

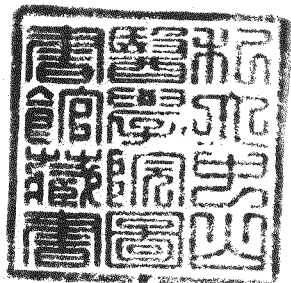
R
008.8
2351
88

私立中山醫學院生物化學研究所碩士論文

指導教授：蔡嘉哲 教授

嗜中性白血球細胞質抗體在血管炎與自體
免疫疾病病人之研究

Diversity of classic anti-neutrophil cytoplasmic
antibody (cANCA) and perinuclear anti-
neutrophil cytoplasmic antibody (pANCA) in
vasculitides and autoimmune diseases



研究生：傅惠玲 撰
參考書恕不外借
中華民國八十八年七月

中山醫學院圖書館



C055242

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必要條件之一，經中山醫學院
生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

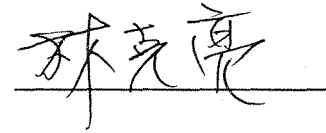
國立成功大學醫學院內科學系副教授

劉明輝 博士



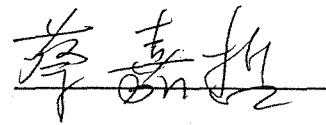
私立中山醫學院醫事技術學系副教授

林克亮 博士



私立中山醫學院醫學研究所教授
(論文指導教授)

蔡嘉哲 博士

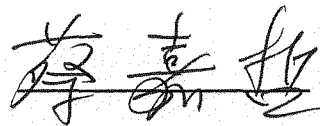


中華民國八十八年七月

學生傅惠玲論文題目為嗜中性白血球細胞質抗體在血管炎與自體免疫疾病病人之研究，其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授: 蔡嘉哲 博士

簽名:

Handwritten signature of Cai Jia Zhe in black ink, written in a cursive style.

中華民國八十八年七月

誌謝

自從進研究所以來無時無刻感受到中山醫學院師長及雲林醫院同仁的鼓勵和支持讓我得以順利完成研究所的課業。

於此期間首先要感謝指導教授蔡嘉哲博士和林克亮博士及口試委員劉明輝博士對此篇論文的指導，再者更感謝實驗室再靜學姊及博修學長的實驗技術及知識的傳授和指導讓我於研究所期間充實不少專業技術及能力，亦感謝實驗室東源、靜婷、壬模、彩濃等學長姊、學弟妹們的幫忙與關心，謝謝您們。

最後感謝雲林醫院妙伶學姊的幫助讓我工作上無後顧之憂，最後謹以此論文獻給支持與照顧我的家人及朋友，由於他們不斷的支持及照顧我才讓我完成學業，謝謝您們。

傅惠玲

謹誌於

中山醫學院生物化學研究所

中華民國八十八年七月三日

目錄

	頁次
中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一章 前言.....	1
第二章 研究背景.....	3
第一節 血管炎之命名與 ANCA 有關之血炎.....	3
1-1 血管炎之命名.....	3
1-2 與 ANCA 有關之血管炎簡介.....	4
第二節 ANCA 特異性抗原.....	6
2-1 Myeloperoxidase (MPO)之正常生理功能.....	7
2-2 Proteinase 3 (PR3)之正常生理功能.....	8
2-3 Lactoferrin (LF)之正常生理功能.....	9
2-4 High mobility group 1&2(HMG 1&2)之正常生理 功能.....	10
2-5 Lysozyme (LZ)之正常生理功能.....	11
第三節 ANCA patterns 與 Antigen specificity 及 Disease 之間的關聯.....	11
第四節 ANCA 臨床檢驗之判讀.....	13
第五節 ANCA 診斷意義.....	15
第六節 ANCA 的致病機轉.....	16
第三章 材料與方法.....	18
第一節 血清來源.....	18
第二節 實驗方法.....	18
一. 細胞培養.....	18
二. 從全血中分離嗜中性白球.....	19

三. 抗原之製備.....	20
四. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Eletrophoresis (SDS-PAGE).....	20
五. 轉漬(Transfer).....	21
六. Western Blot.....	21
七. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).....	22
八. HL-60 cells 進行 cytospin 之製備流程.....	24
九. Indirect Immunofluoresence (IIF).....	24
十. 兔子抗血清之製備.....	24
第四章 結果.....	27
第五章 討論.....	53
第六章 參考文獻.....	66

摘要

目的:鑑別在血管炎和自體免疫疾病的病人血清中，出現的嗜中性白血球細胞質抗體(Anti-neutrophil cytoplasmic antibody)所對抗之抗原。

方法:將收集來自不同臨床徵候、懷疑有血管炎的160支血清及40支正常血清，首先利用間接螢光免疫分析法(Indirect immunofluorescence)測試是否含有嗜中性白血球細胞質抗體，然後再進一步使用酵素連結免疫分析法(Enzyme linked immunosorbent assay)分析 Proteinase 3 (PR3)抗體、Myeloperoxidase (MPO)抗體、Lactoferrin (LF)抗體及 Lysozyme (LZ)抗體的表現。除此之外，110支來自全身性紅斑性狼瘡(Systemic lupus erythematosus)病人血清和51支來自類風濕性關節炎(Rheumatoid arthritis)病人血清，亦使用酵素連結免疫分析法去分析 PR3 抗體、MPO 抗體、LF 抗體及 LZ 抗體的表現。

結果:在160支懷疑有血管炎的血清中，以間接免疫螢光分析發現，其中60支表現核周圍型嗜中性白血球細胞質抗體(Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody)，21支表現細胞質型嗜中性白血球細胞質抗體(Cytoplasmic anti-neutrophil cytoplasmic antibody)。而在60支表現核周圍型嗜中性白血球細胞質抗體的血清中，與MPO反應有13支、與PR3反應有8支、與LF反應有8支、與LZ反應有4支；在21支表現細胞質型嗜中性白血球細胞質抗體的血清中，與PR3反應有12支、與LF反應有4支、與LZ反應有4支、與MPO反應有3支。

在110支全身性紅斑性狼瘡病人血清中，嗜中性白血球細胞質抗體之各種特異性抗原出現之比例分別為PR3抗體0%、MPO抗體1%、LF抗體27.2%、LZ抗體29.1%。在51支類風濕性關節炎病人血清中，嗜中性白血球細胞質抗體之各種特異性抗原出現之比例分別為PR3抗體5.9%、MPO抗體2%、LF抗體7.8%、LZ抗體3.92%。

結論:核周圍型嗜中性白血球細胞質抗體和細胞質型嗜中性白血球細胞質抗體會與不同的嗜中性白血球細胞質抗原反應。全身性紅斑性狼瘡病人血清與類風濕性關節炎病人血清,並不常出現 PR3 和 MPO 抗體,其中在全身性紅斑性狼瘡病人血清中,LF 抗體、LZ 抗體出現的比例高,而 PR3 抗體、MPO 抗體出現的比例低。兔子經 MPO 免疫注射,螢光表現 pANCA;經 LF 免疫注射,螢光亦表現 pANCA;經 HMG 1&2 免疫注射,螢光表現 cANCA。

Abstract

Objective. To characterize antigens recognized by classic anti-neutrophil cytoplasmic antibody (cANCA) and perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (pANCA) in vasculitis and autoimmune disease.

Methods. A total of 160 serum samples from patients with different clinical manifestations in whom systemic vasculitides were suspected and 40 control samples were tested for cANCA and pANCA by indirect immunofluorescence (IIF). All available sera were further tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the presence of antibodies to proteinase 3 (PR3), myeloperoxidase (MPO), lactoferrin (LF) and lysozyme (LZ). In addition, sera from 110 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and 51 patients with rheumatoid arthritis (RA) were also tested by ELISA for antibodies to PR3, MPO, LF and LZ.

Results. ANCA were detected in 81 of the 160 sera by IIF. A cANCA pattern of fluorescence was detected in 21 sera and a pANCA pattern was observed in 60 sera. By ELISA testing, of the 21 sera with cANCA, 12 sera reacted to PR3, 4 to LF, 4 to LZ and 3 to MPO. Of the 60 sera with pANCA, 15 sera reacted with MPO, 13 to PR3, 8 to LF and 4 to LZ.

The prevalence of ANCA antigenic specificities in SLE were anti-PR3= 0%; anti-MPO= 1%; anti-LF= 27.2%; anti-LZ= 29.1%. The prevalence of ANCA antigenic specificities in RA were anti-PR3= 5.9%; anti-MPO= 2%; anti-LF= 7.8%; anti-LZ= 3.9%.

Conclusion. cANCA and pANCA are reacted with diverse cytoplasmic antigens of the neutrophils. Antibodies to PR3 and MPO are not common in sera from patients with SLE and RA. Sera from patients with SLE contain more anti-LF and anti-LZ antibodies than anti-PR3 and anti-MPO antibodies. Rabbits anti-MPO and anti-LF antiserum both showed pANCA staining pattern and anti-HMG 1&2 showed a cANCA staining pattern in indirect immunofluorescence.

第一章 前言

嗜中性白血球細胞質抗體(Anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)是指一群對抗嗜中性顆粒球(Neutrophil granulocytes)及單核球(Monocytes)的細胞質成份的抗體[1]。起初於1982年由Davies [2]和Hall [3]從分節的壞死性腎絲球腎炎(Segmental necrotizing glomerulonephritis)的疾病中覓得，到1985年Van der Woude[4]提出韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis, WG)和ANCA有所關聯。自此，ANCA抗原特異性與疾病之間的關聯，開始大量被研究[5-7]，而ANCA檢驗的運用，使得各種血管炎得以診斷與治療[8]，對各種血管炎的分類和臨床診斷極富價值[9]。

使用間接免疫螢光方法(Indirect immunofluorescence test, IIF)檢查ANCA，於螢光顯微鏡下呈現之型式可分為三種，第一種為細胞質(Cytoplasmic ANCA, classic ANCA, cANCA)型式，此種型式通常與韋格納氏肉芽腫病及較少部分的顯微鏡下的多血管炎(Microscopic polyangiitis, MPA)有關聯。第二種為核周圍ANCA(Perinuclear ANCA, pANCA)型式，通常與器官-界限血管炎(Organ-limited vasculitis)、特殊的新月形(Particular crescentic)或快速進行性腎絲球腎炎(Rapidly progressive glomerulonephritis)、丘-史特勞斯氏症候群(Churg-Strauss syndrome)有關。第三種為發炎性腸道疾病ANCA (Inflammatory bowel disease ANCA)或稱非典型ANCA (Atypical ANCA, xANCA)呈現暴風雪(Snowdrift, snow-storm)型式[5,10]與潰瘍性結腸炎(Ulcerative colitis)及原發性硬化性膽道炎(Primary sclerosing cholangitis)有關。

與cANCA有關的主要抗原為Proteinase 3 (PR3)[5-6,11-12,13-15]。cANCA的效價，隨著病程緩解而下降，而於疾病復發時，效價

亦隨之增加，所以 cANCA 通常用來監測韋格納氏肉芽腫病病人的疾病活性(Disease activity)[16-17]。pANCA 的主要目標抗原為 Myeloperoxidase (MPO)[7,11,17-19,20-22]，但也和 Human leukocyte elastase (HLE)，Lactoferrin (LF)等有關。腎絲球腎炎(Glomerulonephritis)的病人，將近 90% pANCA 陽性的血清與 MPO 反應，其它非腎絲球腎炎的疾病也會出現 pANCA，但甚少與 MPO 反應[18-19]，pANCA 對臨床疾病並無專一性，但在很多疾病中出現，如全身性紅斑性狼瘡(Systemic lupus erythematosus, SLE)[12,23-34]、風濕病(Rheumatic disease)[11,25]。這些疾病的目標抗原通常不是很清楚，可能是 LF、HLE 及 Lysozyme (LZ) [26]，此點顯示 pANCA 的目標抗原不單只有 MPO，尚有其他抗原[4,27]。與 cANCA 不同，pANCA 效價對疾病活性監測並無幫助[11]。既然 pANCA、cANCA 此二種螢光型態的目標抗原包含數種，如 MPO、PR3、LF 等等，因此本篇論文想找出不同的自體免疫疾病[如全身性紅斑性狼瘡、類風濕性關節炎(Rheumatoid arthritis, RA)]與血管炎病人，其所對抗的 ANCA 專一性抗原為何，以及 ANCA 抗體出現的比例情形。

第二章 研究背景

第一節 血管炎之命名與 ANCA 有關之血管炎分類

1-1 血管炎之命名

**Names and definitions of vasculitides adopted by the Chapel Hill
Consensus Conference on the Nomenclature of Systemic Vasculitis**

Large vessel vasculitis

Giant cell (temporal) arteritis

Takayasu arteritis

Medium-sized vessel vasculitis

Polyarteritis nodosa (classic polyarteritis nodosa)

Kawasaki disease

Small vessel vasculitis

Wegener's granulomatosis

Churg-Strauss syndrome

Microscopic polyangiitis

Henoch-Schönlein purpura

Essential cryoglobulinemic vasculitis

Cutaneous leukocytoclastic angiitis

(摘錄自 Arthritis & Rheumatism 1994, Vol. 37, p187-192)

1-2 與 ANCA 有關之血管炎簡介

1. 丘-史特勞斯氏症候群(Churg-Strauss syndrome, CSS)

丘-史特勞斯氏症候群為一全身性血管炎(Systemic vasculitis)，具有氣喘(Asthma)，嗜伊紅球增加(Hypereosinophilia)及多動脈炎(Polyarteritis)的特性，另外可能出現新月形的腎絲球腎炎(Crescentic glomerulonephritis)或呼吸道的肉芽腫性發炎(Granulomatous inflammation)，此種壞死性血管炎(Necrotizing vasculitis)影響小至中型的血管，CSS 與 pANCA/anti-MPO 抗體有關，報告指出 70~75% 的病人為陽性[9,13]。

2. 顯微鏡下的多血管炎(Microscopic polyangiitis, MPA)

顯微鏡下的多血管炎為一種中或小型肌肉動脈(Muscular arteries)的血管炎，其特徵為不具有或只有非常少量的免疫沉澱物的壞死性血管炎(Necrotizing vasculitis)，影響小血管(如微血管、小靜脈、微小動脈)。壞死性腎絲球腎炎(Necrotizing glomerulonephritis)非常少見，而肺微血管炎(Pulmonary capillaritis)則常見[9,28]，臨床症狀如震顫、體重流失、發燒、肌肉衰弱、關節炎、皮膚裂損及神經炎等。大部分 MPA 的病人(90%)為 ANCA 陽性，其中對抗的抗原可能是 PR3 或 MPO [9,13,29]，但尚未有報告指出效價與疾病活性之間的關係。

