した.

3-2-9.　IHC による患者の FFPE 腎組織切片のα3(IV)NC1 とマクロファージの検出

腎疾患患者の FFPE 腎組織切片を Tris-EDTA 溶液に浸し、121℃で 20 分間オートクレーブした。その後、3% 過酸化水素加メタノールで組織中のペルオキシダーゼを不活化した。抗体の非特異的結合をブロックした後、ラット抗 α3(IV)NC1 抗体（1000 倍希釈）と室温で 1 時間反応をさせた。アイソタイプコントロールとして、ラット IgG2a（MBL）を使用した。PBS で洗浄後、HRP 標識ヤギ抗ラット IgG2a 抗体（1000 倍希釈）と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、切片上の HRP 活性を DAB 基質で検出し、マイヤーのヘマトキシリン液で対比染色した。

別の実験では、α3(IV)NC1 で染色した切片を、さらにウサギ抗 CD11c ポリクローナル抗体（500 倍希釈）と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、切片をアルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase, AP）ポリマー試薬（Agilent）と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、切片上の AP 活性をフクシン発色基質で検出し、マイヤーのヘマトキシリン液で対比染色した。

また、腎疾患患者の FFPE 腎組織切片をクエン酸緩衝液に浸し、121℃で 20 分間オートクレーブして抗原を賦活した。その後、内因性ペルオキシダーゼの不活化と抗体の非特異的結合をブロックした後、マウス抗 CD68 モノクローナル抗体（50 倍希釈）と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、次に HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（100 倍希釈）と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、切片上の HRP 活性を DAB 基質で検出し、マイヤーのヘマトキシリン液で対比染色した。

3-2-10.　IF による患者の FFPE 腎組織切片のα3(IV)NC1 とマクロファージの検出

患者の FFPE 腎組織切片は、Tris-EDTA 溶液に浸し、121℃で 20 分間オートクレーブした。その後、非特異的抗体結合のブロッキングを行い、ウサギ抗 CD11c ポリクローナル抗体（500 倍希釈）と 4℃で一晩反応させた。PBS で洗浄後、Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（1000 倍希釈）と室温で 1 時間反応させた。次に、切片をマウス抗 CD68 モノクローナル抗体（50 倍希釈）と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（500 倍希釈）と室温で 1 時間反応させ、続いて DAPI 入り封入剤を用いて封入した。

別の実験では、非特異的な抗体結合をブロックした後、FFPE 腎組織切片をマウス抗 tumstatin, α3(IV)NC1 モノクローナル抗体（500 倍希釈）およびウサギ抗 CD11c ポリクローナル抗体（500 倍希釈）と 4℃で一晩反応させた。PBS で洗浄後、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（500 倍希釈）および Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（1000 倍希釈）に室温で 1 時間反応させ、DAPI 入り封入剤で封入した。

切片は蛍光顕微鏡（Nikon, Tokyo, Japan）で観察した。BZ-X 蛍光顕微鏡（Keyence, Osaka, Japan）の z-stack 機能を用いてスライスビュー顕微鏡写真を撮影した。

3-2-11. AAV モデルラットの作製

Little らのプロトコール（Little et al., 2009）に従い、WKY ラット（4 週齢、雄性）に、0 日目にヒト由来 MPO（1600 μg/kg）を免疫し、0 日目と 2 日目に百日咳毒素（800 ng）を腹腔内注射した（グループ 1: オリジナルプロトコール, n=11）。他の AAV モデルラットにおいて PMA の投与が腎障害を悪化させることが示されており（Nakazawa et al., 2012）、モデルの腎障害を増悪させるために PMA を使用した。具体的には、ヒト MPO で免疫した WKY ラットに、さらに 7、14、21、28 および 35 日目に PMA（1 μg）を腹腔内注射した（グループ 2: 改変プロトコール, n＝12）。コントロールとして 6 匹のラットを用意し、非病原性 ANCA を誘発することが示されているリコンビナントヒト MPO 軽鎖で免疫するか（Nonokawa et al., 2019）、または免疫をせず、グループ 2 と同様の PMA 投与を行った（各 n＝3）。

3-2-12. AAV モデルラットにおける尿、血清学的及び組織学的評価

すべてのラットは 42 日目に安楽死させ、血液と組織のサンプリングを行った。0、14、28 日目に尾採血による経時的な血液サンプリングを実施した。尿検体は、40 日目に代謝ケージを用いて採取した。尿採取後に直ちに試験紙法（Siemens Healthineers, Erlangen, Germany）により尿潜血を評価した。血清は遠心分離により回収した。ANCA はフローサイトメトリー（flow cytometry: FCM）を用いて定量的に検出した。つまり、ヒト末梢血好中球を 4% PFA で固定し、透過洗浄バッファー（BioLegend, San Diego, CA, USA）を用いて好中球細胞膜を透過させた。細胞（1×10^6/ml）とラット血清（500 倍希釈）を室温で 30 分間反応させた。バッファーで洗浄後、細胞を 4 μg/ml の FITC 標識ウサギ抗ラット IgG 抗体と室温で 30 分間反応させた。バッファーで洗浄後、細胞を Attune Acoustic Focusing Cytometer（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いて FCM に供した。死亡時の血清 CRP および腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor: TNF)-α レベルは、それぞれ第一岸本臨床センターおよび ELISA キット（R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）で測定した。

全身臓器の FFPE 組織を約 4 μm の切片に薄切し、キシレンで脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン（hematoxylin and eosin: HE）染色を実施した。腎標本の最大割面における尿細管赤血球円柱をカウントした。

3-2-13. ラット血清中の抗 GBM 抗体の検出

96 ウェルプレートに、ラットと高い相同性を示すリコンビナントヒト α3(IV)NC1 を 2.5 μg/ml（50 μl/well）加えて一晩、4℃で固相した。PBS-T で 4 回洗浄後、1% スキムミルク含有 PBS-T（150 μl/well）を加えて室温で 1 時間静置した。ブロッキング液を除去した後、10 倍に希釈したラット血清（50 μl/well）をウェルに加え、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、10000 倍に希釈した HRP 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体（50 μl/well）を加えて室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、TMB をウェルに加えた。30 分後に 1M H_2SO_4

を加えて反応を停止させ、Multiskan FC を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

抗 GBM 抗体の IgG サブクラスを同定するために、20000 倍に希釈した HRP 標識抗ラット IgG1、IgG2a、IgG2b 抗体を二次抗体として使用した。

3-2-14. ラット FFPE 腎組織切片の IHC

正常ラットの FFPE 腎組織を約 4 μm に薄切し、シランコートされたスライドガラスに載せた。脱パラフィン後、クエン酸緩衝液に浸して 20 分間 95℃のウォーターバスで加熱するか、0.2 M HCl に浸して 105℃で 6 分間オートクレーブ処理した。これらの切片を α3(IV)NC1 に対する IHC に供した。AAV ラットの FFPE 腎組織切片を脱パラフィン後、α3(IV)NC1 および CD11c の検出の際にはクエン酸緩衝液に浸して、CD68 の検出の際には Tris-EDTA に浸して、20 分間 95℃のウォーターバスで加熱した。その後、組織中のペルオキシダーゼを不活化し、抗体の非特異結合をブロックした後、マウス抗 tumstatin, α3(IV)NC1 抗体（1 μg/ml)、ウサギ抗 CD11c 抗体（100 倍希釈）またはマウス抗 CD68 抗体（50 倍希釈）と室温で 1 時間反応させた。これらは抗ヒト抗体であるが、それぞれラットと交差反応することが確認されている。PBS で洗浄後、HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（100 倍希釈）または HRP 標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体（500 倍希釈）と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、切片の HRP 活性を DAB 基質で検出し、マイヤーのヘマトキシリン液で対比染色した。

3-2-15. 統計解析

パラメトリック群の比較には Student の *t*-検定を、ノンパラメトリック群の比較には Mann-Whitney の *U*-検定を用いた。$p<0.05$ を統計学的な有意とみなした。

3-3. 結果

3-3-1. FFPE 正常腎組織切片のプロテアーゼ処理による α3(IV)NC1 抗原の賦活化

初めに、抗 α3(IV)NC1 モノクローナル抗体を用いて、IHC における FFPE 正常腎組織切片からの α3(IV)NC1 の賦活化を検討した。この抗体は、α3(IV)NC1 領域の立体構造上の潜在部位に位置するアミノ酸配列（IPSTVKA）を認識する。抗 α3(IV)NC1 抗体は抗原賦活化を行わないとエピトープに結合しなかったが（Figure 13A)、酸性条件下（Figure 13B）で切片を加熱すると、GBM とボウマン嚢基底膜の血管極側に明瞭な陽性像が観察された。この線状の染色パターンは、抗 GBM 病患者の血清によって認識される GBM 抗原の特徴的な分布と一致した（Nishibata et al., 2019)。一方、中性条件下（Figure 13C）やアルカリ性条件下（Figure 13D）で切片を加熱しても、このような陽性像は認められなかった。興味深いことに、抗 α3(IV)NC1 抗体は、FFPE 正常腎組織切片を中性条件下で加熱後に *S. griseus* 由来のプロテアーゼ溶液にさらすと、GBM に結合した（Figure 13E)。これらの結果は、これまでの報告（Guan et al., 2008; Naito et al., 2003）と一致し、プロテアーゼが Col(IV)を消化することで、α3(IV)NC1 の潜在エピトープが表出することが確認された。

3-3-2. Col(IV)のプロテアーゼ分解による α3(IV)NC1 の表出

ホルマリンによるタンパク架橋の分解を目的としたプロテアーゼ処理は、IHC における一般的な抗原賦活法の 1 つである。*S. griseus* 由来のプロテアーゼが、FFPE 正常腎組織中のホルマリンによるタンパク架橋だけでなく Col(IV)自体も消化し、その結果として α3(IV)NC1 が表出するか、ELISA により検証した。Col(IV)を様々な濃度のプロテアーゼで消化し、α3(IV)NC1 を検出する ELISA で測定した結果、Col(IV)を適切な濃度（125 μg/ml）の *S. griseus* 由来のプロテアーゼで消化した場合に、α3(IV)NC1 が検出されることが分かった（Figure 13F)。*S. griseus* 由来のプロテアーゼは少なくとも 3 つのカゼイン分解活性と 1 つのアミノペプチダーゼ活性を有する。125 μg/ml 以上の濃度では α3(IV)NC1 自体が消化されてしまった可能性が高いと思われる。次に、*S. griseus* 由来の一般的なプロテアーゼの代わりに、好中球特異的なプロテアーゼである NE を用いて同様の検討を行った。Col(IV)を NE で消化した場合にも、500 μU/ml 以上の濃度において α3(IV)NC1 の表出が確認された（Figure 13G)。これらの結果から、NE を含むプロテアーゼが Col(IV)を消化し、α3(IV)NC1 を表出させることが確認された。

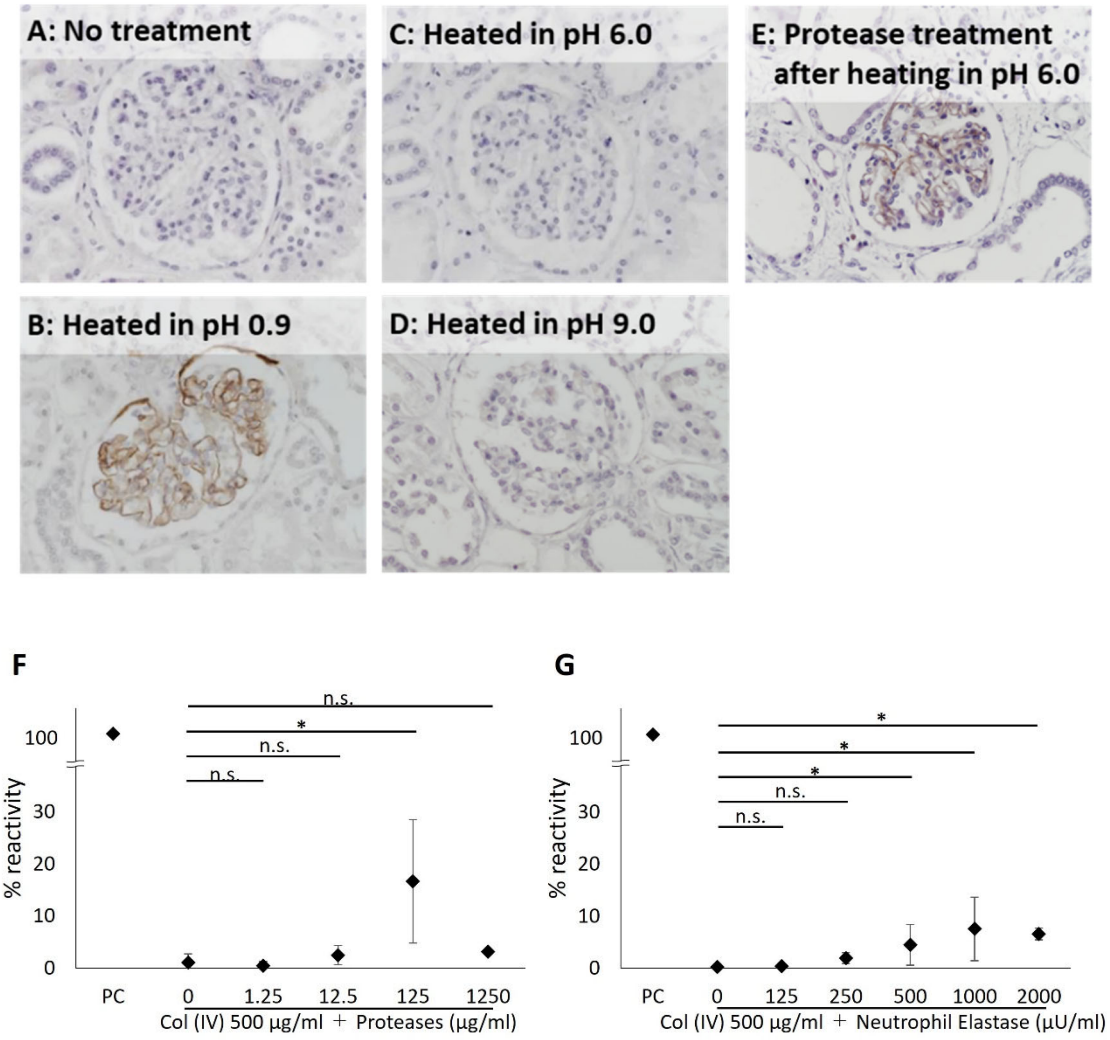

Figure 13. プロテアーゼ消化による α3(IV)NC1 の表出

FFPE 正常腎組織切片を、加熱なし（A)、酸性熱処理（B)、中性熱処理（C)、アルカリ性熱処理（D)、中性熱処理後プロテアーゼ消化（E）してから α3(IV)NC1 の IHC を実施した。一般的なプロテアーゼとして、*S. griseus* 由来のプロテアーゼを用いた。代表的な顕微鏡写真を示す。

Col(IV) 1 mg/ml を *S. griseus* 由来のプロテアーゼ（F）または NE（G）により 37℃で 30 分間消化した。その後、80℃で 15 分間加熱してプロテアーゼを失活させ試料とした。PC としてのリコンビナントヒト α3(IV)NC1 1.25 µg/ml を用い、α3(IV)NC1 検出用の ELISA を実施した。PC の吸光度を 100 とし、サンプルの相対値（反応率）を算出した。実験は独立して 3 回繰り返し、各実験は二重で行った。*p<0.05; n.s., not significant.