3. 韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis, WG)

韋格納氏肉芽腫病包括呼吸道的肉芽腫性發炎(Granulomatous infla-

mmation)，此種壞死性血管炎(Necrotizing vasculitis)影響小至中型血管(如微血管、小靜脈、微小動脈)，常見壞死性腎絲球腎炎(Necrotizing glomerulonephritis)。具有區域性的徵候(Inactive initial phase)的病人，50%為 cANCA 陽性，而經免疫抑制治療後完全緩解的病人，大多為 ANCA 陰性，在急性擴散期(Active generalized phase)的病人幾乎 100% 有 cANCA/PR3 ANCA[30]。

4. 結締組織疾病(Connective tissue disease)

全身性紅斑性狼瘡病人中，有對抗 MPO、HLE、LF 的抗體[13,26]。此外 Anti-LF 抗體與類風濕性關節炎(Rheumatoid arthritis)中的血管炎(Vasculitides)及費爾提氏症候群(Felty's syndrom)[13]有關。報告指出 ANCA 的發生率有多種不同數據，而且似乎與疾病種類無關，ANCA 在這些疾病可能是次發的現象，對臨床診斷並不是很有幫助。

5. 發炎性腸道及肝膽疾病(Inflammatory bowel and hepatobiliary disease)

自從 ANCA 在發炎性腸道疾病(Inflammatory bowel disease)，如潰瘍性結腸炎(Ulcerative colitis)及原發性硬化性膽道炎(Primary sclerosing cholangitis)發現後，立刻引發 ANCA 在腸胃界(Gastrointestinal field)科學家的鑽研[31-32]，而 Cathepsin-G 和 β -glucuronidase 皆可能是目標抗原。ANCA 在潰瘍性結腸炎的發生率為 50~80%，而在克隆氏病(Crohn's disease)的發生率為 10~40%[13]。除此之外，ANCA 亦在 60~70%慢性活動性肝炎(Chronic active hepatitis)

的病人及 35% 原發性膽汁性硬化(Primary biliary cirrhosis)的病人中發現，雖然 ANCA 對這些胃腸病的病人分類很有幫助，但卻不是最有用的診斷試驗。

6. 結節性多動脈炎(Polyarteritis nodosa, PAN)

結節性多動脈炎此種壞死性血管炎(Necrotizing vasculitis)影響中型或較小動脈的壞死性發炎(Necrotizing inflammation)，不包括腎絲球腎炎，亦沒有微小動脈、小靜脈或微血管的血管炎[9,28]，小於 20% 的病人與 pANCA 有關，但 pANCA 實質發生率仍有待進一步研究。

第二節 ANCA 特異性抗原

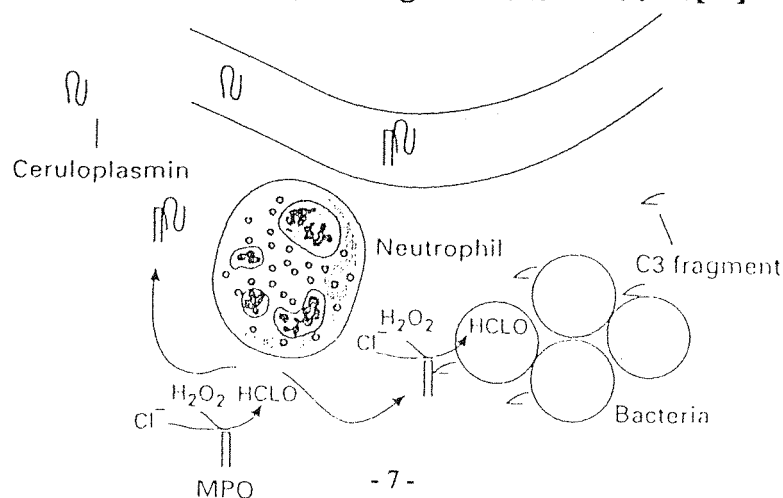
血液中的顆粒球以嗜中性白血球(Polymorphonuclear leukocytes, neutrophils)佔絕大多數，它具有高量的顆粒成分，顆粒裡面含有多量的酵素，可抵禦細菌的入侵，但亦會造成組織的傷害。這些酵素包括殺菌酵素(Microbicidal enzymes)(如 MPO 及 LZ)，中性蛋白酶(如 HLE)，酸性水解酶(如 Cathepsin-G, CaG)[26]。於吞噬微生物期間，顆粒會不見，一部份與吞噬體(Phagosomes)融合，一部份以胞泌方式進行釋出、去顆粒作用(Exocytosis, degranulation)。

嗜中性白血球之顆粒可區分為 (I)初級顆粒(Primary, alpha,

azurophilic granules) (II)次級顆粒(Secondary, specific granules)。初級顆粒所含的主要蛋白質包括 Myeloperoxidase (MPO)、Serine protease、Human leukocytes elastase (HLE)、Cathepsin-G (CaG)及 Proteinase 3 (PR3)，而次級顆粒含有 Lysozyme (LZ)、Lactoferrin (LF)及 Vitamin B12-binding protein[6,26]。單核球(Monocytes)亦含有類似的顆粒，其中 MPO、PR3、HLE、LF、CaG 及 Cationic protein 57 (CAP-57)均已確認為 ANCA 之目標抗原[33]。

2-1 Myeloperoxidase (MPO)之正常生理功能

多形核顆粒球(Polymorphonuclear granulocytes, PMNs)活化時，MPO 主要生理功能在吞噬溶小體區間(Phagolysosomal compartment)產生含氯氧化物(Chlorinated oxygen species)，釋放至周圍組織[20,34]。其過程如下：在未發炎組織中如血流，藍胞漿素(Ceruloplasmin)藉生理性的交互作用而抑制 MPO[35]，但在發炎的部位，MPO 從侵潤的嗜中性白血球中釋放，在有過氧化氫(Hydrogen peroxide, H_2O_2)的存在下，催化毒性氧化物(Toxic oxidants)的產生[6]。Active MPO 分子黏附至吸附(Coated) C3 fragments 的微生物表面，此時 MPO 會與 C3 fragments 交互作用，但此交互作用並不影響 MPO 催化能力，而使得 MPO 活性直接作用於已吸附 C3 fragments 微生物的表面[20]。



(摘錄自 Clin. Exp. Immunol. 1997, Vol. 108, p167-174)

2-2 Proteinase 3 (PR3)之正常生理功能:

Proteinase 3 包含了共通的三個催化基團(Conserved triad of catalytic residues)包括 Ser-195、His-57 及 Asp-102, 活化位置(Active-site) 絲胺酸(Serine)具有親核的特性(Nucleophilic)。

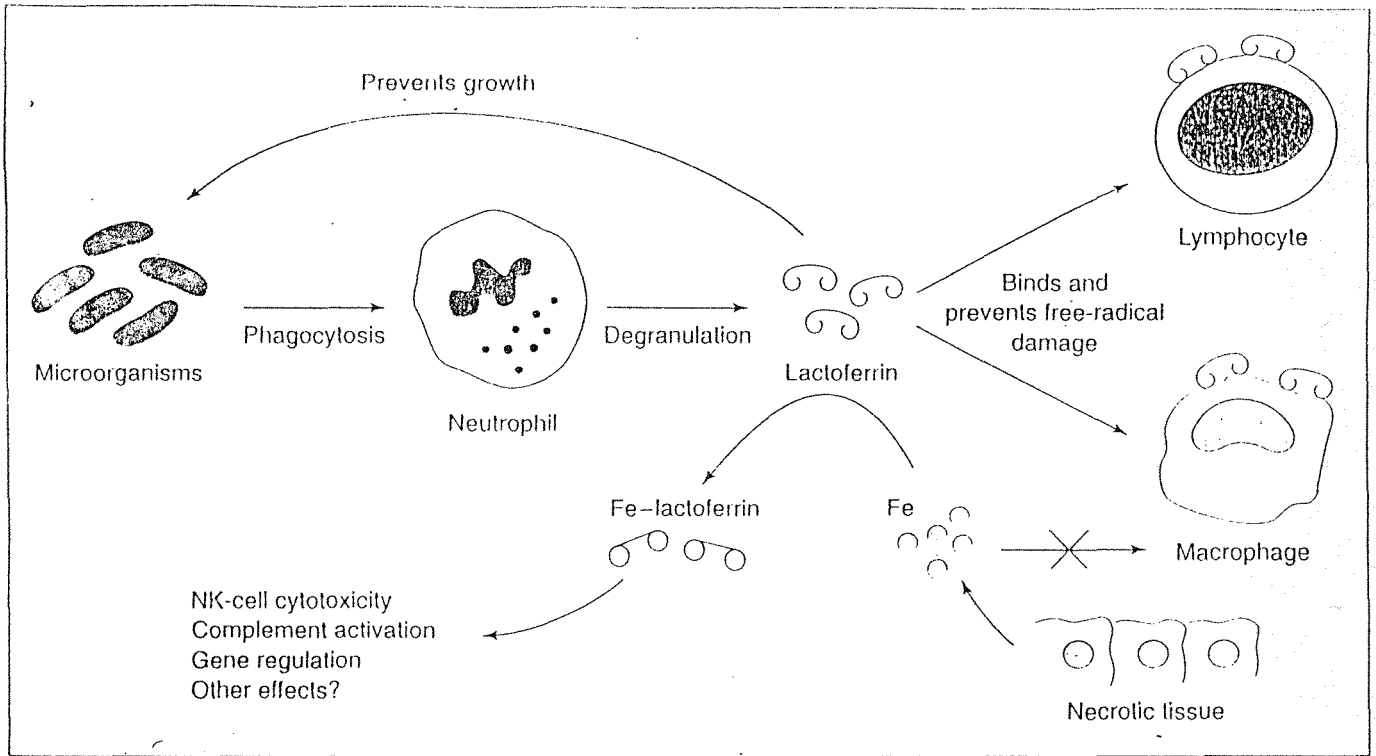
PR3 存於嗜中性白血球的初級顆粒，對吞噬及防禦外來微生物的感染極為重要，利用蛋白切割活性(Proteolytic activity)破壞外來入侵者。PR3 能使彈力蛋白(Elastin)分解，相較於 HLE 及 CaG，PR3 更易使倉鼠(Hamsters)產生肺氣腫，暗示可能誘發腎絲球傷害[36]。等電點(Iso electric point)為 9.1 能與腎絲球基底膜(Glomerular basement membrane, GBM)交互作用，可和特異的絲胺酸蛋白酶抑制劑(Specific serine protease inhibitor)如 Affinity-labeled diisopropylfluorophosphate (DFP)、phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)、3,4-dichloroisocoumarin 結合的特性，暗示其為 serine protease[28]。

在正常生理情況下，可藉由區隔作用(Compartmentalization)或者天然的血漿蛋白酶抑制劑(Natural circulating plasma protease inhibitor)加以調節，假如控制不當，PR3 能破壞許多結締組織蛋白。當 PR3 到達血液循環，能快速和天然抑制劑(Natural inhibitors) α_1 -protease inhibitor (α_1 -antitrypsin)及 α_2 -macroglobulin 形成複合物，此複合物藉由肝臟及巨噬細胞由血漿中清除，然後進行分解。

不平衡(Imbalance)可能由於 α_1 -protease inhibitor 缺陷或者 PR3 出現異常高濃度，此時可能出現嚴重的組織傷害。嗜中性白血球之 PR3 與肺氣腫(Pulmonary emphysema)、急性呼吸窘迫症候群(Acute respiratory distress syndrome)、肺休克(Shocked lung)、腎絲球腎炎(Glomerulonephritis)、類風濕性關節炎(Rheumatoid arthritis)及其它發炎性疾病(Other inflammatory disorders)有關。

2-3 Lactoferrin (LF)之正常生理功能

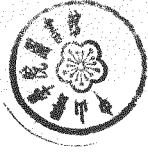
Lactoferrin 在血清的濃度含量低，於牛奶及粘液分泌物中濃度高[37]，具有抗微生物及抗發炎的功能，LF 可從血液中快速清除，主要由肝臟攝入[38]。除此之外，LF 由於胺基端含鹼性區域(Basic region)，所以可和酸性的細胞表面分子結合，因此可和淋巴球、吞噬細胞交互作用，避免這些細胞遭受由損傷組織所釋放，然後經鐵調節而生成的自由基破壞。當 LF 與鐵結合，能使 LF 本身對蛋白分解具抗性，也使得微生物鐵的可用量減少，因此在發炎的情況下，循環中的 LF 進行螯合(Chelation)而造成低鐵血症(Hyposideraemia)[39]。穩定的 LF-鐵複合物，能轉錄調控某些與對抗感染有關的基因，亦可調控其它抗感染分子如 NK cells 毒殺作用。Anti-LF 抗體能抑制由 LF 所調節，防止氫氧自由基(Hydroxyl radical, OH)之生成的抗發炎作用，因此對抗 LF 的自體抗體可能會造成慢性發炎[40]，可於血管炎、潰瘍性結腸炎、活動性關節炎(Reactive arthritis)等疾病中出現[41]。



(摘錄自 J. Exp. Med. 1974, Vol. 140, p1068-1084)

2-4 High mobility group 1&2 (HMG 1&2)之正常生理功能

HMG 1 與 HMG 2 皆是帶正電荷(Positive charged)蛋白，精胺酸(Arginine)加離胺酸(Lysine)的比例分別為 23.8%及 23.6%，由於帶陽性電荷，因此可和帶陰性電荷之核膜結合，屬於 non-histone chromosomal proteins，HMG 1 能刺激轉錄作用；HMG 2 可刺激細胞分裂，其功能為一種轉錄因子(transcription factors)[42]。



2-5 Lysozyme (LZ)之正常生理功能

溶菌酶出現於眼淚、鼻黏液、痰、胃分泌液、奶汁及蛋清中，分子量大約為 14.5 kDa，藉由分解細菌細胞壁之多醣成分(polysaccharide)，可摧毀空氣中革蘭氏陽性菌(Gram positive bacteria)。溶菌酶可催化蛋白多醣(proteoglycan)及葡萄糖胺聚醣(glucosaminoglycan)內 N-乙酰神經胺酸(N-acetyl neuraminic acid)的 β -1,4-鍵結的水解反應。

第三節 ANCA patterns 與 Antigen specificity 及 Disease 之間的關聯

目前已知 ANCA 間接免疫螢光表現型態與各種 ANCA 抗原及疾病之間的關聯，如下表：

IIF pattern	Target Antigen	Associated Disease
pANCA	Myeloperoxidase	Churg-Strauss Syndrome(CSS) Microscopic Polyangiitis (MPA)
	Lactoferrin	Lupus Erythematosus(SLE)
	Unknown antigens	Rheumatoid Arthritis(RA)
	Unknown antigens	Chronic Hepatitis
cANCA	Proteinase3	Wegener's Granulomatosis Microscopic Polyangiitis
	Unknown antigens	HIV
xANCA	Lactoferrin Cathepsin-G	Crohn's Disease Ulcerative Colitis

(摘錄自 J. Formos. Med. Assoc. 1994, Vol. 93, p545~561)

和 cANCA 有關的抗原最主要為 PR3[5,6]，cANCA 陽性血清與含有 PR3 抗體的韋格納氏肉芽腫病，及其他型式的全身性血管炎(Systemic vasculitis)的病人之間有高度關連，但此種相關並非 100%，在大多數狀況下，抗體結合至 PR3，將導致酵素活性喪失。

大多數 pANCA 陽性血清會和 MPO 反應但其它和 HLE、CaG、LF 及 LZ 反應的抗體，亦會表現 pANCA。Anti-MPO ANCA 確實與丘-史特勞斯氏症候群、原發性壞死性血管炎(Primary necrotizing vasculitides)、藥物誘發狼瘡(Drug-induced lupus)及藥物誘發血管炎有關連 [11,17-19,20]。而實驗發現抗體結合至 MPO，並不會干擾 MPO 酵素活性。

Lactoferrin-ANCA 與 Cathepsin G-ANCA 於 Crohn's Disease、Ulcerative Colitis 等疾病中出現。30 % SLE 病人尤其是盤狀紅斑性狼瘡病人(Discoid LE)表現 pANCA，其抗原乃是對抗嗜中性白血球之特異性顆粒蛋白 p28(Specific granule protein p28)，另外 10 % SLE 病人，擁有 ANCA 直接對抗嗜中性白血球之次級顆粒的 25 kDa Neutrophil gelatinase-associated lipocalin。RA 病人具有對抗嗜中性白血球蛋白的 66/67 kDa doublet 及 54/63 kDa doublet 之未知抗原的抗體，需進一步進行 ANCA 特異性(Specificities)之研究以揭開其臨床意義。HIV 感染的病人，有時會表現 pANCA 或 cANCA，但目標抗原仍未知。

第四節 ANCA 臨床檢驗之判讀

使用間接免疫螢光方法檢查 ANCA，於螢光顯微鏡下呈現之型式可分成四種：

- (1). Cytoplasmic ANCA (cANCA): ①細胞質可見顆粒染色(Granular staining)，且核葉處(Nuclear areas)有相對空白(Relative sparing)②抗原大部分為位於 α 顆粒的 29 kDa serine proteinase (PR3)。
- (2). Perinuclear ANCA (pANCA): ①核葉處具有均質染色(Homogeneous staining)通常在核周圍(perinuclear)處有加強的情形②抗原通常為 myeloperoxidase，其它尚有 LF、LZ、CaG 等等。
- (3). Atypical ANCA (xANCA, aANCA): ①通常於細胞質呈現雪花狀螢光②抗原通常為 LF、CaG 等等。
- (4). Negative reaction:不具有特異性染色。

一般認為 pANCA 與 ANA 不易區分[65]，因 MPO 之 PI 大約為 10，屬於鹼性(Basic)蛋白，而 HLE、LF、HMG 1&2 也多屬於鹼性蛋白，所以易被吸引至帶負電荷(Negative charged)DNA 處[21]，再由於細胞離心製備之脫水造成膜的通透性增加，使得可溶顆粒成分之釋出及經再水化(Rehydrated)製備時如固定液，使得帶正電荷(Positively charged)蛋白質轉位至核，產生核周圍型態，易和 ANA 混淆，為防止此種轉位，可用福馬林固定，藉由共價交叉連結(Cross-linking)而使得蛋白無法移動，因此 pANCA 與 ANA 之區別可用福馬林固定細胞(Formalin-fixed cell)前者於細胞質染色，而後者於細胞核染色[12]；另外，ANCA 效價必須高於 ANA 二個稀釋梯度才算陽性。發炎腸道(Inflammatory bowel)或非典型(Atypical) ANCA，80%於潰瘍性結腸炎的病人發現[41]，70%於原發性硬化性膽道炎的病人發現[41]。

相關的抗原仍未知，此種抗體所產生的 pANCA pattern，於乙醇固定的人類嗜中性白血球具有非常明顯的核緣(Nuclear rim)染色，此種抗體可與真實 pANCA 區別，因其在福馬林固定的人類嗜中性白血球不具反應性，但一些報告指出此種抗體於福馬林固定的人類嗜中性白血球，具有細胞質型態的染色，但是比起由 myeloperoxidase 所調節的 pANCA 顯然有較少的顆粒；抗粒線體抗體(Anti-mitochondrial Ab)於嗜中性白血球並不會出現，不會交叉反應(Crossreactivity)；但平滑肌(Smooth muscle)或其他收縮蛋白，會造成細胞質的均質型態(Homogeneous pattern)，與韋格納氏肉芽腫病的典型顆粒細胞質染色(Typical granular cytoplasmic staining)並不會混淆[64-65]。

一些感染及有增生情況之病人，於間接免疫螢光會出現類似 ANCA 反應(ANCA-like reactivity)，而且經熱處理所造成 IgG 聚集或免疫複合物，可能增加非典型 ANCA 反應(Atypical ANCA-like reactions)之出現，顯示單有間接免疫螢光技術並不足以證實 ANCA 的存在[72]。

cANCA 偽陽性(False positive)非常少見，Gross et al.,[5] 指出 cANCA 常於很難歸類的徵候群中發現，如竇炎(Sinusitis)、上鞏膜炎(Episcleritis)、腎絲球腎炎(Glomerulonephritis)，往往只呈現韋格納氏肉芽腫病之單一症候。cANCA 亦在感染疾病如人類免疫缺陷病毒(HIV)感染、肺炎、惡性疾病中找到，但是此結果只有非常少數人的報告，而且所描述的 cANCA 螢光型式是並未根據 1st International Workshop on ANCA 的標準方法。

第五節 ANCA 之臨床診斷意義

韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis, WG)首先被提及與 PR3-ANCA 有關[30,43]。過去韋格納氏肉芽腫病的診斷乃根據臨床表徵與活體切片的發現，但由於韋格納氏肉芽腫病被視為是一種極少的疾病，若僅依靠單一切片的組織學檢查，這樣的診斷非常勉強也不精確。而現今結合免疫螢光的 cANCA 偵測與 PR3-ANCA ELISA 方法能快速而正確診斷韋格納氏肉芽腫病，以掌握治療時機[44-45]，使患者腎臟機能仍得以回復，避免因診斷錯誤而延誤病情，導致洗腎的命運。因此結合 cANCA 與 PR3-ANCA ELISA 偵測對韋格納氏肉芽腫病的診斷極富價值，其特异性高達(Specificity) 86~100%，敏感性高達(Sensitivity) 78~96%。

除了韋格納氏肉芽腫病，尚有其它血管炎亦與 ANCA 有關，如顯微鏡下的多血管炎(MPA)，此種多血管炎(MPA)大多被提及為 MPO-ANCA 陽性(70%)只有少數 PR3-ANCA 陽性[9,29]。

自發性(Idiopathic form)及全身性臨床徵候(Systemic clinical picture)二種型式的快速進行性腎絲球腎炎(Rapidly progressive glomerulonephritis, RPGN)大約有 70%的病人有 MPO-ANCA，此與 ANCA 有關的快速進行性腎絲球腎炎由於免疫組織學為陰性，所以被描記為缺免疫沉澱物壞死性血管炎(Pauci-immune necrotizing vasculitis)，其它型式的壞死性血管炎可能是免疫複合物調節(Immune complex mediated) (15-50%)或腎絲球基底膜抗體調節(Antibasement membrane antibody-mediated) (2-20%)，此二種與 ANCA 無關，因此 ANCA 本身不僅可幫助血管炎的鑑定，亦可幫助壞死性血管炎種類的區分。

第六節 ANCA 之致病機轉

韋格納氏肉芽腫病與 PR3 抗體濃度之間的密切關係，暗示此種自體免疫反應的致病生理角色。cANCA 的 IgG 亞群(IgG subclass)分佈以 IgG4 亞群抗體出現率最高(濃度亦相對增加)，伴隨整個 IgG4 及 IgE 濃度上升與只侷限於 IgG1 及 IgG3 之抗核抗體(Antinuclear antibodies)比較[46]，暗示此種 T-cell 依賴免疫反應中存在著重複抗原的刺激，可能有外來抗原(Exogenous antigens)如交叉反應的微生物抗原(Microbial antigens)參與此過程，但卻未偵測到。在韋格納氏肉芽腫病中，一般認為疾病的發生通常與感染或先前之感染有關，尤其是上呼吸道的感染，co-trimoxazol 能防止韋格納氏肉芽腫病復發的效力，亦暗示微生物因子的存在而誘發疾病活性。

目前文獻提出之假設機轉，歸納如下：

(I) 在體內(In vivo)，嗜中性白血球-蛋白酶(Protease) (ANCA 目標抗原)轉位並表現在經細胞激素活化的嗜中性白血球的細胞表面[47-48]，因此嗜中性白血球成為自體免疫反應的抗原，細胞激素[49-50]亦能誘發內皮細胞上吸附分子(Adhesion molecules)的表現，透過吸附分子(LFA-1, ICAM-1)[51-52]，嗜中性白血球吸附至經細胞激素活化的內皮細胞，ANCA 結合至嗜中性白血球[53]，活化嗜中性白血球，產生呼吸猝發(Respiratory burst)結果，誘發去顆粒(Degranulation)及具毒性的氧自由基(Toxic oxygen radicals)生成[54]，隨後使內皮細胞破壞誘發血管損傷[55]。

(II) 蛋白酶表現在內皮細胞膜表面，ANCA 直接結合至內皮細胞，隨後成為自體免疫反應的直接目標，因此內皮細胞損傷，血管壁的破壞[56]。

(III) 活化的嗜中性白血球釋出蛋白酶進入血管內間隙，結合至內皮細胞膜表面，使得內皮細胞膜成為自體免疫反應的直接目標[57]。

第三章 材料與方法

第一節 血清來源

本實驗使用之血清，包括 40 支正常血清及經過臨床風濕病專科醫師確立診斷具自體免疫疾病病人之血清共 290 支，包括全身性紅斑性狼瘡(SLE) 110 支血清、類風濕性關節炎(RA) 51 支血清、重複口腔潰瘍(ROU) 10 支血清、修格連氏徵候群(SS) 25 支血清、原發性膽汁性硬化(PBC) 8 支血清、多肌炎(PM) 11 支血清、抗中節抗體陽性(ACA) 54 支血清、核點狀抗體陽性(Nuclear dot) 21 支血清。以及 160 支懷疑有血管炎而欲進行 ANCA 檢驗之連續檢體。

第二節 實驗方法

一. 細胞培養

來自 ATCC CCL-240 之 HL-60(Promyelocytic leukemia cells)細胞株，培養在含 20% fetal calf serum(胎牛血清)、1% Antibiotic Antimycotic 及 1% PSN Antibiotic Mixture 之 RPMI 1640 培養液中[58]，於 37°C，5%CO₂之培養箱培養。此細胞 doubling 時間約需 48~72 小時。利用相位差顯微鏡觀察細胞生長情形，若長滿則直接分裝至其它 flasks，若尚未長滿則繼續培養。當細胞培養大量後，全部收集至無菌離心管內，以 1500rpm 離心 10 分鐘，之後取細胞沉澱直接 suspend 在不含胎牛血清的 RPMI 1640 培養液中，混合均勻後取一滴於計算盤計算數目。另外取 3x10⁵ 細胞置於新的 flask，加入 1.25% Dimethyl

sulfoxide (DMSO)[58]於含胎牛血清及抗生素之 RPMI 1640 培養液，於 37°C，5% CO₂ 培養 48 小時，之後收取細胞，於 1500rpm 離心 10 分鐘，取沉澱直接 suspend 在不含胎牛血清的 RPMI 1640 培養液中，滴一滴於計算盤計算數目。

二. 從全血中分離嗜中性白血球

A. Ficoll-paque 法

全血抽出後，以肝素作抗凝固劑，1200rpm 室溫離心 10 分鐘，取血球部分，加入等量的 2% dextran，混合後靜置室溫 25 分鐘，取上清液，輕輕加至等量的 Ficoll-Paque 上[59]，2000rpm 室溫離心 25 分鐘，之後可見明顯四層，由上而下分別為 dextran、mononuclearcyte、Ficoll-paque、白血球與紅血球，取紅、白血球混合層，加入等量之冰水，均勻混合，加入等量 10 倍濃縮 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)，均勻混合，1500rpm 室溫離心 10 分鐘，取一滴至玻片觀察，若無紅血球則直接 suspend 在原倍 HBSS；若尚有紅血球，則重複上述二步驟，直到沒有紅血球出現為止，最後以計算盤計算數目。

B. Histopaque 法

首先加入 3ml Histopaque-119 於 15ml 離心管，之後加入 3ml

Histopaque-1077 於 Histopaque-119 之上層 [60]，並小心加入以肝素作抗凝固劑之全血 6ml 於上述 gradient 之上層，700g 室溫離心 30 分鐘，結果由上而下可分四層，中間不透明層分別為單核球(Monoclear cells)及顆粒球(Granulocytes)，僅將顆粒球吸出，放入另一支試管，加入等量之冰水均勻混合，加入等量 10 倍濃縮 HBSS，均勻混合，200g 離心 10 分鐘，將上清液移除，取一滴至玻片觀察，若無紅血球則直接 suspend 在原倍 HBSS；若尚有紅血球，則重複上述二步驟，直至沒有紅血球為止，以計算盤計算數目。

三. 抗原之製備

取嗜中性白血球 2×10^8 個或 HL-60 細胞 2×10^9 個懸浮(suspend)在 PBS 溶液中，加入含 5mM PMSF 之 1M NaCl，超音波振盪(Sonicated) 3 次，每次 10 秒，10000g 4°C 離心 10 分鐘 [25]，取上清液裝入透析膜中，覆蓋 Polyethylene Glycol 6000 (PEG 6000)濃縮，之後加入等量之 Laemmli sample buffer (LSB)，沸水煮 5 分鐘，-20°C 冷凍備用。

四. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

組合電泳器具，製備 10%~15% running gel (29.2g acryl: 0.8g bis,

1.5M Tris pH 8.6, d-H₂O, 20% SDS, 10% AP, TEMED), 製備 5% stacking gel (29.2g acryl: 0.8g bis, 0.5M Tris pH 6.8, d-H₂O, 20% SDS, 10% AP, TEMED), Loading running gel 至槽的八分滿, 用 Isobutyl alcohol 壓平並去除氣泡, 水平靜置 40 分鐘待凝膠後, 以 d-H₂O 移去 Isobutyl alcohol。Loading stacking gel 至全滿, 馬上插入 comb, 水平靜置 10 分鐘待凝膠後, 取出 comb, 製備檢體, 取所須之量加 sample buffer, 沸水煮 5 分鐘, 將 running buffer 加於 chamber 中, loading 檢體及蛋白質分子量標準液, 120 伏特通電 1.5 小時, 直到染料完全跑到電泳槽之電解液中, 即完成電泳[61]。

五. 轉漬(Transfer)

將醋酸纖維膜、濾紙及 gel 浸泡在 transfer buffer 中, 由負極至正極分別擺上棉塊、濾紙、膠、醋酸纖維膜、濾紙、棉塊, 0.23 安培, 4 °C transfer 1 小時[61]。

六. Western Blot

將醋酸纖維膜取出, 切割成 13 長條, 浸泡在 5% 脫脂奶粉之 PBS 溶液中, 搖晃 30 分鐘, 此時將 4μl 正常或病人血清加入 400μl 含 5% 脫脂牛奶的 PBS 溶液中(稀釋 100 倍), 然後將一條條醋酸纖維膜取出

排於 paraffin 上，加入經稀釋的檢體至醋酸纖維膜，保持濕潤狀態，室溫 1.5 小時，以 PBS-Tween 清洗 10 分鐘，共三次。將一條條醋酸纖維膜取出排於 paraffin 上，加入接有鹼性磷酸酶之山羊對抗人類免疫球蛋白之二次抗體，保持濕潤狀態，室溫 1 小時，以 PBS-Tween 清洗 30 分鐘，共六次。呈色，加 100 μ l BCIP 及 100 μ l NBT substrates 於 substrate buffer 中，看到清楚的 band，即用 d-H₂O 清洗以終止反應 [61]。

七. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

A. 市售 Kit (INOVA, QUANTA™ PR3 IgG ELISA, 870233 ; INOVA, QUANTA™ MPO IgG ELISA, 870252)

分析前，先將所有試劑回溫，將 25 ml HRP wash concentrate 加入 975 ml 蒸餾水或去離子水，檢體先稀釋 101 倍 (500ul HRP sample diluent 加 5 μ l 血清)，各加 100 μ l low positive、high positive、negative control、檢體至不同的 wells，加蓋，室溫 30 分鐘(從加入最後檢體算起)。清洗，將 wells 裡的東西完全吸盡，加入 200~300 μ l HRP wash buffer 至每個 well，然後吸掉，重複此動作三次，倒轉 plate 用吸水紙吸去多餘液體，直到完全吸乾，加 100 μ l HRP conjugate 至每個 wells，室溫 30 分鐘。清洗，同上之清洗步驟，加 100 μ l TMB chromogen 至每個 wells，置於黑暗中，室溫 30 分鐘，加 100 μ l HRP stop solution 至每個 wells，

均勻輕盈混合，在 1 小時內，以波長 450nm 判讀吸光值，參考波長 620 nm。

計算

$$\text{Sample ratio (Units)} = \frac{\text{Sample OD}}{\text{ELISA Low positive OD}} \times \text{ELISA Low positive Units}$$

B. 自行製備法

抗原 LF、LZ 2 μ g/100 μ l/well 或 HMG 1&2 1 μ g/100 μ l/well 進行 Pre-coating，保持潤濕 4 $^{\circ}$ C 隔夜，使用 gelatin 進行 Post-coating 200 μ l，保持潤濕 4 $^{\circ}$ C 隔夜。清洗，將 wells 裡的東西完全吸盡，加入 200~300 μ l d-H₂O 至每個 well，然後吸掉，重複此動作二次，倒轉 plate 用吸水紙吸去多餘液體，直到完全吸乾，檢體先稀釋 201 倍 (500 μ l BGG diluent 加 2.5 μ l 血清)，加入經稀釋的檢體 200 μ l 至不同的 wells，每個檢體做二個 wells，保持濕潤狀態，37 $^{\circ}$ C 1.5 小時，清洗三次，同上述之清洗步驟加入經 1000 倍稀釋，接有過氧化酶之山羊對抗人類免疫球蛋白之二次抗體 200 μ l，保持濕潤狀態，37 $^{\circ}$ C 1 小時，清洗六次，同上述之清洗步驟。呈色，加 3ml ABTs 及 1% H₂O₂ 150 μ l 至 27ml McIlvain's buffer，以波長 410 判讀吸光值，最終判讀時間 1.5 小時。結果判讀 Positive > normal mean + 2SD [62]。

八. HL-60 cells 進行 cytopsin 之製備流程

玻片浸泡 Poly-L-Lysine (cell adhesion solution) 或 Albumin 30 分鐘至 1 小時，晾乾，經標示後收於玻片盒中保存備用，用 PBS 調整 HL-60 cells 數目至 10^6 cells/ml，組裝 cytopsin 器具，將 0.5 ml 細胞置於 cytopsin 之漏斗 1500rpm 離心 5 分鐘，玻片取出後，以 95% Ethanol 0°C 5 分鐘固定或 0.5% Paraformaldehyde 室溫 20 分鐘固定，晾乾，玻片 4°C 保存備用 [63]。

九. Indirect Immunofluorescence (IIF)

檢體先稀釋 11 倍 (50 μl PBS 加 5 μl 血清)，加 50 μl 檢體於 slide well 中，保持濕潤狀態，室溫 30 分鐘，以 PBS 將檢體沖掉，搖晃清洗 10 分鐘，加入 50 μl 接有 FITC 之山羊對抗人類免疫球蛋白之二次抗體，保持濕潤狀態，室溫避光 30 分鐘，以 PBS 將抗體沖掉，搖晃清洗 10 分鐘，換上新的 PBS，加 counter stain (Evan blue) 於 PBS，搖晃 10 分鐘，換上新的 PBS，搖晃清洗 10 分鐘，重複上述步驟二次 [64]。

十. 兔子抗血清之製備

購買年齡 2 個月，體重 1 Kg 兔子，分別標記 MPO、LF 及 HMG，

先飼養一周適應環境，Bleeding 全血 25ml，得到正常兔血清，製備抗原

(1). MPO 51 μ g/ml 加於 600 μ l 無菌 PBS，然後加入 600 μ l complete adjuvant

(2). LF 400 μ g/80 μ l 加於 600 μ l 無菌 PBS，然後加入 600 μ l complete adjuvant

(3). HMG 1&2 300 μ g/300 μ l 加於 600 μ l 無菌 PBS，然後加入 600 μ l complete adjuvant，1:1 均勻混合乳化

皮下注射至兔子，三週後，Bleeding 全血 25ml，第一次免疫後抽血，製備抗原

(1). MPO 51 μ g/ml 加於 600 μ l 無菌 PBS，然後加入 600 μ l incomplete adjuvant

(2). LF 400 μ g/80 μ l 加於 600 μ l 無菌 PBS，然後加入 600 μ l incomplete adjuvant

(3). HMG 1&2 300 μ g/300 μ l 加於 600 μ l 無菌 PBS，然後加入 600 μ l incomplete adjuvant，1:1 均勻混合乳化

皮下注射至兔子，三週後，Bleeding 全血 25ml，第二次免疫後抽血，製備抗原

(1). MPO 51 μ g/ml 加於 600 μ l 無菌 PBS，然後加入 600 μ l incomplete adjuvant

(2). LF 400 μ g/80 μ l 加於 600 μ l 無菌 PBS，然後加入 600 μ l incomplete adjuvant

(3). HMG 1&2 300 μ g/300 μ l 加於 600 μ l 無菌 PBS，然後加入 600 μ l incomplete adjuvant，1:1 均勻混合乳化

皮下注射至兔子，三週後，Bleeding 全血 25ml，第三次免疫後第一次抽血。經一週後，Bleeding 全血 25ml，第三次免疫後第二次抽血。再經一週後，Bleeding 全血 25ml，第三次免疫後第三次抽血。再隔一週後，Bleeding 全血 25ml，第三次免疫後第四次抽血，全血離心後，取血清-80°C 冷凍保存[42]。

第四章 結果

一.從全血分離嗜中性白血球

本實驗室使用二種不同方法分離嗜中性白血球，第一種為 Ficoll-paque 方法，此方法先利用 dextran 沉降紅血球後，再利用 Ficoll-paque 比重介於白血球與單核球之間，經離心後能有效間隔在白血球與單核球間，而將白血球加以分離，吸出白血球層，以計算盤計算數目，此方法的回收率只有 20~30%。另一種為 Histo-paque 方法，利用 Histo-paque 1119 及 1077 二種不同比重之試劑。Histo-paque 1119 其比重介於紅血球與白血球之間，而 Histo-paque 1077 其比重介於白血球與單核球之間，經離心後 Histo-paque 1077 能有效間隔在白血球與單核球間，Histo-paque 1119 能有效間隔在紅血球與白血球之間，而將白血球加以分離，吸出白血球層，以計算盤計算數目，此方法的回收率為 60~70%。回收率之計算：實際拿到的白血球數目/本來預估能拿到的白血球數目 x100%，即為回收率。

二.兔子經 MPO、LF、HMG 1&2 免疫注射後之抗體表現

1.間接免疫螢光法分析

(1).經 MPO 免疫注射之兔子：以乙醇固定的嗜中性白血球當作受質，加入經 400 倍稀釋之兔子對抗 MPO 的抗血清，其螢光型式為核周圍(Perinuclear)，螢光集中在核周圍處，但核分葉處(Segment)亦有，均勻沿著核周圍【如圖 1A】。若改以福馬林固定的嗜中性白血球當作受質，同樣加入經 400 倍稀釋之兔子對抗 MPO 抗血清，其螢光會從核周圍處跑到細胞質，此為典型的 pANCA 特徵【如圖 1B】。

(2).經 LF 免疫注射之兔子: 以乙醇固定的嗜中性白血球當作受質, 加入經 400 倍稀釋之兔子對抗 LF 的抗血清, 其螢光型式為粗點狀 (Coarse speckled), 非常多點, 集中在核周圍處, 某些地方強某些地方不強, 通常只有一、二點強【如圖 2A】。若改以福馬林固定的嗜中性白血球當作受質, 同樣加入經 400 倍稀釋之兔子對抗 LF 抗血清, 其螢光亦會從核周圍處跑到細胞質, 但膜周圍(Perimembrane)處明顯, 跑至邊緣比 MPO 抗血清多, 在膜的地方不均勻, 一點一點連在一起, 或一段一段連在一起, 因此也是屬於 pANCA【如圖 2B】。

(3).經 HMG 1&2 免疫注射的兔子: 以乙醇固定的嗜中性白血球當作受質, 加入原倍之兔子對抗 HMG 1&2 的抗血清, 其螢光型式為點狀 (Speckled), 非常多點, 表現在細胞質【如圖 3A】。若改以福馬林固定的嗜中性白血球當作受質, 同樣加入原倍之兔子對抗 HMG 1&2 抗血清, 其螢光仍然表現在細胞質, 所以是屬於 cANCA【如圖 3B】。

2. 酵素連結免疫分析法分析

(1).經 MPO 免疫注射之兔子: 此兔子未經免疫注射前, 血清經 100 倍稀釋, 其吸光值為 0.781。經三次 MPO 免疫後, 此兔子抗血清經 100 倍稀釋, 其吸光值為 1.207, 經 1000 倍稀釋其吸光值為 0.843, 經 2000 倍稀釋其吸光值為 1.024, 因此判定此抗血清的效價為 >1000 倍【如表 1】。

(2).經 LF 免疫注射之兔子: 此兔子未經免疫注射前, 血清經 100 倍稀釋, 其吸光值為-0.084。經三次 LF 免疫後, 此兔子抗血清經 100 倍稀釋, 其吸光值為 3.004, 經 1000 倍稀釋其吸光值為 1.781, 經 2000 倍稀釋其吸光值為 0.990, 因此判定此抗血清的效價為>1000 倍【如表 1】。

(3).經 HMG 1&2 免疫注射之兔子: 此兔子未經免疫注射前, 血清經 100 倍稀釋, 其吸光值為 0.311。經三次 HMG 1&2 免疫後, 此兔子抗血清經 100 倍稀釋, 其吸光值為 2.257, 經 1000 倍稀釋其吸光值為 0.021, 經 2000 倍稀釋其吸光值為 0.023, 因此判定此抗血清的效價為 >100 倍【如表 1】。

3. 西方墨點法分析

(1).經 MPO 免疫注射之兔子: 以培養細胞 HL-60 cells 溶解產物 (Lysate) 當作受質, 跑 SDS-PAGE 後轉印至醋酸纖維膜(Nitrocellular paper, NC-paper)作西方墨點分析, MPO 抗血清會出現三條(Bands), 分別為 15, 59 及 89 kDa, 其中 15 kDa 為 MPO 之輕鏈, 而 59 kDa 為 MPO 的重鏈, 89 kDa 可能為 apo-pro MPO 即尚未切割之 MPO【如圖 8】。

(2).經 LF 免疫注射之兔子: 以純化的市售 LF 當作受質, 跑 SDS-PAGE 後轉印至醋酸纖維膜作西方墨點分析, LF 抗血清會出現二條帶 (Bands), 分別為 70 及 140 kDa, 其中 70 kDa 為 LF, 而 140 kDa 可能為 LF 雙體(Dimer)【如圖 10】。

(3).經 HMG 1&2 免疫注射之兔子: 以純化的市售 HMG 1&2 當作受質, 跑 SDS-PAGE 後轉印至醋酸纖維膜作西方墨點分析, HMG 1&2 抗血清會出現二條帶(Bands), 分別為 28 及 55 kDa, 其中 28 kDa 為 HMG 1&2, 而 55 kDa 可能為 HMG 1&2 雙體(Dimer)【如圖 12】。

三.連續收集 160 支血清之抗體表現

1.間接免疫螢光法分析

從 83 年至 87 年四年間, 共收集 160 支懷疑有血管炎之血清, 利用間接免疫螢光法篩檢是否具有嗜中性白血球細胞質抗體, 不管是以嗜中性白血球或 HL-60 cells 當作受質, 發現其中 81 支血清為陽性, 而 79 支血清為陰性。在 81 支陽性血清中, 60 支表現 pANCA 型式【如圖 4A,4B,5A,5B】而 21 支表現 cANCA 型式【如圖 6,7】。

2.間接免疫螢光為陽性之 81 支血清疾病之分類

81 支陽性血清中, 60 支為 pANCA 陽性, 21 支為 cANCA 陽性。其中 60 支 pANCA 陽性血清分別來自不同疾病, 以來自快速進行性腎絲球腎炎疾病者最多, 佔 17 支, 自體免疫疾病次之佔 11 支, 其餘急性呼吸窘迫症候群佔 8 支, 少數為腎臟合併肺部疾病佔 3 支, 其它佔 21 支, 又 21 支中有 13 支未知臨床診斷【如表 2】。21 支 cANCA 陽性血清亦來自不同的疾病, 其中來自自體免疫疾病佔 5 支, 來自韋格納