3-3-3.　FFPE 患者腎組織切片の GBM における抗 α3(IV)NC1 の反応性

AAV では、ANCA によって活性化された好中球由来の NE を含むプロテアーゼが、GBM の Col(IV)を消化すると仮説を立てた。この仮説を検証するために、抗 α3(IV)NC1 モノクローナル抗体が MPA 患者の FFPE 腎組織切片の GBM と反応するか IHC によって評価した。MPA の糸球体は、病変が乏しいものから全節性硬化まで多様な所見を呈することが特徴である。Figure 14A に示すように、アルカリ性で加熱しプロテアーゼで処理しない場合、つまり α3(IV)NC1 特異的な抗原賦活処理を行わない場合は、正常形態を保つ糸球体への抗体の結合は認められなかった。一方、MPA の半月体形成糸球体では、特に抗原賦活を行わなくても、GBM に対する抗 α3(IV)NC1 抗体の弱い結合が観察された（Figure 14B)。IgAN (Figure 14C）の活動性病変部でも、GBM に対する抗 α3(IV)NC1 抗体の弱い結合が観察された。さらに、MPA (Figure 14D)、IgAN (Figure 14E)、高血圧性動脈硬化症（Figure 14F) の硬化糸球体では、抗 α3(IV)NC1 抗体の明らかな結合が観察された。破壊され硬化した糸球体では、GBM の典型的な線状染色が不明瞭になっていたが、一次抗体のアイソタイプコントロールであるラット IgG2a では染色性がほとんど認められないことから、抗体結合の特異性が確認された（Figure 14B、D 挿入図)。これらの知見は、部分的には前述の仮説と一致しているが、破壊糸球体における α3(IV)NC1 の表出は、MPA だけでなく他の腎疾患でも認められることが明らかになった。

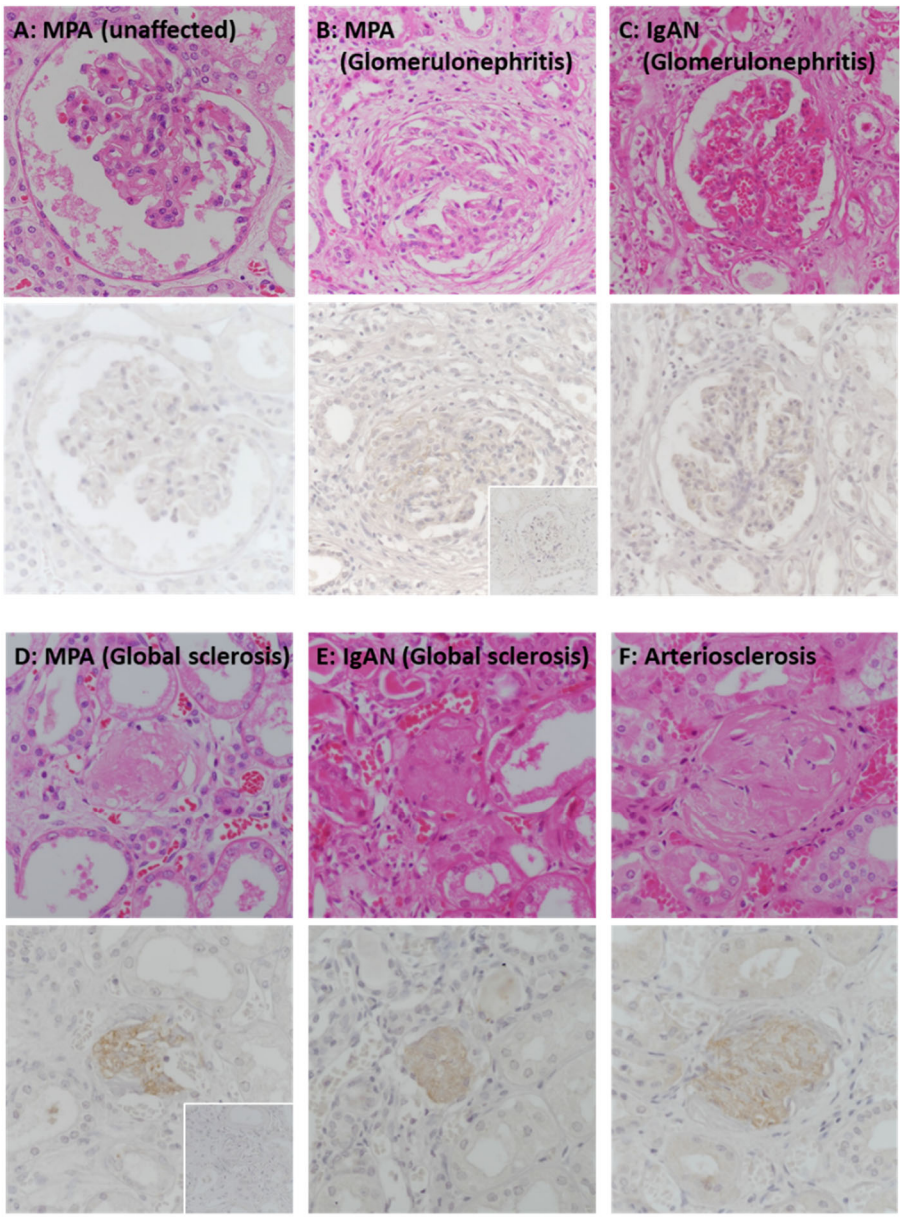

Figure 14. 患者腎組織における α3(IV)NC1 の表出

MPA（A、B、D）、IgAN（C、E）、高血圧性動脈硬化症（F）患者の FFPE 腎組織切片を用いた HE 染色と、抗原賦活処理を行わない α3(IV)NC1 の IHC。正常形態を保つ糸球体（A）、半月体形成糸球体（B）、ボウマン嚢との癒着を示す糸球体（C）、硬化糸球体（D-F）。代表的な顕微鏡写真を示す。B および D の挿入図は、アイソタイプコントロールとしてラット IgG2a を使用した場合の染色を示す。

3-3-4.　CD11c 陽性マクロファージの分布

破壊された糸球体における α3(IV)NC1 の表出は AAV に限定的ではなかったが、抗 GBM 抗体の二次的な産生は AAV 以外の疾患ではほとんど生じない。そこで、次に抗原提示細胞（antigen-presenting cells: APCs）に着目した。組織浸潤性 CD11c 陽性マクロファージが抗原提示に関与していることが報告されている（Wlodarczyk et al., 2014)。IF 染色により、MPA の糸球体、ボウマン嚢、尿細管に細胞表面 CD11c 陽性および細胞質 CD68 陽性マクロファージの存在が確認された（Figure 15A)。IgAN や高血圧性動脈硬化症患者の腎組織には、疾患の活動状態を示す CD68 陽性マクロファージが一定量存在するが（Figure 15B-D)、これらの疾患の腎組織では CD11c 陽性マクロファージの浸潤は明らかではなかった (Figure 15B, C, E)。

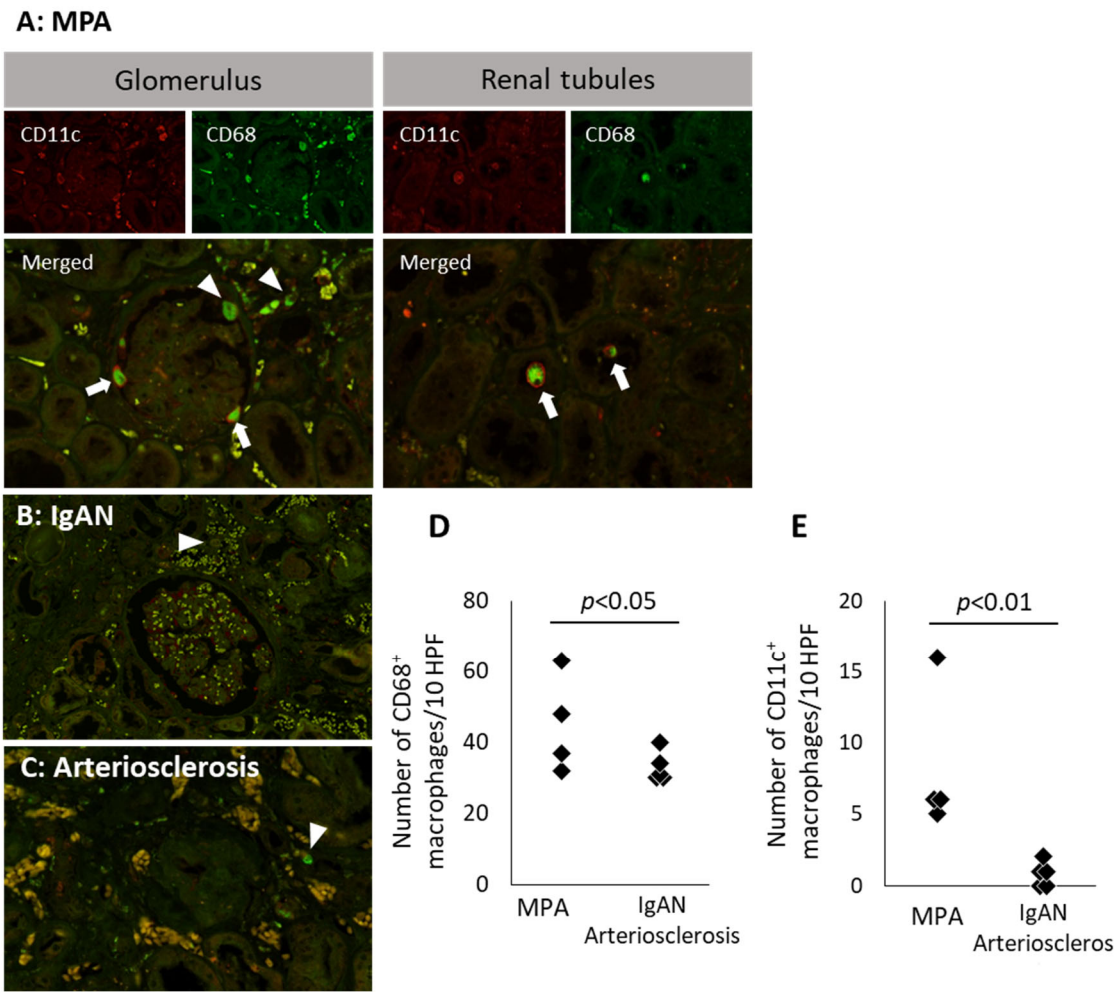

Figure 15. CD11c 陽性マクロファージの腎臓への浸潤

MPA (A)、IgAN (B)、高血圧性動脈硬化症（C）患者の FFPE 腎切片を用いた CD11c (赤) および CD68 (緑）の IF 染色。矢印：細胞表面 CD11c 陽性かつ細胞質内 CD68 陽性のマクロファージ、矢頭：CD68 陽性マクロファージ。代表的な顕微鏡写真を示す。

糸球体を中心とした高倍率視野（10 視野）における CD68 陽性マクロファージ（D）および CD11c 陽性マクロファージ（E）の数をカウントし、MPA と非 MPA (IgAN および高血圧性動脈硬化症）の間で比較した。

3-3-5.　CD11c 陽性マクロファージの α3(IV)NC1 への近接

CD11c 陽性マクロファージと α3(IV)NC1 との関係を検討した。IF 染色により、MPA (Figure 16A) では CD11c 陽性マクロファージが病変糸球体に浸潤しているが、IgAN (Figure 16B) および高血圧性動脈硬化症 (Figure 16C) の糸球体には浸潤していないことが確認された。さらに、MPA の糸球体に浸潤した CD11c 陽性マクロファージの一部は、α3(IV)NC1 を細胞質に取り込んでいることが z-stack のスライス像から確認された (Figure 16D)。