氏肉芽腫病、腎臟疾病、肺部疾病等疾病各佔 3 支，其它佔 7 支，又 7 支中有 6 支未知臨床診斷【如表 2】。

3. 酵素連結免疫分析法分析

60 支 pANCA 陽性血清，血清與 MPO 反應有 15 支佔 25.0%，與 PR3 反應有 13 支佔 21.67%，與 LF 反應者有 8 支佔 13.33%，與 LZ 反應有 4 支佔 6.67%，與 HMG 1&2 反應有 2 支佔 3.33%【如表 3】。21 支 cANCA 陽性血清，血清與 PR3 反應有 12 支佔 57.14%，與 LF 反應有 4 支佔 19.05%，與 LZ 反應有 4 支佔 19.05%，與 MPO 反應有 3 支佔 14.29%，與 HMG 1&2 反應有 1 支佔 4.76%【如表 3】。

4. 西方墨點法分析

(1).60 支 pANCA 陽性血清: ①以培養細胞 HL-60 cells 溶解產物 (Lysate)當作受質，作西方墨點分析，發現其中只有 1 支來自腎臟疾病的血清呈現陽性反應，表現 1 條 59 kDa 帶(Band)【如圖 8】，其餘血清均為陰性反應。

②若以純化的市售 MPO 當作受質，則有 5 支血清呈陽性反應，表現 1 條 89 kDa 帶(Band)【如圖 9】，其餘血清均為陰性反應。

③若以純化的市售 LF 當作受質，全部血清均為陰性反應【如圖 10】。

④若以純化的市售 LZ 當作受質，只有 2 支血清呈弱陽性反應，表現 1 條 13 kDa 帶(Band)【如圖 11】，其餘血清均為陰性反應。

⑤若以純化的市售 HMG 1&2 當作受質，則有 5 支血清呈陽性反應，表現 1 條 28 kDa 帶(Band)【如圖 12】，其餘血清均為陰性反應。

⑥以嗜中性白血球溶解產物(Lysate)當作受質，全部血清均為陰性反應。

(2).21 支 cANCA 陽性血清:①以培養細胞 HL-60 cells 溶解產物(Lysate)當作受質，作西方墨點分析，全部血清均為陰性反應。

②若以純化的市售 MPO 當作受質，則有 3 支血清呈陽性反應，表現一條 89 kDa 帶(Band)【如圖 9】，其餘血清均為陰性反應。

③若以純化的市售 LF 當作受質，全部血清均為陰性反應【如圖 10】。

④若以純化的市售 LZ 當作受質，只有 1 支血清呈陽性反應，表現 1 條 13 kDa 帶(Band)【如圖 11】，其餘血清均為陰性反應。

⑤若以純化的市售 HMG 1&2 當作受質，則有 2 支血清呈弱陽性反應，表現一條 28 kDa 帶(Band)【如圖 12】，其餘血清均為陰性反應。

⑥以嗜中性白血球溶解產物(Lysate)當作受質，全部血清均為陰性反應。

四.各種不同自體免疫疾病病人血清產生 ANCA 抗體之分析【如表 4,5】

1.酵素連結免疫分析法分析

①全身性紅斑性狼瘡(SLE)病人之血清：總共篩檢 110 支血清與 MPO 反應有 1 支佔 1.0%，與 PR3 反應有 0 支佔 0.0%，與 LF 反應者有 30 支佔 27.2%，與 LZ 反應有 32 支佔 29.1%，與 HMG 1&2 反應有 2 支佔 1.8%。

②類風濕性關節炎(RA)病人之血清：總共篩檢 51 支血清與 MPO 反應有 1 支佔 2.0%，與 PR3 反應有 3 支佔 5.9%，與 LF 反應者有 4 支佔 7.8%，與 LZ 反應有 2 支佔 3.9%，與 HMG 1&2 反應有 0 支佔 0.0%。

③重複口腔潰瘍(ROU)病人之血清：總共篩檢 10 支血清與 LF 反應者有 2 支佔 20.0%，與 LZ 反應有 1 支佔 10.0%。

④修格連氏徵候群(SS)病人之血清：總共篩檢 25 支血清與 LF 反應者有 0 支佔 0.0%，與 LZ 反應有 7 支佔 28.0%。

⑤原發性膽道硬化(PBC)病人之血清：總共篩檢 8 支血清與 LF 反應者有 0 支佔 0.0%，與 LZ 反應有 1 支佔 12.5%。

⑥多肌炎(PM)病人之血清：總共篩檢 11 支血清與 LF 反應者有 0 支佔 0.0%，與 LZ 反應有 2 支佔 18.18%。

⑦抗中節抗體陽性(ACA)病人之血清：總共篩檢 54 支血清與 LF 反應者有 1 支佔 1.9%，與 LZ 反應有 12 支佔 22.22%。

⑧核點狀抗體陽性(Nuclear dot)病人之血清：總共篩檢 22 支血清與 LF 反應者有 0 支佔 0.0%，與 LZ 反應有 5 支佔 22.7%。

2. 西方墨點法分析

若以市售純化的 LZ 當作受質，全身性紅斑性狼瘡(SLE)病人之血清總共篩檢 165 支血清，只有 6 支血清呈現陽性【如圖 13】，其餘血清

均為陰性反應。類風濕性關節炎(RA)病人之血清總共篩檢 66 支血清，共有 2 支血清呈現陽性，其餘血清均為陰性反應。重複口腔潰瘍(ROU)病人之血清總共篩檢 10 支血清，共有 2 支血清呈現陽性，其餘血清均為陰性反應。修格連氏徵候群(SS)病人之血清總共篩檢 25 支血清，共有 3 支血清呈現陽性，其餘血清均為陰性反應。原發性膽道硬化(PBC)病人之血清總共篩檢 8 支血清，全部血清均為陰性反應。多肌炎(PM)病人之血清總共篩檢 11 支血清，全部血清均為陰性反應。抗中節抗體陽性(ACA)病人之血清總共篩檢 54 支血清，只有 1 支血清呈現弱陽性，其餘血清均為陰性反應。核點狀抗體陽性(Nuclear dot)病人之血清總共篩檢 21 支血清，只有 1 支血清呈現弱陽性，其餘血清均為陰性反應，其中陽性反應者皆表現 1 條 13kDa 帶(Band)。

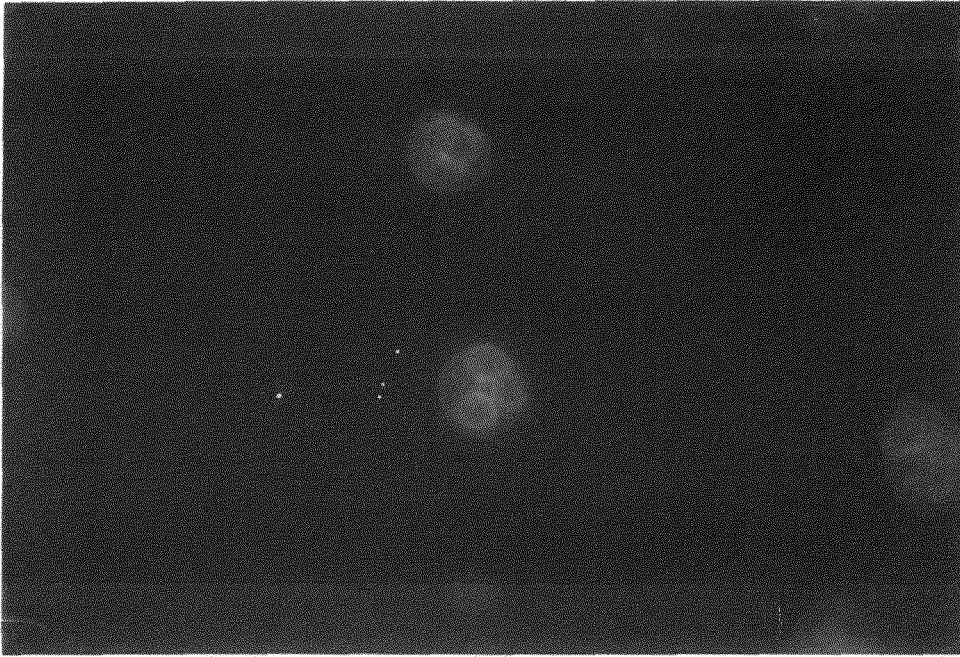


Figure 1A Result of IIF on ethanol fixed polymorphonuclear leukocytes in rabbit antiserum against human myeloperoxidase (x1000).

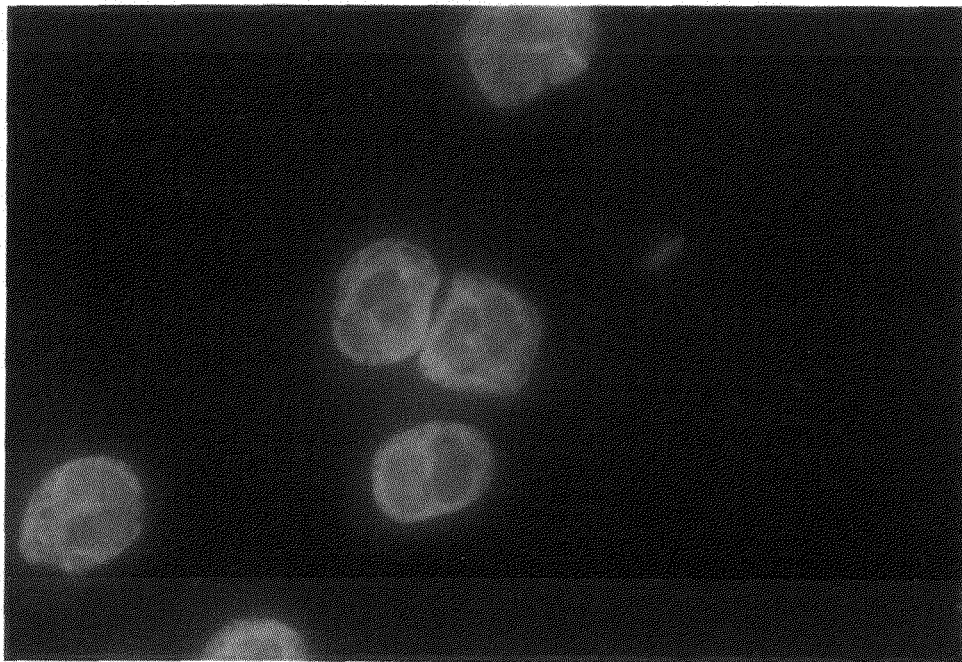


Figure 1B Result of IIF on formalin fixed polymorphonuclear leukocytes in rabbit antiserum against human myeloperoxidase (x1000). Anti-myeloperoxidase antiserum showed a pANCA staining pattern in indirect immunofluorescence.

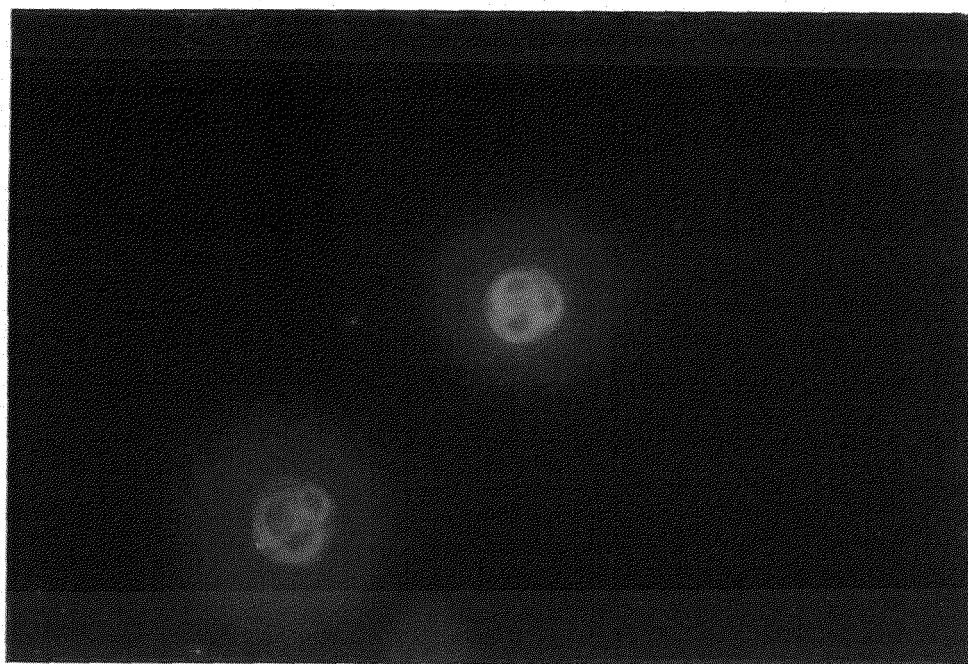


Figure 2A Result of IIF on ethanol fixed polymorphonuclear leukocytes in rabbit antiserum against human lactoferrin (x1000).

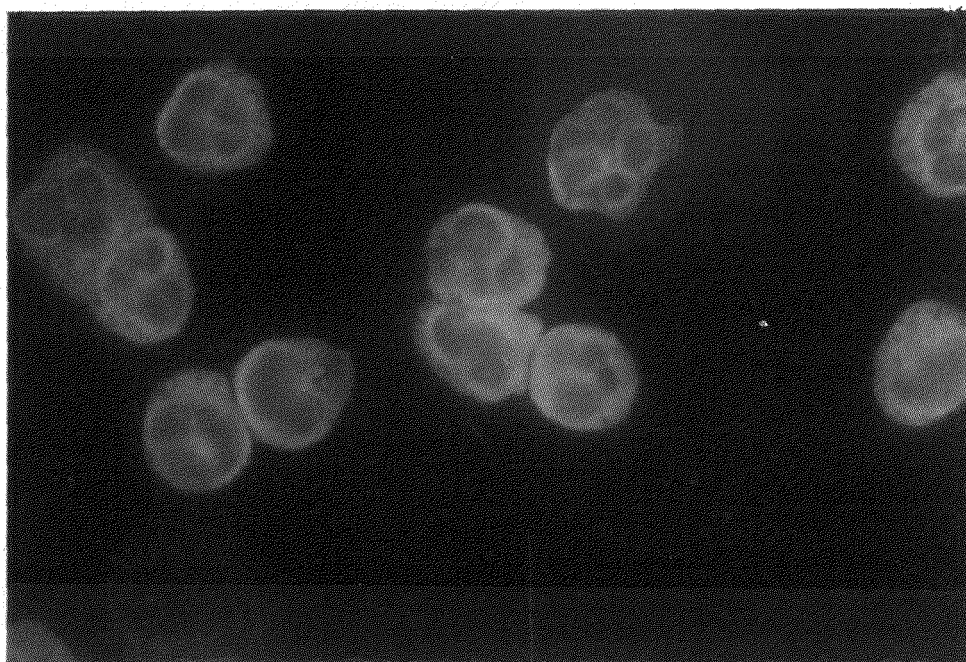


Figure 2B Result of IIF on formalin fixed polymorphonuclear leukocytes in rabbit antiserum against human lactoferrin (x1000). Anti-lactoferrin antiserum showed a pANCA staining pattern in indirect immunofluorescence.

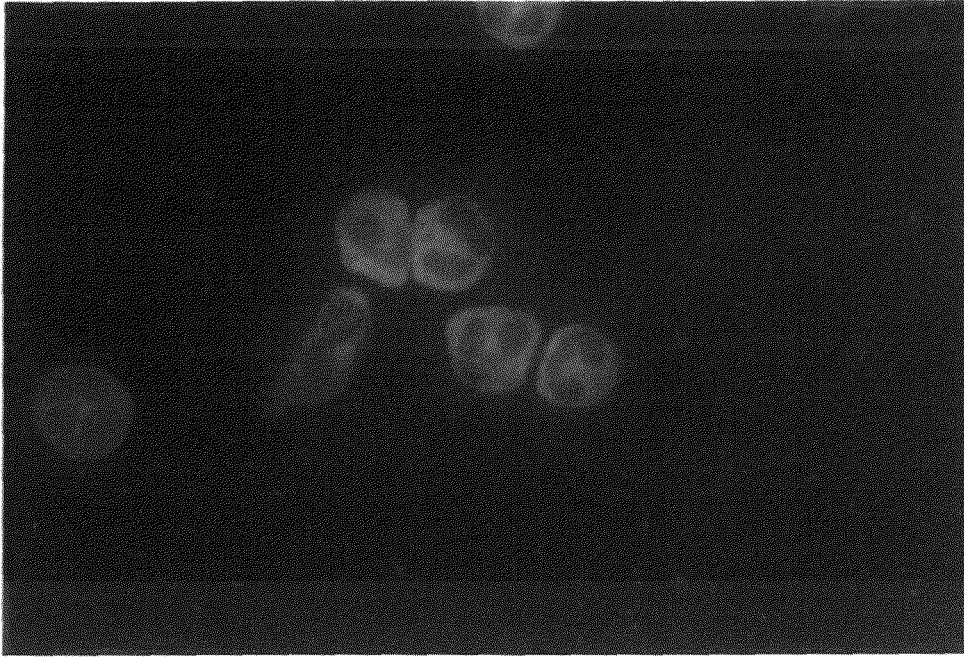


Figure 3A Result of IIF on ethanol fixed polymorphonuclear leukocytes in rabbit antiserum against calf high mobility group 1&2 (x1000).

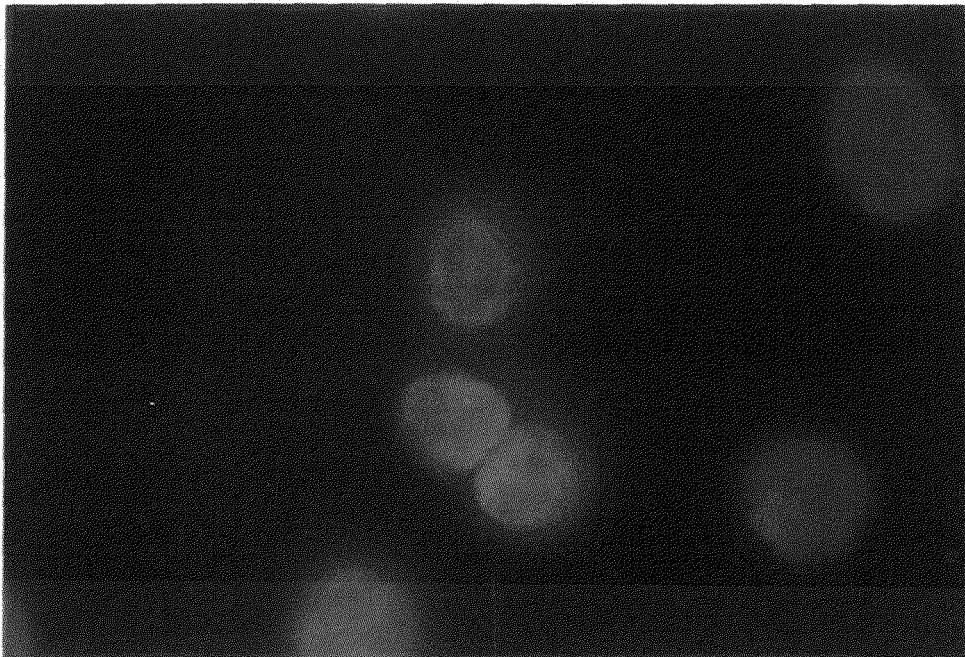


Figure 3B Result of IIF on formalin fixed polymorphonuclear leukocytes in rabbit antiserum against calf high mobility group 1&2 (x1000). Anti- high mobility group 1&2 antiserum showed a cANCA staining pattern in indirect immunofluorescence.

Table 1 The result of immunofluorescence presentation, ELISA and Western blot in rabbits antiserum against myeloperoxidase, lactoferrin, high mobility group 1&2

Rabbit Anti-sera Type	PMN ETHANOL	PMN Formalin	ELISA Absorbance	WB kDa
Myeloperoxidase	pANCA	pANCA	Non-immunized: 0.781 Immunized 100x dilution: 1.207 1000x dilution: 0.843 2000x dilution: 1.024	15, 59, 89
Lactoferrin	PANCA	pANCA	Non-immunized: -0.084 Immunized 100x dilution: 3.004 1000x dilution: 1.781 2000x dilution: 0.990	70, 140
High mobility group 1&2	cANCA	cANCA	Non-immunized 0.311 Immunized 100x dilution: 2.257 1000x dilution: 0.021 2000x dilution: 0.023	28, 55

Rabbits anti-sera against MPO, LF show pANCA pattern and the titer of them both >1000x dilution. Rabbit anti-sera against HMG 1&2 shows cANCA pattern and the titer >100x dilution. In western blot, rabbit anti-sera against MPO represent three bands approximately 15, 59, 89 kDa, rabbit anti-sera against LF represent two bands approximately 70, 140 kDa and rabbit anti-sera against HMG 1&2 represent two bands approximately 28, 55 kDa.

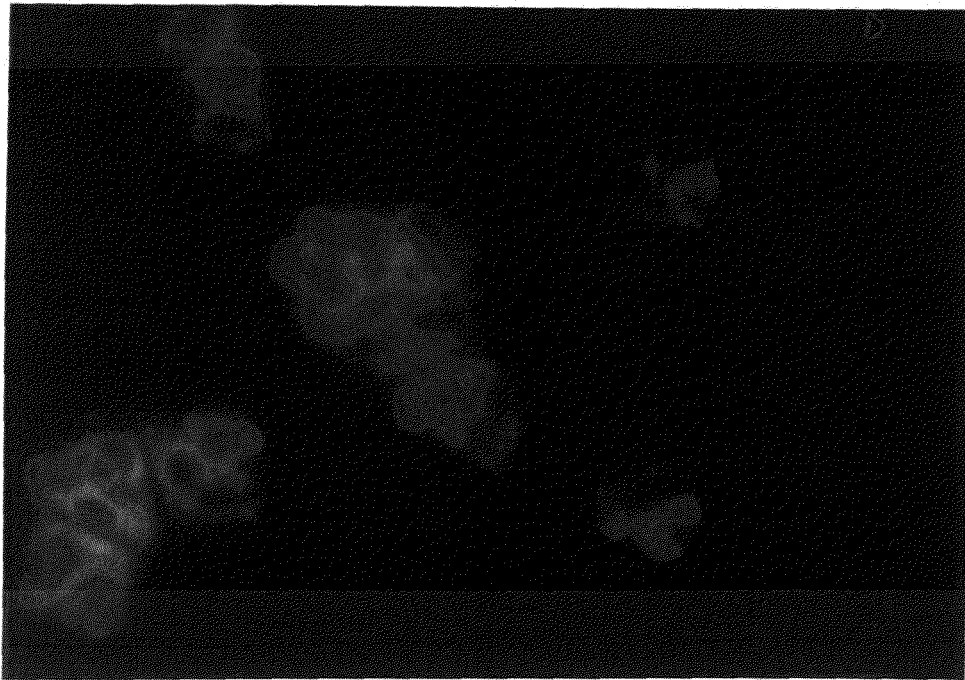


Figure 4A pANCA demonstrated by indirect immunofluorescence using 1:10 dilution of serum from a patient with pANCA positive examined on ethanol fixed normal peripheral blood neutrophils (x1000).

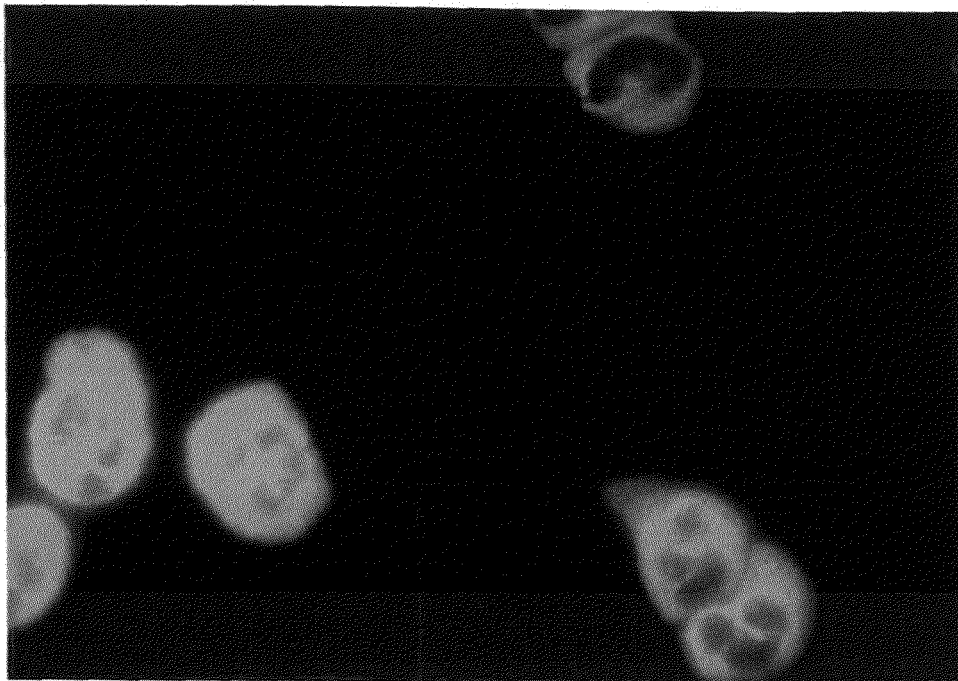


Figure 4B pANCA demonstrated by indirect immunofluorescence using 1:10 dilution of serum from a patient with pANCA positive examined on formalin fixed normal peripheral blood neutrophils (x1000).

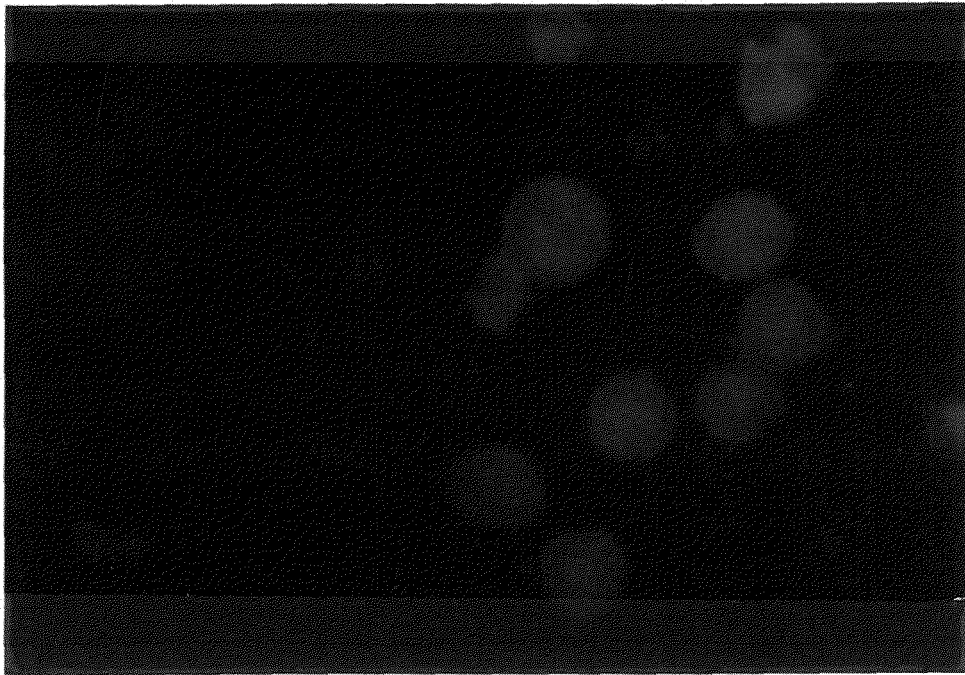


Figure 5A pANCA demonstrated by indirect immunofluorescence using 1:10 dilution of serum from a patient with pANCA positive examined on ethanol fixed cultured HL-60 cells (x1000).