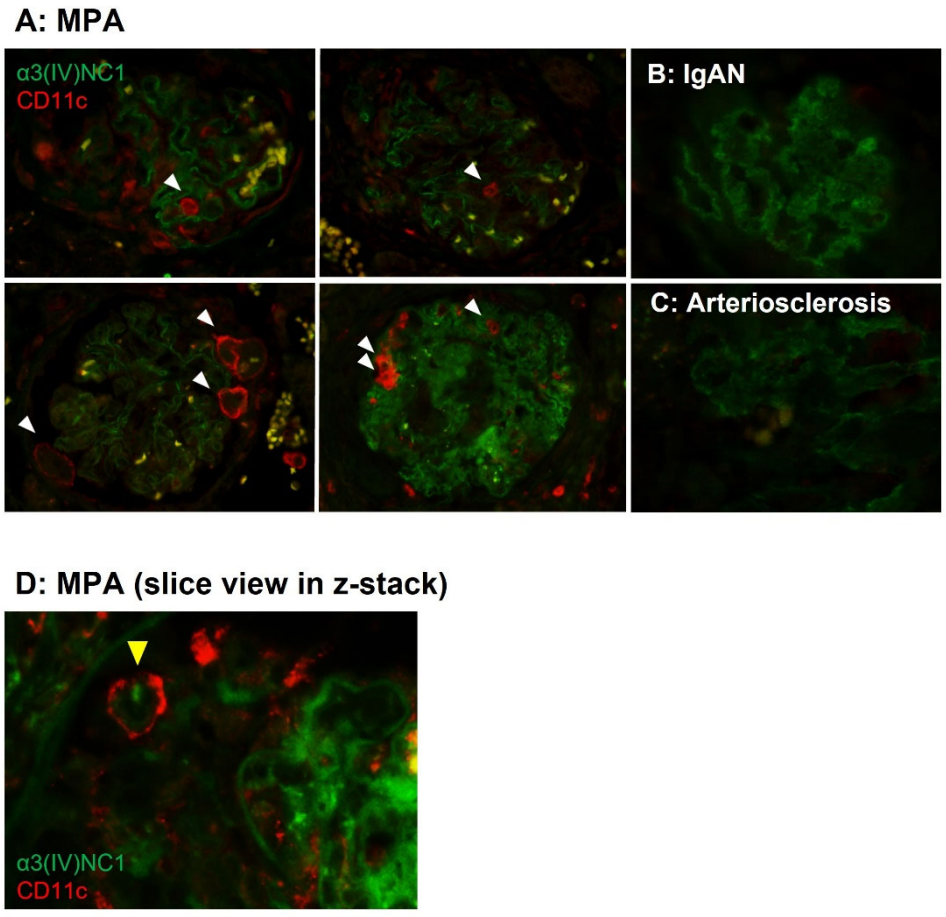

Figure 16. CD11c 陽性マクロファージの α3(IV)NC1 への近接

MPA (A, D)、IgAN (B)、高血圧性動脈硬化症 (C) 患者の FFPE 腎組織切片を用いた CD11c (赤) および α3(IV)NC1 (緑) の IF 染色。白矢頭：CD11c 陽性マクロファージ (A)。代表的な顕微鏡写真を示す。z-stack での代表的なスライス画像 (D)。黄矢頭：α3(IV)NC1 を細胞質内に取り込む CD11c 陽性マクロファージ。

3-3-6.　AAV モデルラットにおける腎組織障害の増悪

ヒト由来 MPO で免疫した WKY ラットは AAV の優れたモデルとなるが（Little et al., 2009)、ヒトの典型的な MPA と比較すると腎障害は軽度である。このモデルにおいて腎障害を悪化させるため、PMA 投与が薬剤誘発 AAV モデルラットの腎障害を悪化させることを示した先行研究（Nakazawa et al., 2012）を参考にして、PMA を用いた改変プロトコールを採用した。WKY ラット（n＝23）に、オリジナルプロトコール（Little et al., 2009）に従ってヒト MPO を免疫し、その後 2 つのグループ、すなわち、PMA 投与なしのグループ 1（オリジナルプロトコール, n＝11）および PMA 投与を加えるグループ 2（改変プロトコール, n＝12）に分けた。グループ 2 のラットには、7、14、21、28、35 日目に PMA（1 μg）の腹腔内注射を行った。

グループ 1 および 2 のすべてのラットは ANCA を産生し、その力価は両群間で同等であった（Figure 17A, B)。重度の尿潜血が両群で検出されたが（Figure 17C, 左)、CRP はグループ 2 の方がグループ 1 より有意に高かった（Figure 17C, 中央)。さらに、このモデルの病態形成に強く関与している TNF-α の血清レベルも（Shochet et al., 2020)、グループ 1 に比べグループ 2 で上昇していた（Figure 17C, 右, p=0.0689)。これに対応して、腎最大割面の尿細管赤血球円柱数で表される腎組織障害の程度もグループ 2 がグループ 1 より高かった（Figure 17D, p＝0.0634)。尿細管赤血球円柱の上流側の尿細管への好中球の浸潤が観察された（Figure 17E, 挿入図)。両群とも明らかな半月体形成性糸球体腎炎は発症しなかったが、これらの所見を総合すると、AAV ラットモデルにおいて PMA により腎臓の尿細管障害が増悪していることが示唆された。

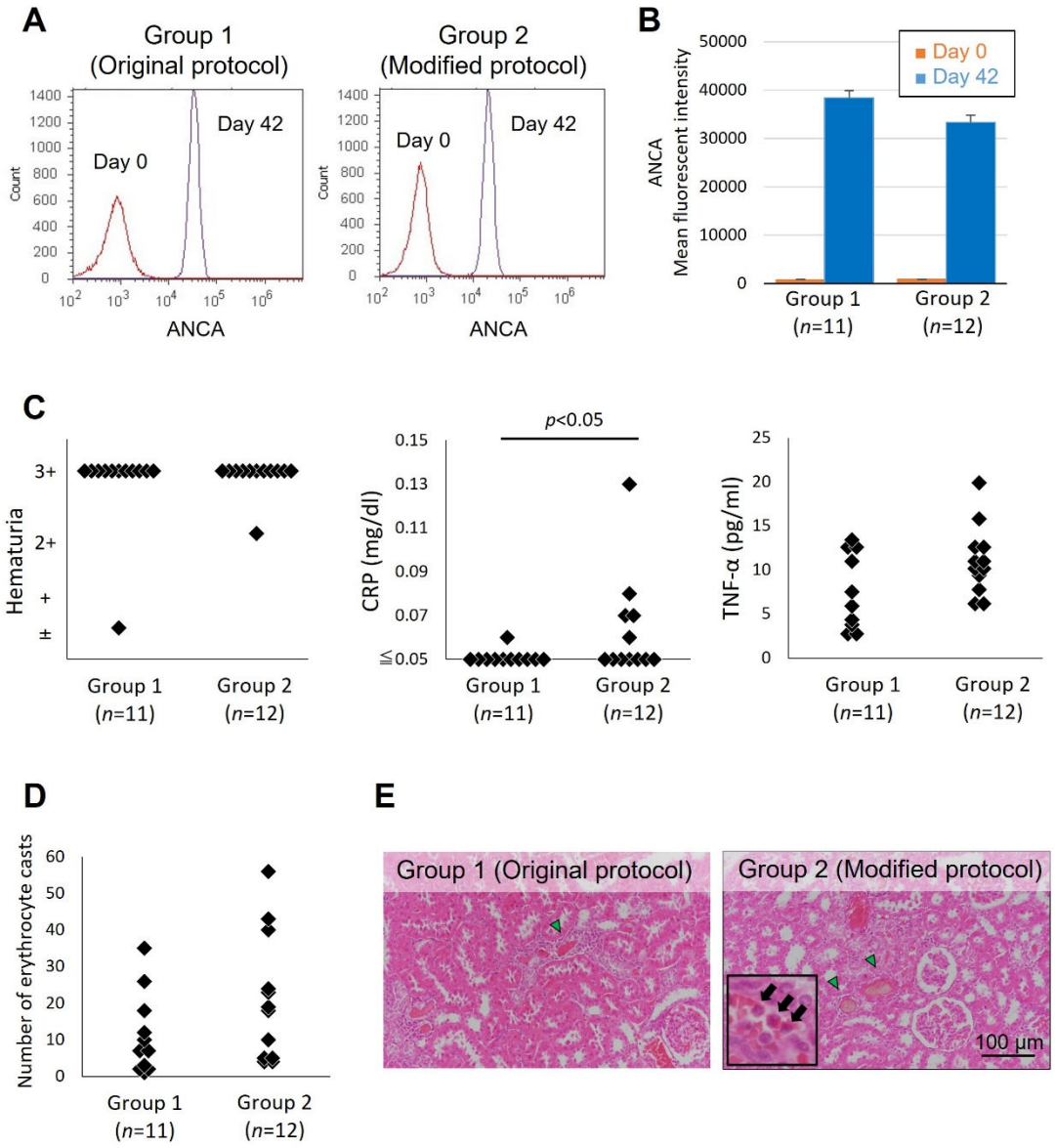

Figure 17. AAV 誘導ラット

WKY ラット（n=23）にヒト MPO を免疫した後、PMA を投与しないグループ 1（オリジナルプロトコール, n=11）と PMA を投与するグループ 2（改変プロトコール, n=12）の 2 群に分けた。グループ 2 のラットには、7、14、21、28、35 日目に PMA（1 μg）を腹腔内注射した。FCM による ANCA 検出（A, B）。尿潜血、CRP と TNF-α の血清レベルの比較（C）。腎組織標本の最大割面における尿細管赤血球円柱の数の比較（D）。尿細管赤血球円柱に代表される腎障害を示す HE 染色像（緑矢頭；E）。挿入図の矢印は、尿細管赤血球円柱の上流側の尿細管に浸潤した好中球。代表的な顕微鏡写真を示す。

3-3-7.　腎障害増悪 AAV モデルラットにおける抗 GBM 抗体の産生

AAV モデルにおける抗 GBM 抗体の産生を調べるために、0 日目と 42 日目の血清サンプルを ELISA に供した（Figure 18A）。0 日目の血清の全てに抗 GBM 抗体は検出されなかった（n=23)。42 日目の血清については、グループ 1 のラットおよび MPO の免疫なしに PMA を腹腔内注射したラット（データ非提示）ではいずれも抗 GBM 抗体を産生しなかったが、グループ 2 の 2 匹のラット（#6 および#9）は抗 GBM 抗体を産生した。興味深いことに、自己抗体産生の経時的な解析により、これらのラットでは ANCA の産生に遅れて抗 GBM 抗体が産生されていることが明らかになった（Figure 18B)。また、グループ 2 の AAV ラットで産生された抗 GBM 抗体のサブクラスは、病原性サブクラス（Zhao, Yan, et al., 2009）の一つである IgG2a であることが判明した（Figure 18C)。

AAV ラットでは、糸球体ではなく間質性尿細管障害が PMA 投与により増悪していた。ヒトとは異なりラットでは、α3(IV)NC1 を含む Col(IV)は糸球体だけでなく尿細管の基底膜にも分布していた（Figure 18D)。この結果は、Col(IV)の α3 サブユニットがラットの尿細管基底膜に分布していることを示した既報（Sugihara et al., 1996）と一致する。IHC により、抗 GBM 抗体を産生したグループ 2 のラットの腎間質組織の障害部位ではα3(IV)NC1 が表出し、その周辺への CD11c 陽性マクロファージの浸潤を認めたが、抗 GBM 抗体を産生しないグループ 1 および 2 のラットには、α3(IV)NC1 の表出、CD11c 陽性マクロファージの浸潤、いずれも認められなかった（Figure 18E)。

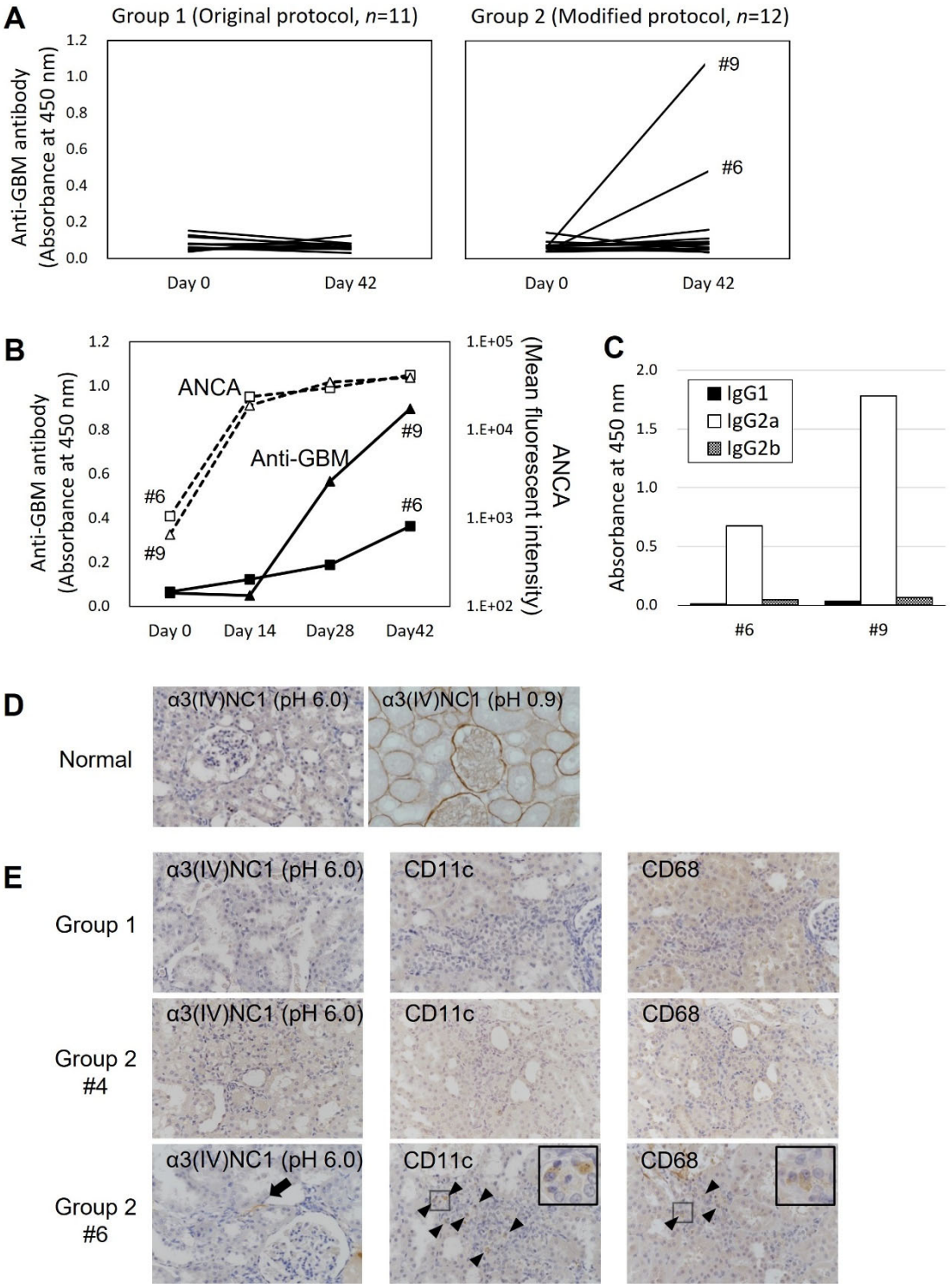

Figure 18. AAV モデルラットにおける抗 GBM 抗体の産生

血清中の抗 GBM 抗体を ELISA で測定した（A）。0 日目のすべての血清で、抗 GBM 抗体は検出されなかった。42 日目では、グループ 1 では抗 GBM 抗体を産生するラットはいな