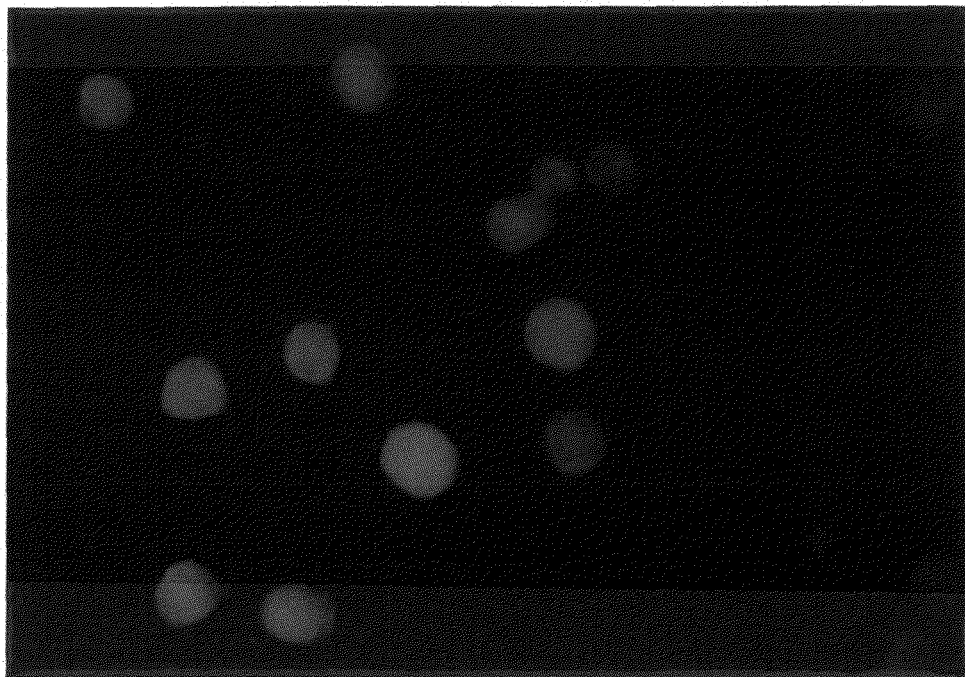


Figure 5B pANCA demonstrated by indirect immunofluorescence using 1:10 dilution of serum from a patient with pANCA positive examined on formalin fixed cultured HL-60 cells (x1000).

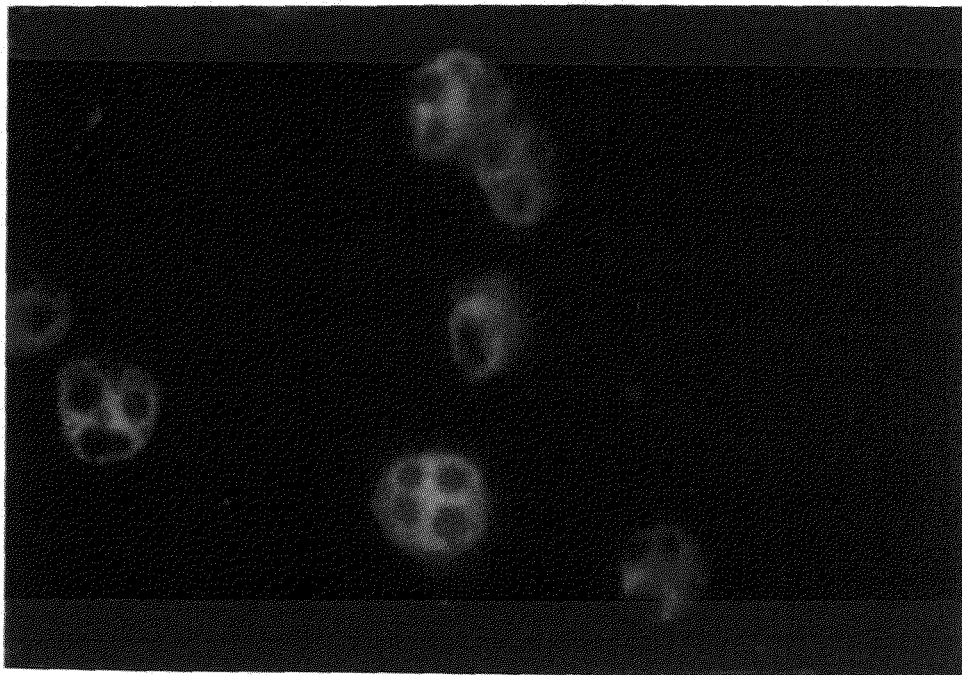


Figure 6 cANCA demonstrated by indirect immunofluorescence using 1:10 dilution of serum from a patient with cANCA positive examined on ethanol fixed normal peripheral blood neutrophils (x1000).

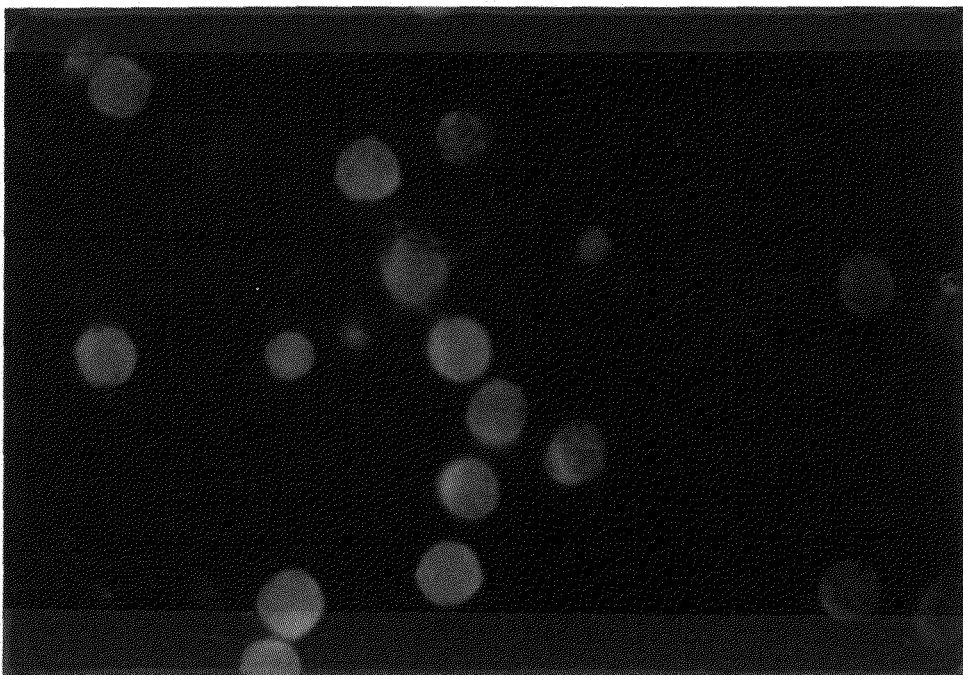


Figure 7 cANCA demonstrated by indirect immunofluorescence using 1:10 dilution of serum from a patient with cANCA positive examined on ethanol fixed cultured HL-60 cells (x1000).

Table 2 Relationship between the finding of IIF on neutrophils for ANCA and Disease in the ANCA positive patients.

ANCA Type	Diagnostic categories	Patients No.(%)
pANCA(+) patients (total 60)	RPGN	17(28.33%)
	ARDS	8(13.33%)
	Renal & Lung disease	3(5.0%)
	Autoimmune disease	11(18.33%)
	Other	21(35.0%)
cANCA(+) patients (total 21)	Wegener's granulomatosis	3(14.29%)
	Renal disease	3(14.29%)
	Lung disease	3(14.29%)
	Autoimmune disease	5(23.8%)
	Other	7(33.33%)

The pANCA positive patients most come from Rapidly Progressive Glomerulonephritis, Autoimmune disease, Acute Respiratory Distress Syndrome, lesser in Renal & Lung disease and others are unclear. The cANCA positive patients most come from Autoimmune disease, Wegener's granulomatosis, Renal disease, Lung disease and others are unclear.

Table 3 The prevalence of ANCA antigenic specificities in sera from patients with IIF positive.

ANCA Type	Total No.	Anti-MPO No. positive(%)	Anti-PR3 No. positive(%)	Anti-LF No. positive(%)	Anti-LZ No. positive(%)	Anti-HMG1&2 No. positive(%)
cANCA	21	3(14.29%)	12(57.14%)	4(19.05%)	4(19.05%)	1(4.76%)
pANCA	60	15(25.0%)	13(21.67%)	8(13.33%)	4(6.67%)	2(3.33%)

The most target antigens in pANCA patients are MPO, PR3, in cANCA patients are PR3, LF, and LZ.

Table 4 The occurrence of increase levels of antibodies against myeloperoxidase, proteinase 3, lactoferrin, lysozyme and high mobility group 1&2 in sera from patients with SLE, RA.

Disease	Total	Anti-MPO	Anti-PR3	Anti-LF	Anti-LZ	Anti-HMG1&2
	No.	No. positive(%)	No. positive(%)	No. positive(%)	No. positive(%)	No. positive(%)
SLE	110	1(1.0%)	0(0%)	30(27.2%)	32(29.1%)	2(1.8%)
RA	51	1(2.0%)	3(5.9%)	4(7.8%)	2(3.9%)	0(0%)

The anti-MPO, anti-PR3 and anti-HMG 1&2 autoantibody has low prevalence in SLE, RA. The anti-LF and anti-LZ autoantibody has high prevalence in SLE but lower in RA. SLE: Systemic Lupus Erythematosus, RA: Rheumatoid Arthritis.

Table 5 The occurrence of increase levels of antibodies against lactoferrin and lysozyme in sera from patients with ROU, SS, PBC, PM, ACA and nuclear dot positive.

Disease	Total No.	Anti-LF No. positive(%)	Anti-LZ No. positive(%)
ROU	10	2(20.0%)	1(10.0%)
SS	25	0(0%)	7(28.0%)
PBC	8	0(0%)	1(12.5%)
PM	11	0(0%)	2(18.18%)
ACA	54	1(1.9%)	12(22.22%)
Dot	22	0(0%)	5(22.7%)

The anti-LF autoantibody has high prevalence in ROU however anti-LZ autoantibody has high prevalence in SS, Dot and ACA and lower in ROU and PBC • ROU: Repeative Oral Ulcer, SS: Sjogren's Syndrome, PBC: Primary Billiary Cirrhosis, PM: Polymyositis, ACA: Anti-centromere antibody positive, Dot: Nuclear dot positive.

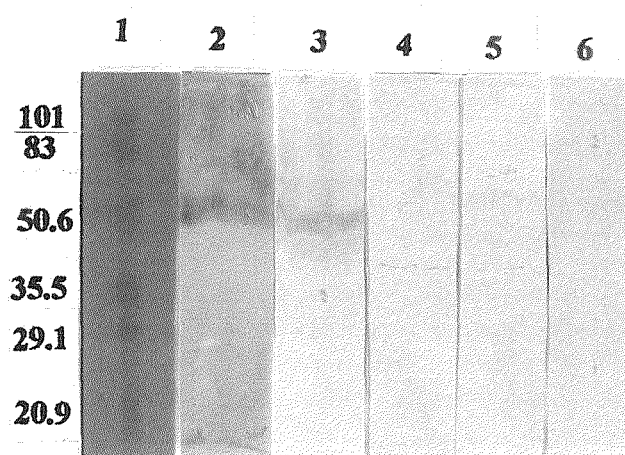


Figure 8 Result of Western Blot of HL-60 cells in sera from patients with ANCA positive. Lane 1: Marker, Lane 2: Rabbit antiserum against MPO, Lanes 3-4: Sera with pANCA, Lane 5: Sera with cANCA, Lane 6: Healthy individual. Only lane 3 appears one band approximates 59 kDa and lane 2 appear three bands approximate 89, 59, 15 kDa, and the others are negative reaction. Antigen: 8.56×10^8 HL-60 cells, Antibody: pts' sera dilute 100x.

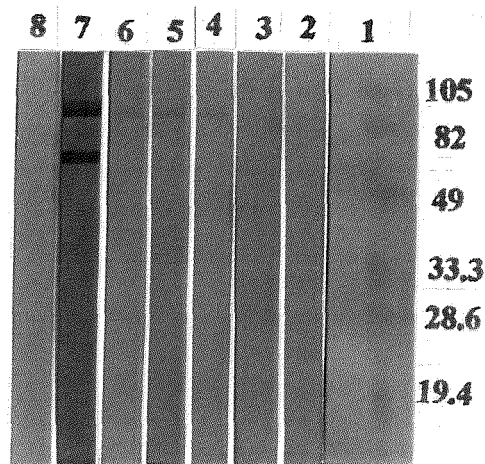


Figure 9 Result of Western Blot of Myeloperoxidase in sera from patients with ANCA positive. Lane 1: Marker, Lanes 2-3: Sera with pANCA, Lane 4: Sera with cANCA, Lanes 5-6: Sera with pANCA, Lane 7: Rabbit antiserum against myeloperoxidase, Lane 8: Healthy individual. Lanes 4-6 appear one band approximates 89 kDa, lane 7 appears three bands approximate 89, 59, 15 kDa and the others are negative reaction. Antigen: 2 μ g Myeloperoxidase, Antibody: pts' sera dilute 100x.

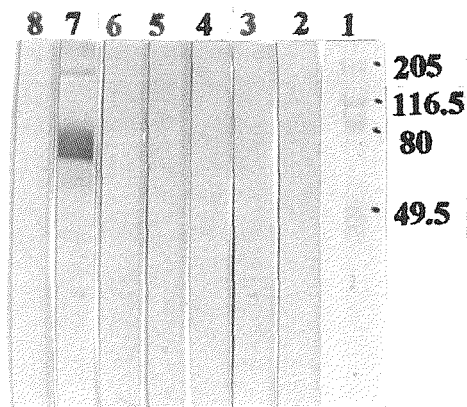


Figure 10 Result of Western Blot of Lactoferrin in sera from patients with ANCA positive. Lane 1: Marker, Lanes 2-3: Sera with pANCA, Lanes 4-6: Sera with cANCA, Lane 7: Rabbit antiserum against lactoferrin, Lane 8: Healthy individual. Lane 7 appears two bands approximate 140 and 70 kDa and the others are negative reaction. Antigen: 60 μ g Lactoferrin, Antibody: pts' sera dilute 100x

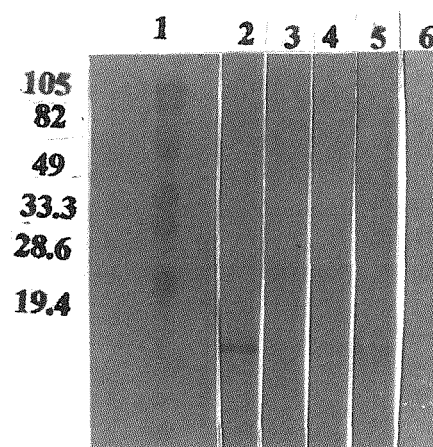


Figure 11 Result of Western Blot of Lysozyme in sera from patients with ANCA positive. Lane 1: Marker, Lane 2: Sera with cANCA, Lanes 3-5: Sera with pANCA, Lane 6: Healthy individual. Lanes 2, 5 appear one band approximates 13 kDa and the others are negative reaction. Antigen: 30 μ g Lysozyme, Antibody: pts' sera dilute 100x.