かったが、グループ 2 では 2 匹（#6, #9）が抗 GBM 抗体を産生した。グループ 2 の#6 と #9 のラットにおける ANCA 力価と抗 GBM 抗体価の経時的な推移（B)。ANCA の力価は FCM の平均蛍光強度として表示した。抗 GBM 抗体の IgG サブクラスは ELISA で測定した（C)。正常ラット腎組織切片における α3(IV)NC1 の分布（D)。正常ラットの FFPE 腎組織切片を pH 6.0（左）または pH 0.9（右）で加熱し、α3(IV)NC1 の IHC に供した。抗 GBM 抗体を産生したグループ 2 のラット腎臓（#6）では α3(IV)NC1 の表出（黒矢印）と CD11c 陽性かつ CD68 陽性細胞の浸潤（黒矢頭）が認められたが、グループ 1 のラットおよび抗 GBM 抗体を産生しないグループ 2 のラット（#4）の腎臓では、それらのいずれも認められなかった（E)。代表的な顕微鏡写真を示す。

3-4. 考察

抗 GBM 病は、抗 GBM 抗体が病原となってびまん性半月体形成性壊死性糸球体腎炎および肺出血をきたす臓器特異的自己免疫疾患である（McAdoo et al., 2017)。通常、腎生検の凍結切片を用いた IF により、GBM に沿った線状の IgG 沈着が検出され、本疾患を診断する上での重要な所見となっている。しかし、患者血清中の抗 GBM 抗体は FFPE 正常腎組織切片の GBM には結合できない。これは、α3(IV)NC1 に存在する抗 GBM 抗体の主要エピトープが立体構造上、潜在状態にあるためである（Naito et al., 2003; Pedchenko et al., 2010; Vanacore et al., 2011)。抗ペルオキシダシン抗体が、3-4-5α-サブユニット三量体の NC1 ドメインのスルフィルイミン結合のミスフォールディングに寄与することが示唆されているが（McCall et al., 2018)、抗 GBM 病患者における潜在抗原の表出メカニズムは未だ不明である。

抗GBM病と AAV は密接に関与しているという臨床的な知見に基づき（Hara et al., 1986; Olson et al., 2011)、ANCA によって活性化された好中球から放出されるプロテアーゼが Col(IV)を消化し、その結果として GBM の潜在抗原を表出させると仮説を立てた。実際、活性化好中球から放出されるマトリックスメタロプロテアーゼ-9（matrix metalloproteinase-9: MMP-9）による Col(IV)の消化（Carmona-Rivera et al., 2015）によって、潜在状態にある α3(IV)NC1 が表出することが報告されている（Hamano et al., 2003）。今回、MMP-9 と同様に NE による Col(IV)の消化で α3(IV)NC1 が表出したこと、原因疾患によらず破壊された糸球体において α3(IV)NC1 の表出が認められるが、CD11c 陽性マクロファージの浸潤を伴うのは MPA（AAV）に特徴的であること、一部の AAV モデルでは ANCA に遅れて抗 GBM 抗体が産生されたことを提示した。

ELISA では、Col(IV)から α3(IV)NC1 を表出するために、500 μU/ml 以上の濃度の NE が必要であった。この濃度はかなり高いが、ANCA で活性化された好中球から放出された NE は、糸球体の微小環境で GBM を消化することを考慮すると、必ずしも非現実的ではない。また、α3(IV)NC1 の検出量は極めて低かった。NE は、3-4-5α サブユニット NC1 六量体のスルフィルイミン結合付近を切断し、その結果 α3(IV)NC1 が表出すると推定している。そのため、スルフィルイミン結合そのものが切断される場合と比較して、α3(IV)NC1 の表出は不完全となっている可能性がある。NE 消化後の Col(IV)を試料とする ELISA において抗体の反応性が低かったのはこうした原因が考えられた。

α3(IV)NC1 の表出は、IgAN や高血圧性動脈硬化症など原因疾患によらず、破壊糸球体で観察された。IgAN では MMP-9 がメサンギウム病変の形成に関与すること（Danilewicz & Wagrowska-Danilewicz, 2010)、高血圧性腎症の発症にはマスト細胞由来のトリプターゼやキマーゼが関与すること（Welker et al., 2008）などが明らかにされている。AAV における ANCA によって活性化した好中球由来のプロテアーゼと同様に、硬化に至るまでの間に糸球体が破壊されることによって生じる α3(IV)NC1 の表出にこれらのプロテアーゼが寄

与している可能性がある。

一方、本研究では、破壊糸球体に表出される α3(IV)NC1 の近傍に CD11c 陽性マクロファージの浸潤を認めることが MPA（AAV）の特徴であることを示した。加えて、MPA の病変部に浸潤した CD11c 陽性マクロファージの一部は、細胞質に α3(IV)NC1 を取り込んでいることが確認された。この所見は、マクロファージによる破壊された GBM のクリアランスを反映していると考えられるが、Wlodarczyk らは、組織浸潤 CD11c 陽性マクロファージが APC として機能することを証明している（Wlodarczyk et al., 2014）。本研究は抗 GBM 抗体産生に至る経路を完全には解明していないが、α3(IV)NC1 を取り込んだ CD11c 陽性マクロファージが所属リンパ節に流れ込み、主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex: MHC）クラス II に GBM エピトープを提示し、続く免疫反応をヘルパーT 細胞が制御すると推測される。そのメカニズムの解明については今後の重要な課題である。さらに、CD11c 陽性以外の表現型を持つマクロファージが GBM 抗原提示に寄与しているかどうかの検討も今後の課題として残されている。

Ootaka らは、IgAN のサブタイプによっては糸球体病変部に CD11c 陽性細胞の浸潤が観察されることを報告している（Ootaka et al., 1997）。IgAN による糸球体破壊により表出した α3(IV)NC1 を APC が抗原提示すれば、AAV と同様に抗 GBM 抗体が産生されると推測される。実際、IgAN の経過中に抗 GBM 病を発症した患者が報告されている（Kojima et al., 2019）。

本研究では PR3-ANCA 陽性の AAV 患者が含まれておらず、また、採用したラットモデルは MPO-AAV 誘導モデルであったために、抗 GBM 抗体産生に ANCA の抗原特異性の違いが関与するかどうかは判断できなかった。しかしながら既報では、MPO-ANCA のみならず PR3-ANCA でも、抗 GBM 抗体との二重陽性を示す場合があることが報告されており（McAdoo et al., 2017）、ANCA 特異性は抗 GBM 抗体産生に無関係であると考えられる。

大変興味深いことに、PMA を追加投与する改変プロトコールで作製した AAV モデルラットの一部で抗 GBM 抗体が産生された。PMA 投与は AAV モデルラットの腎尿細管破壊を悪化させた。ヒト由来 MPO の代わりにリコンビナントヒト MPO 軽鎖を免疫原として用いた場合、好中球を用いた FCM で ANCA は検出されず（Nonokawa et al., 2019）、PMA 投与にかかわらず腎組織破壊は少なかった（非提示データ）。また、非病原性リコンビナントヒト MPO 軽鎖を免疫した後に PMA を投与したラットでは、血清 CRP は有意に上昇しなかった。これらのことから、好中球の MPO と結合できる ANCA の産生がなければ、PMA 自体が血清 CRP を上昇させて腎組織破壊を誘発することはないと考えられ、グループ 2 のラットにおける CRP の上昇は腎間質性炎症が反映されていると考えられた。PMA は cyclic AMP の活性化物質であり、好中球のプライミングを誘導し（Shida et al., 2016）、ANCA を介した好中球の活性化を促進し、活性化好中球を介した炎症と腎組織破壊の増悪に寄与すると考えられる。これに対応するように、実際、TNF-α の血清レベルはグループ 1 よりもグループ 2 のラットで高かった。α3(IV)NC1 を含む Col(IV)は、ラットの尿細管基底膜に

分布していることから、障害を受けた尿細管間質に α3(IV)NC1 が表出するのは妥当であると考えられる。

これらの知見から、AAV では ANCA によって活性化された好中球から放出されるプロテアーゼが Col(IV)を消化して α3(IV)NC1 を表出し、AAV 特異的 CD11c 陽性マクロファージが表出したエピトープを捕捉して抗原を提示し、最終的に免疫システムが抗 GBM 抗体を産生すると考えられた（Figure 19）。これは、分子間エピトープ拡散（intermolecular epitope spreading）の概念に相当するものである。

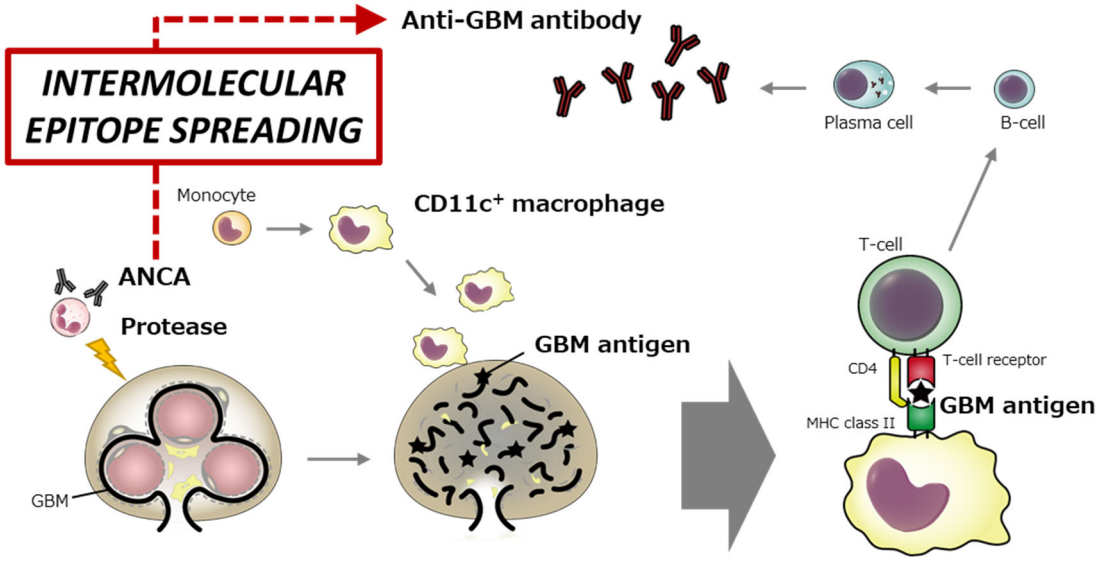

Figure 19. AAV による抗 GBM 抗体産生メカニズムの模式図

AAV では、ANCA によって活性化された好中球から放出されるプロテアーゼが Col(IV)を消化して α3(IV)NC1 が表出し、AAV 特異的 CD11c 陽性マクロファージが GBM エピトープを捕捉して抗原提示し、最終的に免疫系が抗 GBM 抗体を産生する。これは分子間エピトープ拡散 intermolecular epitope spreading の概念に相当する。

エピトープ拡散 epitope spreading は、多発性硬化症（multiple sclerosis: MS）のマウスモデルで初めて報告された（Lehmann et al., 1992)。この現象は、あるエピトープに対する一次免疫応答による組織破壊、APC による組織断片の貪食、そして新しいエピトープに対する二次免疫応答の誘導という段階を経て起こる（Vanderlugt & Miller, 2002)。エピトープの拡散は、単一の抗原内で起こるものと、複数の抗原間で起こるものがあり、前者を分子内エピトープ拡散 intramolecular epitope spreading、後者を分子間エピトープ拡散 intermolecular epitope spreading と呼ぶ。分子内エピトープ拡散は、MS に認められるような段階的な病気の進行と関連している。一方、分子間エピトープ拡散は、病気の移行や合併症に関係する。例えば、尋常性天疱瘡から落葉状天疱瘡への移行（Kawana et al., 1994）や橋本甲状腺炎とバセドウ病の合併（McLachlan et al., 2007）などで分子間エピトープ拡散の関与が論じられている。筆者の知る限り、本研究は AAV における抗 GBM 抗体産生に分子間エピトープ拡散が関与していることを初めて示唆した報告である。

腎臓において α3(IV)NC1 の表出と CD11c 陽性マクロファージが密接に関係するにもかかわらず、すべての AAV 患者が抗 GBM 抗体を産生するわけではない。AAV 患者における抗 GBM 抗体産生のメカニズムには、他の要因（例えば MHC ハプロタイプなどの遺伝的背景）が関与している可能性がある。一方、近交系 WKY ラットで誘導した AAV では、抗 GBM 抗体産生ラットにおいてのみ、障害腎組織における α3(IV)NC1 の表出が検出されたことから、腎組織破壊の重症度が抗 GBM 抗体産生に深く関与している可能性が考えられた。

IgG サブクラスは、抗 GBM 病の重症度と関連することが報告されている（Zhao, Yan, et al., 2009)。AAV ラットの抗 GBM 抗体サブクラスを ELISA で調べたところ、病原性サブクラスの 1 つである IgG2a であった。しかし、AAV モデルラットにおいて ANCA に続いて産生される抗 GBM 抗体の病原性については、今後の研究で明らかにする必要がある。

検討した患者数が少ないこと、AAV モデルラットでの抗 GBM 抗体産生の頻度が低いことが本研究の限界である。前者について、高血圧性動脈硬化症の進行には活動性の炎症はあまり関与しないが、IgAN では IgA 免疫複合体を介した補体活性化により活動性の炎症が誘導される。本研究で検討した IgAN 患者の病態は、急性活動期というよりは、慢性進行期の状態であった可能性がある。CD11c 陽性マクロファージの GBM 近傍への浸潤が真に AAV に特異的であるかを明らかにするためには、活動期の IgAN や半月体形成性糸球体腎炎を伴う他の腎疾患を含む、より多数の症例を用いて検証する必要がある。後者については、原則的に遺伝的背景が均質な動物を用いた実験では同様の結果が得られると考えられる。今回の検討においても、MPO 免疫後の MPO-ANCA 産生や AAV の発症は、グループ 1、2 とも同様であった。一方で、グループ 2（n=12）では、抗 GBM 抗体を産生したラットは 2 匹のみであった。このモデルにおける抗 GBM 抗体産生は、AAV による組織障害の部位と程度、α3(IV)NC1 の表出量、病変部への APC の浸潤などの複数の要因に起因していると推測される。抗 GBM 抗体産生の多様性は、抗体産生に至るまでの多くのステップに起因して

いる可能性があるため、今後、より大規模な研究によって検証する必要があると考える。

抗 GBM 病の合併は、AAV の予後不良につながることが明らかになっている（McAdoo et al., 2017)。実際、AAV 患者における肺出血発症者の割合について、抗 GBM 抗体陰性患者では 23%なのに対し、抗 GBM 抗体陽性患者では 38%に上昇する。AAV の予後不良につながる抗 GBM 抗体産生のメカニズムの一端が明らかになったことは、AAV の予後悪化を食い止める一つの戦略開発の足掛かりとなる。

3-5. 結論

本研究により、以下のことが明らかとなった。

- NE を含むプロテアーゼにより Col(IV)が消化されることでα3(IV)NC1 が表出することを IHC と ELISA で示した。
- 疾患によらず破壊糸球体においてα3(IV)NC1 の表出が認められるものの、表出したα3(IV)NC1 に近接する CD11c 陽性マクロファージの浸潤は MPA (AAV)に特徴的であった。
- 既報のプロトコールを改変することで腎障害を増悪させた MPO-AAV モデルの一部の個体において、ANCA に続き抗 GBM 抗体が産生された。

これらの知見により、AAV における抗 GBM 抗体産生に分子間エピトープ拡散 intermolecular epitope spreading が関与することが示唆された。

総括

第 1 章では、IIF の ANCA 検出基板における好中球固定法の違いによる抗原性の経時的変化について検討した。いずれの固定法でも 2 か月間の保存により細胞数や抗原分布に変化は見られなかったが、抗原性には固定法依存的な経時的減衰が認められ、目視による抗体価判定に影響を及ぼす恐れが示唆された。

第 2 章では、治療抵抗性を示した抗 GBM 病患者血清中の抗 GBM 抗体が認識するエピトープについて解析を行った。再燃を繰り返す患者血清中に存在する抗 GBM 抗体が認識するエピトープは単回発症患者とは異なっており、エピトープの違いが抗 GBM 病の臨床経過の違いに反映されている可能性が示唆された。

第 3 章では、AAV において ANCA に続き抗 GBM 抗体が産生されるメカニズムに関する検討を行った。ANCA によって活性化された好中球から放出されるプロテアーゼが Col(IV) を消化して α3(IV)NC1 が表出し、AAV 特異的 CD11c 陽性マクロファージが GBM エピトープを捕捉して抗原提示し、免疫系が抗 GBM 抗体を産生する。ANCA に続く抗 GBM 抗体産生には、分子間エピトープ拡散 intermolecular epitope spreading の関与が示唆された。

ANCA や抗 GBM 抗体などの病原性自己抗体が認識する抗原の変化は、抗体価の測定結果や自己免疫病態へ影響を与える。自己免疫疾患の病態理解に自己抗体の評価は欠かせないが、抗体が認識する抗原の状態についても併せて評価することが重要である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の機会を与えてくださり、終始丁寧なご指導とご助言をいただいた北海道大学 大学院保健科学研究院 病態解析学分野 石津明洋教授と様々な面でサポートいただきました益田紗季子講師に厚く御礼申し上げます。

貴重な症例の検体や病理標本をご提供いただき、また、有益なご討論やご助言をいただきました大学院医学研究院免疫・代謝内科学教室中沢大悟助教と北海道大学病院 病理部/病理診断科 外丸詩野准教授に深く感謝いたします。非常に貴重な症例の検体をご提供いただき、抗 GBM 病に関する研究を始めるきっかけを作ってくださった杏林大学 医学部 腎臓・リウマチ膠原病内科 中林公正名誉教授に厚く御礼申し上げます。好中球基板に関する研究にご協力いただいた株式会社医学生物学研究所の皆様に感謝いたします。

検体を使用させていただいた患者の皆様、血液をご提供くださったボランティアの方々に御礼申し上げます。

実験の一部を一緒に遂行してくれた医学部保健学科の植松さんと東さん、日々の実験を遂行するにあたりサポートしてくれた病理・免疫検査学研究室のメンバーに心より感謝申し上げます。

文献

Billing, P., Tahir, S., Calfin, B., Gagne, G., Cobb, L., Targan, S., & Vidrich, A. (1995). Nuclear localization of the antigen detected by ulcerative colitis- associated perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies. *American Journal of Pathology*, *147*(4), 979–987.

Borza, D. B., Chedid, M. F., Colon, S., Lager, D. J., Leung, N., & Fervenza, F. C. (2005). Recurrent Goodpasture's disease secondary to a monoclonal IgA1-κ antibody autoreactive with the $\alpha 1/\alpha 2$ chains of type IV collagen. *American Journal of Kidney Diseases*, *45*(2), 397–406. https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.09.029

Bossuyt, X., Cohen Tervaert, J. W., Arimura, Y., Blockmans, D., Flores-Suáez, L. F., Guillevin, L., Hellmich, B., Jayne, D., Jennette, J. C., Kallenberg, C. G. M., Moiseev, S., Novikov, P., Radice, A., Anne Savige, J., Alberto Sinico, R., Specks, U., van Paassen, P., Zhao, M. H., Rasmussen, N., Damoiseaux, J., & Csernok, E. (2017). Revised 2017 international consensus on testing of ANCAs in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. *Nature Reviews Rheumatology 2017 13:11*, *13*(11), 683–692. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.140

Carmona-Rivera, C., Zhao, W., Yalavarthi, S., & Kaplan, M. J. (2015). Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *74*(7), 1417–1424. https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2013-204837

Chan, P. S. J., & Leung, M. H. (2016). Sequential occurrence of anti-glomerular basement membrane disease 9 years after anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Oxford Medical Case Reports*, *2016*(4), 91–93. https://doi.org/10.1093/OMCR/OMW026

Craig, S. B., Graham, G. C., Burns, M.-A., Dohnt, M. F., Wilson, R. J., Smythe, L. D., Jansen, C. C., & Mckay, D. B. (2013). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology Leptospirosis and Goodpasture's syndrome: testing the aetiological hypothesis*. https://doi.org/10.1179/000349809X12459740922336

Cui, Z., Zhao, J., Jia, X. Y., Zhu, S. N., Jin, Q. Z., Cheng, X. Y., & Zhao, M. H. (2011). Anti-glomerular basement membrane disease: Outcomes of different therapeutic regimens in a large single-center chinese cohort study. *Medicine*, *90*(5), 303–311. https://doi.org/10.1097/MD.0B013E31822F6F68

Danilewicz, M., & Wagrowska-Danilewicz, M. (2010). Differential glomerular immunoexpression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in idiopathic IgA nephropathy and Schoenlein-Henoch nephritis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*,

48(1), 63–67. https://doi.org/10.2478/V10042-008-0086-4

Davies, D. J., Moran, J. E., Niall, J. F., & Ryan, G. B. (1982). Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: Possible arbovirus aetiology? *British Medical Journal*, *285*(6342), 606. https://doi.org/10.1136/BMJ.285.6342.606

Emoto, K., Yamashita, S., & Okada, Y. (2005). Mechanisms of Heat-induced Antigen Retrieval: Does pH or Ionic Strength of the Solution Play a Role for Refolding Antigens? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *53*(11), 1311–1321. https://doi.org/10.1369/jhc.5C6627.2005

Felicetti, M., Treppo, E., Posarelli, C., Ferro, F., Bond, M., Monti, S., Elefante, E., Trentin, F., Delvino, P., Talarico, R., Baldini, C., & Quartuccio, L. (2020). One year in review 2020: vasculitis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, *38*(2), 3–14.

Goodpasture, E. W. (1919). The significance of certain pulmonary lesions in relation to the etiology of influenza. *The American Journal of The Medical Sciences*, *158*(6), 863–870. https://doi.org/10.1097/00000441-191911000-00012

Guan, N., Yu, L. X., Wu, G. H., Xing, Y., & Ding, J. (2008). Antigen retrieval with protease digestion applied in immunohistochemical diagnosis of Alport syndrome. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, *23*(11), 3509–3513. https://doi.org/10.1093/ NDT/GFN305

Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J. C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R. O., Werb, Z., Sudhakar, A., & Kalluri, R. (2003). Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV $\alpha 3$ chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via $\alpha V\beta 3$ integrin. *Cancer Cell*, *3*(6), 589. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00133-8

Hara, M., Mase, D., Inaba, S., Higuchi, A., Tanizawa, T., Yamanaka, N., Sugisaki, Y., Sado, Y., & Okada, T. (1986). Immunohistochemical localization of glomerular basement membrane antigens in various renal diseases. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology*, *408*(4), 403–419. https://doi.org/10.1007/BF00707698

Hauschild, S., Schmitt, W. H., Csernok, E., Flesch, B. K., Rautmann, A., & Gross, W. L. (1993). ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular diseases, rheumatic disorders and inflammatory bowel diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *336*, 245–251. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9182-2_36

Hellmark, T., Johansson, C., & Wieslander, J. (1994). Characterization of anti-GBM antibodies involved in Goodpasture's syndrome. *Kidney International*, *46*(3), 823–829. https://doi.org/10.1038/ki.1994.338

Hirayama, K., Yamagata, K., Kobayashi, M., & Koyama, A. (2008). Anti-glomerular basement

membrane antibody disease in Japan: Part of the nationwide rapidly progressive glomerulonephritis survey in Japan. *Clinical and Experimental Nephrology*, *12*(5), 339–347. https://doi.org/10.1007/S10157-008-0051-8/FIGURES/4

Hu, S. Y., Gu, Q. H., Wang, J., Wang, M., Jia, X. Y., Cui, Z., & Zhao, M. H. (2017). The pathogenicity of T cell epitopes on human Goodpasture antigen and its critical amino acid motif. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *21*(9), 2117–2128. https://doi.org/10.1111/JCMM.13134

Jennette, J. C., & Falk, R. J. (2014). Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nature Reviews Rheumatology*, *10*(8), 463–473. https://doi.org/10.1038/NRRHEUM.2014.103

Jennette, J. C., Falk, R. J., Bacon, P. A., Basu, N., Cid, M. C., Ferrario, F., Flores-Suarez, L. F., Gross, W. L., Guillevin, L., Hagen, E. C., Hoffman, G. S., Jayne, D. R., Kallenberg, C. G. M., Lamprecht, P., Langford, C. A., Luqmani, R. A., Mahr, A. D., Matteson, E. L., Merkel, P. A., … Watts, R. A. (2013). 2012 Revised International Chapel Hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis and Rheumatism*, *65*(1), 1–11. https://doi.org/10.1002/ART.37715

Kain, R., & Rees, A. J. (2013). What is the evidence for antibodies to LAMP-2 in the pathogenesis of ANCA associated small vessel vasculitis? *Current Opinion in Rheumatology*, *25*(1), 26–34. https://doi.org/10.1097/BOR.0B013E32835B4F8F

Kashif, W., Yaqub, S., Mahmood, S. F., & Patel, J. (2013). Double-positive Goodpasture's syndrome with concomitant active pulmonary tuberculosis. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation : An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, *24*(4), 783–788. https://doi.org/10.4103/1319-2442.113886

Kawana, S., Hashimoto, T., Nishikawa, T., & Nishiyama, S. (1994). Changes in Clinical Features, Histologic Findings, and Antigen Profiles With Development of Pemphigus Foliaceus From Pemphigus Vulgaris. *Archives of Dermatology*, *130*(12), 1534–1538. https://doi.org/10.1001/ARCHDERM.1994.01690120070010

Kawashima, S., Arimura, Y., Sano, K., Kudo, A., Komagata, Y., Kaname, S., Kawakami, H., & Yamada, A. (2013). Immunopathologic co-localization of MPO, IgG, and C3 in glomeruli in human MPO-ANCA-associated glomerulonephritis. *Clinical Nephrology*, *79*(04), 292–301. https://doi.org/10.5414/CN107675

Kojima, T., Hirose, G., Komatsu, S., Oshima, T., Sugisaki, K., Tomiyasu, T., Yoshikawa, N., Yamada, M., & Oda, T. (2019). Development of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis during the course of IgA nephropathy: A case report. *BMC Nephrology*, *20*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/S12882-019-1207-3/FIGURES/7

Koyama, A., Yamagata, K., Makino, H., Arimura, Y., Wada, T., Nitta, K., Nihei, H., Muso, E., Taguma, Y., Shigematsu, H., Sakai, H., Tomino, Y., & Matsuo, S. (2009). A nationwide survey of rapidly progressive glomerulonephritis in Japan: Etiology, prognosis and treatment diversity. *Clinical and Experimental Nephrology*, *13*(6), 633–650. https://doi.org/10.1007/S10157-009-0201-7/FIGURES/2

Lehmann, P. v., Forsthuber, T., Miller, A., & Sercarz, E. E. (1992). Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature*, *358*(6382), 155–157. https://doi.org/10.1038/358155A0

Levy, J. B., Hammad, T., Coulthart, A., Dougan, T., & Pusey, C. D. (2004). Clinical features and outcome of patients with both ANCA and anti-GBM antibodies. *Kidney International*, *66*(4), 1535–1540. https://doi.org/10.1111/J.1523-1755.2004.00917.X

Levy, J. B., Lachmann, R. H., & Pusey, C. D. (1996). Recurrent Goodpasture's disease. *American Journal of Kidney Diseases*, *27*(4), 573–578. https://doi.org/10.1016/S0272-6386(96)90169-9

Levy, J. B., Turner, A. N., Rees, A. J., & Pusey, C. D. (2001). Long-term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma exchange and immunosuppression. *Annals of Internal Medicine*, *134*(11), 1033–1042. https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-11-200106050-00009

Little, M. A., Smyth, L., Salama, A. D., Mukherjee, S., Smith, J., Haskard, D., Nourshargh, S., Cook, H. T., & Pusey, C. D. (2009). Experimental autoimmune vasculitis: an animal model of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis. *The American Journal of Pathology*, *174*(4), 1212–1220. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2009.080458

Liu, P., Waheed, S., Boujelbane, L., & Maursetter, L. J. (2016). Multiple recurrences of anti-glomerular basement membrane disease with variable antibody detection: Can the laboratory be trusted? *Clinical Kidney Journal*, *9*(5), 657–660. https://doi.org/10.1093/CKJ/SFW038

Lock, R. J. (1994). Detection of autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens. *Journal of Clinical Pathology*, *47*(1), 4–8. https://doi.org/10.1136/JCP.47.1.4

McAdoo, S. P., & Pusey, C. D. (2017). Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *12*(7), 1162–1172. https://doi.org/10.2215/CJN.01380217

McAdoo, S. P., Tanna, A., Hrušková, Z., Holm, L., Weiner, M., Arulkumaran, N., Kang, A., Satrapová, V., Levy, J., Ohlsson, S., Tesar, V., Segelmark, M., & Pusey, C. D. (2017). Patients double-seropositive for ANCA and anti-GBM antibodies have varied renal survival, frequency of relapse, and outcomes compared to single-seropositive patients.

Kidney International, *92*(3), 693–702. https://doi.org/10.1016/J.KINT.2017.03.014

McCall, A. S., Bhave, G., Pedchenko, V., Hess, J., Free, M., Little, D. J., Baker, T. P., Pendergraft, W. F., Falk, R. J., Olson, S. W., & Hudson, B. G. (2018). Inhibitory anti-peroxidasin antibodies in pulmonary-renal syndromes. *Journal of the American Society of Nephrology*, *29*(11), 2619–2625. https://doi.org/10.1681/ASN.2018050519/-/DCSUPPLEMENTAL

McLachlan, S. M., Nagayama, Y., Pichurin, P. N., Mizutori, Y., Chen, C. R., Misharin, A., Aliesky, H. A., & Rapoport, B. (2007). The link between Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: a role for regulatory T cells. *Endocrinology*, *148*(12), 5724–5733. https://doi.org/10.1210/EN.2007-1024

Naito, I., Ninomiya, Y., Nomura, S., Naito, I., Ninomiya, · Y, & Nomura, S. (2003). SPECIAL REVIEW SERIES: Advance in renal disease research Immunohistochemical diagnosis of Alport's syndrome in paraffin-embedded renal sections: antigen retrieval with autoclave heating. In *Med Electron Microsc* (Vol. 36).

Nakazawa, D., Masuda, S., Tomaru, U., & Ishizu, A. (2019). Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. *Nature Reviews Rheumatology*, *15*(2), 91–101. https://doi.org/10.1038/S41584-018-0145-Y

Nakazawa, D., Tomaru, U., Suzuki, A., Masuda, S., Hasegawa, R., Kobayashi, T., Nishio, S., Kasahara, M., & Ishizu, A. (2012). Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: Implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody–associated vasculitis. *Arthritis & Rheumatism*, *64*(11), 3779–3787. https://doi.org/10.1002/ART.34619

Nishibata, Y., Masuda, S., Nakazawa, D., Tanaka, S., Tomaru, U., Nergui, M., Xiao-yu, J., Cui, Z., Zhao, M. hui, Nakabayashi, K., & Ishizu, A. (2019). Epitope recognized by anti-glomerular basement membrane (GBM) antibody in a patient with repeated relapse of anti-GBM disease. *Experimental and Molecular Pathology*, *107*, 165–170. https://doi.org/10.1016/J.YEXMP.2019.02.005

Nonokawa, M., Suzuki, K., Hayashi, H., Nishibata, Y., Masuda, S., Nakazawa, D., Tanaka, S., Tomaru, U., & Ishizu, A. (2019). Native myeloperoxidase is required to make the experimental vasculitis model. *Arthritis Research and Therapy*, *21*(1), 1–3. https://doi.org/10.1186/S13075-019-2084-7/FIGURES/1

Olson, S. W., Arbogast, C. B., Baker, T. P., Owshalimpur, D., Oliver, D. K., Abbott, K. C., & Yuan, C. M. (2011). Asymptomatic autoantibodies associate with future anti-glomerular basement membrane disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *22*(10), 1946–1952. https://doi.org/10.1681/ASN.2010090928

Ootaka, T., Saito, T., Soma, J., Yusa, A., & Abe, K. (1997). Mechanism of infiltration and activation of glomerular monocytes/macrophages in IgA nephropathy. *American Journal of Nephrology*, *17*(2), 137–145. https://doi.org/10.1159/000169087

Pedchenko, V., Bondar, O., Fogo, A. B., Vanacore, R., Voziyan, P., Richard Kitching, A., Wieslander, J., Kashtan, C., Borza, D.-B., Neilson, E. G., Wilson, C. B., Hudson, B. G., & Departments of Pa-thology ABF, the. (2010). Molecular Architecture of the Goodpasture Autoantigen in Anti-GBM Nephritis A BS TR AC T. In *N Engl J Med* (Vol. 363).

Sada, K. ei, Yamamura, M., Harigai, M., Fujii, T., Dobashi, H., Takasaki, Y., Ito, S., Yamada, H., Wada, T., Hirahashi, J., Arimura, Y., Makino, H., Amano, K., Yamagata, K., Fujimoto, S., Homma, S., Kumagai, S., Muso, E., Murakawa, Y., … Ogawa, N. (2014). Classification and characteristics of Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in a nationwide, prospective, inception cohort study. *Arthritis Research and Therapy*, *16*(2). https://doi.org/10.1186/AR4550

Sakoda, C., Kusaba, T., Adachi, T., Sonomura, K., Kimura, T., Nakayama, M., Kishimoto, N., Nakagawa, H., Okigaki, M., Hatta, T., Matsubara, H., & Mori, Y. (2011). A case of Goodpasture syndrome positive for anti-GBM antibody and MPO-ANCA complicated by a variety of serious infections. *Clinical Nephrology*, *75*(4), 384–388. https://doi.org/10.2379/CNX06358

Savige, J., Davies, D., Falk, R. J., Jennette, J. C., & Wiik, A. (2000). Antineutrophil cytoplasmic antibodies and associated diseases: A review of the clinical and laboratory features. *Kidney International*, *57*(3), 846–862. https://doi.org/10.1046/J.1523-1755.2000.057003846.X

Savige, J., Gillis, D., Benson, E., Davies, D., Esnault, V., Falk, R. J., Hagen, E. C., Jayne, D., Jennette, J. C., Paspaliaris, B., Pollock, W., Pusey, C., Savage, C. O. S., Silvestrini, R., van der Woude, F., Wieslander, J., & Wiik, A. (1999). International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *American Journal of Clinical Pathology*, *111*(4), 507–513. https://doi.org/10.1093/AJCP/111.4.507

Shida, H., Nakazawa, D., Tateyama, Y., Miyoshi, A., Kusunoki, Y., Hattanda, F., Masuda, S., Tomaru, U., Kawakami, T., Atsumi, T., & Ishizu, A. (2016). The presence of anti-lactoferrin antibodies in a subgroup of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis patients and their possible contribution to enhancement of neutrophil extracellular trap formation. *Frontiers in Immunology*, *7*(DEC), 636. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2016.00636/BIBTEX

Shochet, L., Holdsworth, S., & Kitching, A. R. (2020). Animal Models of ANCA Associated

Vasculitis. *Frontiers in Immunology*, *11*, 525. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00525/BIBTEX

Silvariño, R., Noboa, O., & Cervera, R. (2014). Anti-glomerular basement membrane antibodies. *The Israel Medical Association Journal : IMAJ*, *16*(11), 727. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25558706/

Sinico, R. A., & Radice, A. (2014). Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) testing: Detection methods and clinical application. *Clinical and Experimental Rheumatology*, *32*(SUPPL.82).

Srivastava, A., Rao, G. K., Segal, P. E., Shah, M., & Geetha, D. (2013). Characteristics and outcome of crescentic glomerulonephritis in patients with both antineutrophil cytoplasmic antibody and anti-glomerular basement membrane antibody. *Clinical Rheumatology*, *32*(9), 1317–1322. https://doi.org/10.1007/S10067-013-2268-5

Stanton, M. C., & Tange, J. D. (1958). GOODPASTURE'S SYNDROME. *Australasian Annals of Medicine*, *7*(2), 132–144. https://doi.org/10.1111/IMJ.1958.7.2.132

Sugihara, K., Sado, Y., Ninomiya, Y., & Wada, H. (1996). Experimental anti-GBM glomerulonephritis induced in rats by immunization with synthetic peptides based on six alpha chains of human type IV collagen. *The Journal of Pathology*, *178*(3), 352–358. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199603)178:3<352:AID-PATH474>3.0.CO;2-7

Talor, M. v., Stone, J. H., Stebbing, J., Barin, J., Rose, N. R., & Burek, C. L. (2007). Antibodies to selected minor target antigens in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Clinical and Experimental Immunology*, *150*(1), 42–48. https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2007.03453.X

Terjung, B., Spengler, U., Sauerbruch, T., & Worman, H. J. (2000). 'Atypical p-ANCA' in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50-kilodalton nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines. *Gastroenterology*, *119*(2), 310–322. https://doi.org/10.1053/gast.2000.9366

Terjung, B., Worman, H. J., Herzog, V., Sauerbruch, T., & Spengler, U. (2001). Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) using immunofluorescence microscopy. *Clinical and Experimental Immunology*, *126*(1), 37–46. https://doi.org/10.1046/J.1365-2249.2001.01649.X

Vanacore, R., Pedchenko, V., Bhave, G., & Hudson, B. G. (2011). Sulphilimine cross-links in Goodpasture's disease. *Clinical and Experimental Immunology*, *164 Suppl 1*(SUPPL. 1), 4–6. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04356.x

Vanderlugt, C. L., & Miller, S. D. (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases:

implications for immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, *2*(2), 85–95. https://doi.org/10.1038/NRI724

Welker, P., Krämer, S., Groneberg, D. A., Neumayer, H. H., Bachmann, S., Amann, K., & Peters, H. (2008). Increased mast cell number in human hypertensive nephropathy. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *295*(4), 1103–1109. https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00374.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH20100852930006.JPEG

Wen, Y. K., & Wen, K. I. (2013). Pulmonary hemorrhage complicating Goodpasture's disease in the course of pulmonary tuberculosis. *International Urology and Nephrology*, *45*(6), 1773–1777. https://doi.org/10.1007/S11255-012-0242-9

Wiik, A. (1989). Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS, Supplement*, *97*(6), 12–13.

Wlodarczyk, A., Løbner, M., Cédile, O., & Owens, T. (2014). Comparison of microglia and infiltrating CD11c+ cells as antigen presenting cells for T cell proliferation and cytokine response. *Journal of Neuroinflammation*, *11*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-57/FIGURES/5

Wu, H.-C., Wen, Y.-K., Chen, M.-L., & Fan, C.-S. (2005). Pulmonary-Renal Syndrome in a Patient with Bacterial Endocarditis. *Journal of the Formosan Medical Association*, *104*(8), 588–592. https://doi.org/10.29828/JFMA.200508.0008

Xie, L. J., Cui, Z., Jia, X. Y., Chen, Z., Liu, X. R., & Zhao, M. H. (2015). Coexistence of Anti-Glomerular Basement Membrane Antibodies and Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies in a Child With Human Leukocyte Antigen Susceptibility and Detailed Antibody Description: A Case Report. *Medicine*, *94*(29). https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001179

Yang, R., Hellmark, T., Zhao, J., Cui, Z., Segelmark, M., Zhao, M. H., & Wang, H. Y. (2007). Antigen and epitope specificity of anti-glomerular basement membrane antibodies in patients with goodpasture disease with or without anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *18*(4), 1338–1343. https://doi.org/10.1681/ASN.2006111210

Zhao, J., Cui, Z., Yang, R., Jia, X. Y., Zhang, Y., & Zhao, M. H. (2009). Anti-glomerular basement membrane autoantibodies against different target antigens are associated with disease severity. *Kidney International*, *76*(10), 1108–1115. https://doi.org/10.1038/KI.2009.348

Zhao, J., Yan, Y., Cui, Z., Yang, R., & Zhao, M. H. (2009). The immunoglobulin G subclass distribution of anti-GBM autoantibodies against rHalpha3(IV)NC1 is associated with disease severity. *Human Immunology*, *70*(6), 425–429.

https://doi.org/10.1016/J.HUMIMM.2009.04.004

Zhou, J., Ding, M., Zhao, Z., & Reeders, S. T. (1994). Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, α6(IV). Isolation of the cDNAs for α6(IV) and comparison with five other type IV collagen chains. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(18), 13193–13199. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)36818-7

業績一覧

【学術論文】

1. Yoshinari M, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tomaru U, Arimura Y, Amano K, Yuzawa Y, Sada K, Atsumi T, Dobashi H, Hasegawa H, Harigai M, Matsuo S, Makino H, Ishizu A: Low disease activity of microscopic polyangiitis in patients with anti-myosin light chain 6 antibody that disrupts actin rearrangement necessary for neutrophil extracellular trap formation. Arthritis Res Ther 24: 274, 2022
2. Kawakami T, Yokoyama K, Ikeda T, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A: Similar deposition of neutrophil extracellular traps in the dermis among COVID-19-associated IgA vasculitis, post-COVID-19 vaccination IgA vasculitis, and COVID-19-unrelated IgA vasculitis. J Dermatol 10.1111/1346-8138.16673 (Online ahead of print), 2022
3. Yoshinari M, Hattanda F, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A: A Novel Antineutrophil Extracellular Trap Antibody Targeting Myosin Light Chain 6 in Microscopic Polyangiitis. J Rheumatol 49: 1286-1288, 2022
4. Kawakami T, Nakade I, Tamura Y, Ito F, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A: Typical cutaneous small-vessel vasculitis induced by combined injection of antiphosphatidylserine/prothrombin complex antibody and anti-LAMP-2 antibody in normal rats. J Dermatol 49: 1233-1237, 2022
5. Kawakami T, Yokoyama K, Ikeda T, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A: Presence of neutrophil extracellular traps in superficial venous thrombosis of Behçet's disease. J Dermatol 49: 741-745, 2022
6. Masuda S, Kato K, Ishibashi M, Nishibata Y, Sugimoto A, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Tsujino I, Ishizu A: Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulation under hypoxia induces nuclear swelling with DNA outflow but not extracellular trap formation of neutrophils. Exp Mol Pathol 125: 104754, 2022
7. Nishibata Y, Nonokawa M, Tamura Y, Higashi R, Suzuki K, Hayashi H, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of intermolecular epitope spreading in the production of anti-glomerular basement membrane antibody in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Clin Exp Rheumatol 40: 691-704, 2022.
8. Senda A, Sasai R, Kato K, Nishibata Y, Masuda S, Ishizu A, Takahara N: Involvement of neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of glomerulonephritis in a case of systemic lupus erythematosus and antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis overlap syndrome. CEN Case Rep 11: 339-346, 2022.
9. Nishibata Y, Matsuzawa S, Satomura Y, Ohtsuka T, Kuhara M, Masuda S, Tomaru U,

Ishizu A. Neutrophil fixation protocols suitable for substrates to detect anti-neutrophil cytoplasmic antibodies by indirect immunofluorescence. Pathol Res Pract 228: 153661, 2021.

10. Kawakami T, Tamura Y, Dong Y, Yoshinari M, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibodies in patients with cutaneous vasculitis: Possible involvement in the pathogenesis. J Dermatol 48: 703-706, 2021.
11. Nishibata Y, Koshimoto S, Ogaki K, Ishikawa E, Wada K, Yoshinari M, Tamura Y, Uozumi R, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A: RNase in the saliva can affect the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by real-time one-step polymerase chain reaction using saliva samples. Pathol Res Pract 220: 153381, 2021.
12. Nonokawa M, Shimizu T, Yoshinari M, Hashimoto Y, Nakamura Y, Takahashi D, Asano T, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Iwasaki N, Ishizu A: Association of neutrophil extracellular traps with the development of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. Am J Pathol 190: 2282-2289, 2020.
13. Tanimura S, Nishida M, Horie T, Kamishima T, Matsumoto H, Morimura Y, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A: Fluvastatin prevents the development of arthritis in env-pX rats via up- regulation of Rho GTPase-activating protein 12. Exp Mol Pathol 115: 104454, 2020.
14. Kawakami T, Kikuchi A, Miyabe C, Ikeda T, Takeuchi S, Tamura Y, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. Relationship between lysosomal-associated membrane protein-2 and anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibody in pathogenesis of cutaneous vasculitis. Clin Exp Rheumatol 38, Suppl.124: S161-S165, 2020.
15. Uozumi R, Iguchi R, Masuda S, Nishibata Y, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A: Pharmaceutical immunoglobulins reduce neutrophil extracellular trap formation and ameliorate the development of MPO-ANCA-associated vasculitis. Mod Rheumatol 30: 544-550, 2020.
16. Nonokawa M, Suzuki K, Hayashi H, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Ishizu A: Native myeloperoxidase is required to make the experimental vasculitis model. Arthritis Res Ther 21: 296, 2019.
17. Horie T, Nishida M, Tanimura S, Kamishima T, Tamai E, Morimura Y, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A: Detection of increased vascular signal in arthritis-prone rats without joint swelling using superb microvascular imaging ultrasonography. Ultrasound Med Biol 45: 2086-2093, 2019.
18. Masuda S, Nonokawa M, Futamata E, Nishibata Y, Iwasaki S, Tsuji T, Hatanaka Y, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Kawakami T, Atsumi T, Ishizu A: Formation and

disordered degradation of neutrophil extracellular traps in necrotizing lesions of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Am J Pathol 189: 839-846, 2019.
19. Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Nergui M, Jia X, Cui Z, Zhao MH, Nakabayashi K, Ishizu A: Epitope recognized by anti-glomerular basement membrane (GBM) antibody in a patient with repeated relapse of anti-GBM disease. Exp Mol Pathol 107: 165-170, 2019.
20. Nishioka Y, Sonoda T, Shida H, Kusunoki Y, Hattanda F, Tanimura S, Uozumi R, Yamada M, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A: Detection of autoreactive type II NKT cells: a pilot study of comparison between healthy individuals and patients with vasculitis. Cytometry Part A 93: 1157-1164, 2018.
21. Mori A, Nishioka Y, Yamada M, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Honma N, Moriyama T, Ishizu A: Brain-derived neurotrophic factor induces angiogenin secretion and nuclear translocation in human umbilical vein endothelial cells. Pathol Res Pract 214: 521-526, 2018.
22. Futamata E, Masuda S, Nishibata Y, Tanaka S, Tomaru U, Ishizu A: Vanishing immunoglobulins: the formation of pauci-immune lesions in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Nephron 138: 328-330, 2017.
23. Masuda S, Shimizu S, Matsuo J, Nishibata Y, Kusunoki Y, Hattanda F, Shida H, Nakazawa D, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A: Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. Cytometry Part A 91: 822-829, 2017.
24. Yamada M, Kawakami T, Takashima K, Nishioka Y, Nishibata Y, Masuda S, Yoshida S, Tomaru U, Ishizu A: Establishment of a rat model of thrombosis induced by intravenous injection of anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibody. Rheumatology (Oxford) 56: 1013-1018, 2017.
25. Sakurai T, Trirongjitmoah S, Nishibata Y, Namita T, Tsuji M, Hui SP, Jin S, Shimizu K, Chiba H: Measurement of Lipoprotein Particle Sizes Using Dynamic Light Scattering. Ann Clin Biochem 476-481, 2010.

【総説・解説】

1. 石津 明洋, 益田 紗季子, 西端 友香: 【循環器 II-血管・血管腫・弁膜疾患-】小型血管の血管炎. 病理と臨床 39: 1116-1122, 2021.
2. 石津 明洋, 益田 紗季子, 西端 友香: 【新しい手法を駆使した腎臓病研究の最前線】糸球体疾患 ANCA と NETs. 腎と透析 91: 851-855, 2021.

【学会発表】

1. 川上 民裕, 中出 一生, 田村 宥人, 伊藤 吹夕, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: 正常ラットにヒストン皮下注射後,抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体と抗リソソーム膜タンパク質 2 抗体の静脈注射により,皮膚血管炎の発症に成功した. 第 52 回日本皮膚免疫アレルギー学会学術大会, 名古屋市, 2022.12.
2. 益田 紗季子, 西端 友香, 外丸 詩野, 横山 華英, 池田 高治, 川上 民裕, 石津 明洋: COVID‐19 発症後および COVID‐19 ワクチン接種後 IgA 血管炎の皮膚生検組織における好中球細胞外トラップの沈着－COVID‐19 非関連 IgA 血管炎との比較. 第 27 回日本血管病理研究会, 岐阜市, 2022.11
3. 西端 友香, 佐藤 雅之, 長森 恒久, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: 無症候性血尿を呈した抗糸球体基底膜（GBM）抗体陽性症例の血清を用いた抗体解析. 第 27 回日本血管病理研究会, 岐阜市, 2022.11.
4. 川上 民裕, 横山 華英, 池田 高治, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: ベーチェット病皮膚生検標本を使用した NETs の検証. 第 74 回日本皮膚科学会西部支部学術大会, 久留米市, 2022.10.
5. 川上 民裕, 横山 華英, 池田 高治, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: ベーチェット病皮下の血栓性静脈炎における Neutrophil Extracellular Traps の発現. 第 71 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2022.10.
6. Ishizu A, Taniguchi M, Arai S, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Shimizu T, Sinko W, Nagakura T, Terada Y: Preclinical studies of a novel cathepsin C inhibitor in MPO-ANCA-associated vasculitis model. European Alliance of Associations for Rheumatology 2022, Copenhagen, Denmark, 2022.6.
7. 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: MPO-ANCA 関連血管炎モデルにおける新規好中球機能制御化合物薬の抑制効果. 第 66 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜, 2022.4.
8. 中出 一生, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: ブルトン型チロシンキナーゼ阻害剤チラブルチニブによる MPO-ANCA 関連血管炎誘導モデルの発症抑制. 第 66 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜, 2022.4.
9. 小川 帆貴, 横田 隼一, 清水 智弘, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 岩崎 倫政, 石津 明洋: 全身性エリテマトーデスへのステロイドパルスが好中球細胞外トラップ形成に及ぼす影響. 第 66 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜, 2022.4.
10. 益田 紗季子, 北野 翔大, 西端 友香, 外丸 詩野, 石津 明洋: 好中球細胞外トラップに DNase I 抵抗性を付与するタンパクの探索. 第 111 回日本病理学会総会, 神戸, 2022.4.
11. 辻 隆裕, 牧田 啓史, 深澤 雄一郎, 加賀 幸斗, 西端 友香, 益田 紗季子, 石津 明洋, 岩崎 沙理: 膜性腎症の特異抗原(PLA2R,THSD7A,NELL1,EXT1/2)について最近の話題. 第 111 回日本病理学会総会, 神戸, 2022.4.

12. Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tanaka S, Tomaru U, Ishizu A: Production mechanism of anti-glomerular basement membrane antibody in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. The 20th International Vasculitis and ANCA Workshop, Dublin, Ireland, 2022.4.
13. 柏 航, 加藤 千恵次, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 川上 民裕, 石津 明洋: 結節性多発動脈炎と皮膚動脈炎の皮膚生検画像の人工知能による鑑別. 第 26 回日本血管病理研究会, 宮崎市, 2021.11.
14. 川上 民裕, 横山 華英, 池田 高治, 高橋 一夫, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: 東北医科薬科大学におけるベーチェット病診療の実態と皮膚生検標本を使用した NETs 免疫染色の検証. 第 4 回日本ベーチェット病学会, 横浜市, 2021.11
15. 川上 民裕, 田村 宥人, 董 宇鵬, 吉成 未来, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: ヒストン皮下注射と抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体静脈注射から完成した皮膚血管炎の動物モデル. 第 49 回日本臨床免疫学会総会, 東京, 2021.10.
16. 川上 民裕, 田村 宥人, 董 宇鵬, 吉成 未来, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: 血管炎動物モテルの完成と抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体. 第 70 回日本アレルギー学会学術大会, 横浜市, 2021.10.
17. 荒井 粋心, 谷口 舞, 細井 夢花, 進藤 綾乃, 北野 翔大, 中出 一生, 西端 友香, 益田 紗季子, 清水 喬史, 長倉 廷, 寺田 央, 外丸 詩野, 石津 明洋: 新規の好中球機能制御薬が好中球細胞外トラップ(NETs)の形成に及ぼす影響. 第 101 回北海道医学大会病理分科会, 札幌市, 2021.9.
18. 谷口 舞, 荒井 粋心, 細井 夢花, 進藤 綾乃, 北野 翔大, 中出 一生, 西端 友香, 益田 紗季子, 清水 喬史, 長倉 廷, 寺田 央, 外丸 詩野, 石津 明洋: MPO-ANCA 関連血管炎モデルを用いた新規好中球機能制御薬の薬効評価. 第 101 回北海道医学大会病理分科会, 札幌市, 2021.9.
19. 川上 民裕, 田村 宥人, 董 宇鵬, 吉成 未来, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: 抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体による皮膚血管炎動物モデルの完成. 第 85 回日本皮膚科学会東部支部学術大会, 札幌市, 2021.9.
20. Kawakami T, Tamura Y, Dong Y, Yoshinari M, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A: Anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibodies in patients with cutaneous vasculitis: Possible involvement in the pathogenesis. 2021 SID Virtual Meeting, Cleveland, USA, WEB, 2021.5
21. 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: myosin light chain6 を認識する抗好中球細胞外トラップ(NETs)抗体は NETs 分解阻害活性を持つ. 第 65 回日本リウマチ学会総会・学術集会, オンライン, 2021.4.
22. 益田 紗季子, 西端 友香, 田中 敏, 外丸 詩野, 辻野 一三, 石津 明洋: 低酸素環境が

好中球細胞外トラップ形成へ与える影響. 第 110 回日本病理学会総会, 東京, 2021.4.

23. 新海 隼人, 加藤 千恵次, 川上 民裕, 高橋 啓, 西端 友香, 益田 紗季子, 田中 敏, 外丸 詩野, 石津 明洋: 人工知能による結節性多発動脈炎と皮膚動脈炎の皮膚生検画像の鑑別. 第 25 回日本血管病理研究会, オンライン, 2020.11.
24. 吉成 未来, 益田 紗季子, 西端 友香, 田中 敏, 外丸 詩野, 石津 明洋: 好中球細胞外トラップ(NETs)分解阻害活性を持つ抗 NETs 抗体の対応抗原の同定. 第 100 回北海道医学大会病理分科会, オンライン, 2020.10.
25. 田村 宥人, 益田 紗季子, 西端 友香, 田中 敏, 外丸 詩野, 石津 明洋: MPO-ANCA 関連血管炎(MPO-AAV)モデルを用いた新規薬剤評価. 第 100 回北海道医学大会病理分科会, オンライン, 2020.10.
26. 清水 智弘, 野々川 茉佑, 西端 友香, 益田 紗季子, 高橋 大介, 浅野 毅, 田中 敏, 外丸 詩野, 岩崎 倫政, 石津 明洋: 特発性大腿骨頭壊死症の発生における好中球細胞外トラップの関与. 第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会, オンライン, 2020.10.
27. 西端 友香, 益田 紗季子, 中沢 大悟, 外丸 詩野, 石津 明洋: 中小型血管炎(ANCA 関連血管炎) 抗好中球細胞質抗体(ANCA)に続き抗糸球体基底膜(GBM)抗体が産生されるメカニズム. 第 64 回日本リウマチ学会総会・学術集会, オンライン, 2020.8.
28. 益田 紗季子, 石橋 美郷, 加藤 くるみ, 西端 友香, 田中 敏, 外丸 詩野, 辻野 一三, 石津 明洋: 肺基礎疾患を有する肺炎患者における分解抵抗性好中球細胞外トラップの形成. 第 109 回日本病理学会総会, オンライン, 2020.7.
29. 西端 友香, 野々川 茉佑, 益田 紗季子, 中沢 大悟, 田中 敏, 外丸 詩野, 石津 明洋: 抗 GBM 抗体が認識するエピトープの表出に関する検討. 第 24 回日本血管病理研究会, 松本市, 2019.11.
30. 野々川 茉佑, 鈴木 玖風, 林 秀幸, 西端 友香, 益田 紗季子, 中沢 大悟, 田中 敏, 外丸 詩野, 石津 明洋: MPO-ANCA 関連血管炎のモデル作製には native MPO が必要である. 第 25 回 MPO 研究会, 東京, 2019.11.
31. 新海 隼人, 加藤 千恵次, 川上 民裕, 高橋 啓, 外丸 詩野, 田中 敏, 益田 紗季子, 西端 友香, 石津 明洋: 人工知能は結節性多発動脈炎と皮膚動脈炎の皮膚生検組織所見を区別した. 第 99 回北海道医学大会病理分科会, 旭川, 2019.10.
32. 野々川 茉佑, 鈴木 玖風, 林 秀幸, 益田 紗季子, 西端 友香, 田中 敏, 外丸 詩野, 石津 明洋: MPO-ANCA 関連血管炎(MPO-AAV) 発症促進モデルの作製. 第 99 回北海道医学大会病理分科会, 旭川, 2019.10.
33. 西端 友香, 東 里緒, 益田 紗季子, 中沢 大悟, 田中 敏, 外丸 詩野, 石津 明洋: 抗 GBM 抗体が認識するエピトープの表出に関する検討. 第 108 回日本病理学会総会, 東京, 2019.5.
34. 益田 紗季子, 野々川 茉佑, 西端 友香, 岩崎 沙理, 辻 隆裕, 田中 敏, 外丸 詩野, 川上 民裕, 石津 明洋: ANCA 関連血管炎の壊死性病変部における好中球細胞外トラップ

（NETs）の存在と病的意義. 第 108 回日本病理学会総会, 東京, 2019.5.

35. Uozumi R, Masuda S, Nishibata Y, Tanimura S, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A: High dose immunoglobulins can inhibit neutrophil extracellular trap formation, eventually prevent the development of MPO-ANCA-associated vasculitis. The 19th International Vasculitis and ANCA Workshop, Philadelphia, USA, 2019.4.
36. 益田 紗季子, 西端 友香, 中沢 大悟, 外丸 詩野, 川上 民裕, 渥美 達也, 石津 明洋: ANCA 関連血管炎の壊死性病変部における好中球細胞外トラップの存在と病的意義. 第 63 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 京都, 2019.4
37. 川上 民裕, 竹内 そら, 菊池 彩翔, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: ヒストンは好中球細胞上に LAMP2 を表出し, 抗 LAMP2 抗体と連携して皮膚小血管炎の発症機序に関与している. 第 23 回日本血管病理研究会, 下関市, 2018.11.
38. 西端 友香, 東 里緒, 益田 紗季子, 中沢 大悟, 田中 敏, 外丸 詩野, 中林 公正, 石津 明洋: 抗糸球体基底膜抗体病（抗 GBM 病）の頻回再発症例の抗 GBM が認識するエピトープ. 第 23 回日本血管病理研究会, 下関市, 2018.11.
39. 川上 民裕, 竹内 そら, 菊池 彩翔, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 石津 明洋: ヒストンは好中球細胞表面に LAMP2 を表出し, 抗 LAMP2 抗体と協調して皮膚小血管に好中球を集積させる. 第 24 回 MPO 研究会, 札幌市, 2018.10.
40. 森 綾子, 西岡 佑介, 山田 真衣, 西端 友香, 益田 紗季子, 外丸 詩野, 本間 直幸, 森山 隆則, 石津 明洋: BDNF の血管新生シグナル経路における angiogenin の関与. 第 98 回北海道医学大会病理分科会, 札幌, 2018.10.
41. 西端 友香, 東 里緒, 益田 紗季子, 中沢 大悟, 田中 敏, 外丸 詩野, 中林 公正, 石津 明洋: 治療抵抗性抗糸球体基底膜抗体病（抗 GBM 病）の抗 GBM が認識するエピトープ. 第 98 回北海道医学大会病理分科会, 札幌, 2018.10.
42. Tanimura S, Nishida M, Horie T, Kamishima T, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A: Inhibitory effect of statins on arthritis and its mechanism. 20th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, Kaohsiung, Taiwan, 2018.9.
43. 魚住 諒, 井口 理彩, 益田 紗季子, 西端 友香, 谷村 瞬, 中沢 大悟, 外丸 詩野, 石津 明洋: 免疫グロブリン大量静注療法（IVIG）は好中球細胞外トラップ（NETs）の抑制により MPO-ANCA 関連血管炎の発症を抑制する. 第 107 回日本病理学会総会, 札幌市, 2018.6.
44. 益田 紗季子, 野々川 茉佑, 西端 友香, 岩崎 沙理, 辻 隆裕, 田中 敏, 外丸 詩野, 川上 民裕, 石津 明洋: ANCA 関連血管炎（AAV）の壊死性病変部における好中球細胞外トラップ（NETs）の存在と病的意義. 第 107 回日本病理学会総会, 札幌市, 2018.6.
45. 西田 睦, 谷村 瞬, 神島 保, 西端 友香, 益田 紗季子, 中沢 大悟, 外丸 詩野, 渥美 達也, 石津 明洋: 超高周波プローブを用いた Superb Micro-vascular Imaging による超音

波検査でのラット足関節の早期関節炎診断. 第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2018.4.

46. 魚住 諒, 益田 紗季子, 西端 友香, 谷村 瞬, 中沢 大悟, 外丸 詩野, 石津 明洋: 免疫グロブリン製剤は好中球細胞外トラップ（NETs）の形成抑制を介して MPO-ANCA 関連血管炎（MPO-AAV）の発症を抑制する. 第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2018.4.
47. 二俣 絵美花, 益田 紗季子, 西端 友香, 田中 敏, 外丸 詩野, 石津 明洋: MPO-ANCA 関連血管炎はなぜ pauci-immune 型病変となるのか？. 第 23 回 MPO 研究会, 東京, 2017.12.
48. 西端 友香, 植松 千浩, 益田 紗季子, 田中 敏, 外丸 詩野, 石津 明洋: プロテアーゼによる抗糸球体基底膜抗体病の隔絶抗原の表出. 第 22 回日本血管病理研究会, 東京, 2017.11.
49. 益田 紗季子, 野々川 茉佑, 西端 友香, 岩崎 沙理, 辻 隆裕, 田中 敏, 外丸 詩野, 川上 民裕, 石津 明洋: ANCA 関連血管炎の壊死性病変部における NETs の存在と病的意義. 第 22 回日本血管病理研究会, 東京, 2017.11.
50. 西端 友香, 植松 千浩, 益田 紗季子, 田中 敏, 外丸 詩野, 石津 明洋: プロテアーゼによる抗糸球体基底膜抗体病の隔絶抗原の表出. 第 97 回北海道医学大会病理分科会, 札幌, 2017.10.
51. 益田 紗季子, 西端 友香, 松尾 淳司, 外丸 詩野, 石津 明洋: フローサイトメトリーによる定量的好中球細胞外トラップ測定法. 第 106 回日本病理学会総会, 東京, 2017.4.
52. Yamada M, Kawakami T, Takashima K, Nishioka Y, Nishibata Y, Masuda S, Yoshida S, Tomaru U, Ishizu A: Establishment of anti-rat phosphatidylserine/prothrombin monoclonal antibodies and a thrombotic rat model induced by intravenous injection of the antibody. The 18th International Vasculitis and ANCA Workshop, Tokyo, Japan, 2017.3.
53. 益田 紗季子, 西端 友香, 松尾 淳司, 外丸 詩野, 石津 明洋: フローサイトメトリーによる定量的好中球細胞外トラップ測定法. 第 22 回 MPO 研究会, 京都, 2016.12.
54. Yamada M, Takashima K, Kawakami T, Nishioka Y, Nishibata Y, Masuda S, Yoshida S, Tomaru U, Ishizu A. Establishment of a rat model of thrombosis using the anti-phosphatidyl serine/prothrombin monoclonal antibody. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会, 沖縄, 2016.12.
55. 川上 民裕, 山田 真衣, 高島 滉平, 西岡 佑介, 西端 友香, 益田 紗季子, 吉田 繁, 外丸 詩野, 石津 明洋: 抗 PSPT 抗体は, 正常ラットに血栓を発症させる. 第 21 回日本血管病理研究会, 東京, 2016.10.
56. 山田 真衣, 高島 滉平, 西岡 佑介, 西端 友香, 益田 紗季子, 吉田 繁, 外丸 詩野, 川上 民裕, 石津 明洋: 抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体（抗 PS/PT 抗体）

を用いた血栓症モデル動物の作製. 第 96 回北海道医学大会病理分科会, 札幌, 2016.10.

57. 西端 友香, 櫻井 俊宏, 高橋 祐司, 古川 博之, 和田 典男, 永坂 敦, 惠 淑萍, 生田 知子, 古牧 宏啓, 神 繁樹, 武田 晴治, 布田 博敏, 小林 清一, 千葉 仁志: 酸化リポ蛋白自己抗体の研究 モノクローナル抗体の作製. 第 57 回日本臨床検査医学会, 東京, 2010.9.
58. 櫻井 俊宏, 西端 友香, 高橋 祐司, 古川 博之, 和田 典夫, 永坂 敦, 惠 淑萍, 生田 知子, 古牧 宏啓, 神 繁樹, 武田 晴治, 布田 博敏, 小林 清一, 千葉 仁志: 酸化リポ蛋白自己抗体の研究 臨床的検討. 第 57 回日本臨床検査医学会, 東京, 2010.9.
59. 古牧 宏啓, 櫻井 俊宏, 高橋 祐司, 生田 知子, 西端 友香, 惠 淑萍, 神 繁樹, 布田 博敏, 千葉 仁志: 抗 apoE 抗体と抗 apoCIII 抗体の sandwich-ELISA によるレムナントリポ蛋白の検出について. 第 57 回日本臨床検査医学会, 東京, 2010.9.
60. 櫻井 俊宏, 生田 知子, 古牧 宏啓, 高橋 祐司, 西端 友香, 古川 博之, 和田 典男, 永坂 敦, 惠 淑萍, 神 繁樹, 武田 晴治, 布田 博敏, 小林 清一, 千葉 仁志: 酸化リポ蛋白の新規測定法の開発. 第 49 回日本臨床化学会年次学術集会, 甲府, 2010.9.
61. 古牧 宏啓, 櫻井 俊宏, 高橋 祐司, 生田 知子, 西端 友香, 惠 淑萍, 神 繁樹, 布田 博敏, 武田 晴治, 千葉 仁志: apoCIII と apoE の両者を持つリポ蛋白粒子(Lp-CIII-E)の分布の検討. 第 49 回日本臨床化学会年次学術集会, 甲府, 2010.9.
62. 櫻井俊宏, 西端友香, 高橋祐司,古川博之, 和田典男, 永坂　敦, 惠淑萍, 生田知子, 古牧宏啓, 神繁樹, 武田晴治, 布田博敏, 小林清一, 千葉仁志: 酸化リポ蛋白に対する自己抗体の新規測定法の開発. 第 63 回 日本酸化ストレス学会, 神奈川, 2010.6
63. トライロンジットモア スチン, 櫻井俊宏, 西端友香, 浪田健, 加藤祐次, 飯永一也, 千葉仁志, 清水孝一: 動的光散乱による small dense LDL の割合推定法の開発:II. 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2009, 新潟, 2009.11
64. 西端 友香, 櫻井 俊宏, Suchin Trirongjitmoah, 浪田 健, 神 繁樹, 清水 孝一, 千葉 仁志: 動的光散乱法を用いたリポ蛋白粒径計測法. 第 49 回日本臨床化学会年次学術集会, 長崎, 2009.9.
65. 櫻井 俊宏, Suchin Trirongjitmoah, 西端 友香, 神 繁樹, 清水 孝一, 千葉 仁志: 原子間力顕微鏡を用いたリポ蛋白粒径計測法. 第 49 回日本臨床化学会年次学術集会, 長崎, 2009.9.
66. 西端 友香, 櫻井 俊宏, Suchin Trirongjitmoah, 浪田 健, 神 繁樹, 清水 孝一, 千葉 仁志: 動的光散乱法を用いた各種リポ蛋白粒径の計測. 第 56 回日本臨床検査医学会, 札幌, 2009.8.
67. トライロンジットモア・スチン, 浪田 健, 西端 友香, 櫻井 俊宏, 加藤 祐次, 飯永 一也, 千葉 仁志, 清水 孝一: 動的光散乱による small dense LDL の割合推定の試み. 第 48 回日本生体医工学会大会, 東京, 2009.4