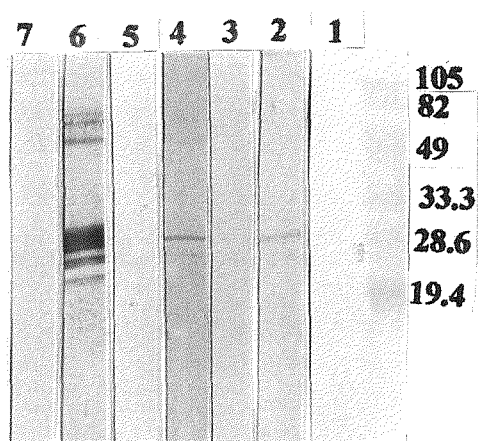


Figure 12 Result of Western Blot of HMG 1&2 in sera from patients with ANCA positive. Lane 1: Marker, Lanes 2-3: Sera with pANCA, Lanes 4-5: Sera with cANCA, Lane 6: Rabbit antiserum against HMG 1&2, Lane 7: Healthy individual. Lanes 2, 4 appear one band approximates 28 kDa, Lane 6 appears two bands approximate 55, 28 kDa and the others are negative reaction. Antigen: 30 μ g High mobility group 1&2, Antibody: pts' sera dilute 100x.

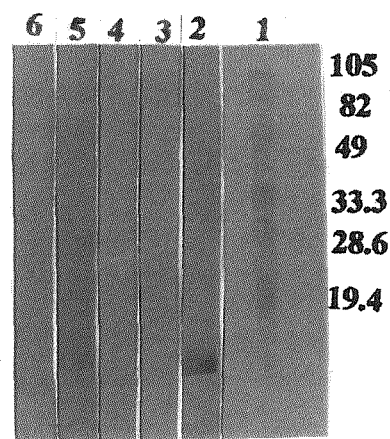


Figure 13 Result of Western Blot of Lysozyme in sera from patients with SLE. Lane 1: Marker, Lanes 2-5: Sera with SLE, Lane 6: Healthy individual. Lanes 2, 5 appear one band approximates 13 kDa and the others are negative reaction. Antigen: 60 μ g Lysozyme, Antibody: pts' sera dilute 100x.

第五章 討論

一.從全血分離嗜中性白血球

本實驗室利用 Ficoll-paque 方法，分離嗜中性白血球，回收率約 20~30%，而使用 Histo-paque 方法，回收率約為 60~70%。1.Ficoll-paque 方法回收率約 20~30%，回收率偏低之原因，可能因為此種分離方法只利用 dextran 沉降紅血球，並利用 Ficoll-paque 區隔在白血球與單核球之間，此時仍會有大量的紅血球殘留在白血球介面，因此必須用大量的低張溶液冰水來破壞紅血球，清洗的次數愈多，白血球漏失也愈多，所以回收率一直不理想，而且在冰水沖洗的過程中，容易造成白血球聚集，易干擾計數，使得計算數目偏低。2.若改用比重分別為 1.077 及 1.119 之 Histo-paque 此二種試劑[62]，回收率約為 60~70%。比重 1.077 之 Histo-paque 能有效隔離在紅血球與白血球之間，而比重 1.119 之 Histo-paque 能有效隔離在白血球與單核球之間，利用各種血球比重不同而加以分開，此時紅血球的干擾便降低了很多，但是仍必須用大量的低張溶液冰水來破壞紅血球，造成白血球跟著漏失，所以回收率並無法達到 100%，所以可能需減低紅血球之污染率，減低沖洗次數才能有效留住白血球。因此我們認為使用 Histo-paque 方法，分離嗜中性白血球，能得到較高的回收率，有助於我們拿到更多的白血球，以利於往後的實驗步驟。

二.兔子經 MPO、LF、HMG 1&2 免疫注射後之抗體表現

1.間接免疫螢光法分析

- (1) MPO 抗血清: 本實驗室所製備的兔子對抗 MPO 之抗血清, 表現典型的 pANCA 特徵。以乙醇固定的嗜中性白血球當作受質[64], 加入經 400 倍稀釋之兔子對抗 MPO 的抗血清, 其螢光型式為核周圍 (Perinuclear); 若改以福馬林固定的嗜中性白血球當作受質, 其螢光會從核周圍處跑到細胞質—此點與 E. C. Hagen et al., [33]所發表快速進行性腎絲球腎炎病人, 血清中之 MPO 抗體, 若以乙醇固定的嗜中性白血球當作受質, 會表現核周圍型式的螢光; 而以福馬林固定的嗜中性白血球當作受質, 會表現細胞質型式的螢光是一致的
- (2) LF 抗血清: 本實驗室製備的兔子對抗 LF 之抗血清, 亦表現 pANCA 的特徵。以乙醇固定的嗜中性白血球當作受質, 加入經 400 倍稀釋之兔子對抗 LF 的抗血清, 其螢光型式為核周圍 (Perinuclear); 若改以福馬林固定的嗜中性白血球當作受質, 其螢光會從核周圍處跑到細胞質—此點與 I. Green et al., [71]所發表潰瘍性結腸炎的病人, 血清中之 LF 抗體, 若以乙醇固定的嗜中性白血球當作受質, 會表現核周圍型式的螢光; 而以福馬林固定的嗜中性白血球當作受質, 會表現細胞質型式的螢光是一致的。
- (3) HMG 1&2 抗血清: 本實驗室製備的兔子對抗 HMG 1&2 之抗血清, 表現 cANCA 特徵。以乙醇固定的嗜中性白血球當作受質, 加入原倍之兔子對抗 HMG 1&2 的抗血清, 其螢光型式為點狀 (Speckled), 表現在細胞質; 若改以福馬林固定的嗜中性白血球當作受質, 其螢光仍然表現在細胞質—此點與 J. Sobajima et al., [42]發表不同, 此作者認為兔子血清中對抗 HMG1&2 之抗體, 應表現典型 pANCA 的特

徵，即以乙醇固定的嗜中性白血球當作受質，會表現核周圍型式的螢光；而以福馬林固定的嗜中性白血球當作受質，會表現細胞質型式的螢光。但本實驗室卻發現，不論是以乙醇或是福馬林固定的嗜中性白血球當作受質，螢光皆表現在細胞質。本實驗室兔子對抗 HMG 1&2 之抗血清與 J. Sobajima et al., 製備之兔子對抗 HMG 1&2 抗血清螢光表現不同可能原因①免疫注射兔子時所採取的方法不同，所使用的抗原量不同。J. Sobajima et al., 採單次皮下注射方法去免疫兔子，而此作者所使用的抗原來自豬，抗原量為 20mg[42]；而本實驗室採三次皮下注射方法去免疫兔子，每次注射兔子的抗原量為 300 μ g，抗原來自牛的胸腺。②由於受質中 HMG 的分布不同，因 HMG 本身為轉錄因子，所以在細胞週期不同階段會表現在不同位置，如進行轉錄時會表現在細胞核中，其餘階段表現在細胞質，所以會看到螢光位置表現之差異。基於上述免疫注射方法不同、抗原來源不同、免疫注射所使用的抗原量不同及 HMG 本身為轉錄因子的特性等等因素，造成螢光表現不同。

2. 酵素連結免疫分析法分析

兔子經 MPO、LF、HMG 1&2 免疫注射後，酵素免疫分析法定效價的結果，顯示 MPO、LF 抗血清之效價皆大於 1000 倍稀釋，而 HMG 1&2 抗血清之效價為大於 100 倍稀釋，HMG 1&2 抗血清效價較弱之原因，可能為只進行免疫注射三次，最後未追加一劑，使得抗體效價停留在 100 倍稀釋之間，無法繼續爬升，亦有可能是此兔子的免疫反應不夠激烈，因牛與兔子的 HMG 具有同源性(Homology)，所以不易起免疫反應[42]。

3. 西方墨點法分析

(1) MPO 抗血清：以 HL-60 cells 的溶解產物(Lysate)或純化的 MPO 當作受質，兔子 MPO 抗血清呈現三條帶(Bands)，分別為 89、59 及 15 kDa。理論上 MPO 經過變性(Denatured)後，會重鏈與輕鏈分開，因此兔子 MPO 抗血清會認識 59 kDa 的重鏈與 15 kDa 的輕鏈。除此之外，但尚有一條 89 kDa 的帶(Band)出現，猜測此帶(Band)可能是未經切割的 apo pro-MPO，此為成熟的 MPO 前身[66]，因此亦會被兔子抗血清所認識，但仍需進一步作定序的確認，以便了解此帶(Band)所扮演之角色及功能。

(2) 以純化的 LF 當作受質，兔子 LF 抗血清呈現二條帶(Bands)，分別為 140 及 70 kDa。兔子 LF 抗血清會認識 70 kDa 的 LF[25]，但尚有一條 140 kDa 的帶(Band)，此條帶(Band)可能為 LF 雙體，所以亦會被兔子 LF 抗血清所認識，亦或者為雜帶(Band)，需進一步確定。

(3) 以純化的 HMG 1&2 當作受質，兔子 HMG 1&2 抗血清呈現二條帶(Bands)，分別為 55 及 28 kDa。兔子 HMG 1&2 抗血清會認識 28 kDa 的 HMG 1&2[42]，但尚有一條 55 kDa 的帶(Band)，此條帶(Band)可能為 HMG 1&2 雙體，所以亦會被兔子 HMG 1&2 抗血清所認識，亦或者為雜帶(Band)，需進一步確定。

三. 連續收集 160 支血清之抗體表現

1. 螢光表現 pANCA 型式

利用酵素連結免疫分析法分析其專一性抗原之表現，與其它實驗室分析結果之比較(如下表)

pANCA 陽性病人	Anti-MPO Positive%	Anti-PR3 Positive%	Anti-LF Positive%	Anti-LZ Positive%
中山醫學院	25.0%	21.67%	13.33%	6.67%
R. J. Falk et al [67]	80~90%	Rare	Not done	Not done
S. F. Wen et al [6]	60~80%	10~20%	Not done	Not done
A. Schnabel et al [5]	Common	Uncommon	Rare	Rare
J. J. Yang et al [73]	82.2%	1.1%	Not done	Not done
A. Wiik et al [7]	Not done	Not done	Not determined	Rare

實驗顯示(1)對抗 MPO 抗原之 pANCA 陽性血清佔 25.0%，此點較其它作者如 R. J. Falk et al., [67]發表 pANCA 陽性血清對抗 MPO 的比例佔 80~90%顯然較低，可能原因為血清來源不同，疾病活性不同，實驗敏感度不同等原因。我們實驗室的血清來自快速進行性腎絲球腎炎(RPGN)只佔 28.33%，來自自體免疫疾病佔 18.33%，來自急性呼吸窘迫症候群(ARDS)佔 13.33%，其餘血清未知診斷，與其他實驗室比較血清幾乎來自壞死性腎絲球腎炎有很大的差別，所以對抗 MPO 出現的比例不盡相同。

(2)若將 pANCA 中，來自快速進行性腎絲球腎炎患者單獨分類出，則 MPO 抗體出現的比例為 52.9%，相當接近於 M. Ulmer et al., [68]所發表 60~70%之數據，因此血清來源是影響各種抗原出現比例之重

要因素。另外，壞死性腎絲球腎炎會有高比例 MPO 抗體出現，是否暗示 ANCA 所扮演組織損傷的角色，因此 ANCA 不僅具診斷價值，也可幫助決定起始免疫抑制治療之時機，防止患者腎臟機能繼續惡化。

- (3)除此之外，在本實驗室 pANCA 陽性血清中，尚有一部份與 MPO 以外之抗原反應如 PR3、LF、LZ，顯示間接免疫螢光呈現 pANCA 並非全由 MPO 造成，有一部份由其它抗原造成如 PR3、LF 及 LZ，此點與 A. Wiik et al., [7]發表 pANCA 抗原為多元化之結果一致。
- (4) pANCA 陽性血清，對抗 PR3 抗原的比例佔 21.67%，此點與 M. Segelmark et al., [70]提出一些具 MPO 抗體的病人卻表現 cANCA，具相同意義，此作者認為 MPO 具有不同之抗原決定位(Epitope)，所以可能表現 pANCA 或 cANCA，此點正好可以解釋何以具有 PR3 抗體卻表現 pANCA。
- (5)另外，pANCA 陽性血清，對抗 LF 抗原的比例佔 13.33%，對抗 LZ 抗原的比例佔 6.67%，此結果與 A. Schnabel et al., [5]發表 pANCA 陽性血清，對抗 LF 抗原的比例佔非常少量(rare)，對抗 LZ 抗原的比例佔非常少量(rare)之結果吻合，顯示這些抗體只佔次要角色。

2. 螢光表現 cANCA 型式

利用酵素連結免疫分析法分析其專一性抗原之表現，與其它實驗室分析結果之比較(如下表)

cANCA 陽性病人	Anti-MPO Positive%	Anti-PR3 Positive%	Anti-LF Positive%	Anti-LZ Positive%
中山醫學院	14.29%	57.14%	19.05%	19.05%
F. J. Van der Woude et al [4]	Rare	80~90%	Not done	Not done
A. Wiik et al [7]	Rare	Not done	Rare	Rare
J. W. Cohern Tervart et al [18]	16.7%	81.8%	Not done	Not done
J. J. Yang et al [73]	5.1%	80.8%	Not done	Not done
S. F. Wen et al [6]	10~20%	60~90%	5~40%	Rare
A. Schnabel et al [5]	Uncommon	Common	Rare	Rare

實驗顯示(1)於 cANCA 陽性血清，對抗 PR3 抗原佔 57.14%，此點較其它作者如 F. J. Van der Woude et al., [4]發表 cANCA 對抗 PR3 的比例佔 80~90%顯然較低，可能原因為血清來源不同，疾病活性不同，實驗敏感度不同等原因，我們實驗室的血清來自自體免疫疾病佔 23.8%，來自腎臟疾病只佔 14.29%，來自韋格納氏肉芽腫病疾病佔 14.29%，來自肺部疾病佔 14.29%，其餘血清未知診斷，與其他實驗室比較血清幾乎來自韋格納氏肉芽腫病有很大的差別，所以對抗 PR3 出現的比例不盡相同。

(2)除此之外，在本實驗室 cANCA 陽性血清中，尚有一部份與 PR3 以外之抗原反應如 LF、LZ、MPO，顯示間接免疫螢光呈現 cANCA 並非全由 PR3 造成，有一部份由其它抗原造成如 LF、LZ 及 MPO，此點與 F. J. Van der Woude et al., [4]發表 cANCA 主要抗原為 PR3

很少有其它抗原之論點不同，原因可能為本實驗室的 cANCA 血清過少，而且血清來源並非只有韋格納氏肉芽腫病，因此對抗的抗原呈現多樣性。

- (3)於 cANCA 陽性血清，對抗 MPO 抗原佔 14.29%，對抗 LF 抗原佔 19.05%，對抗 LZ 抗原佔 19.05%此結果與 S. F. Wen et al., [6]發表 cANCA 陽性血清，對抗 MPO 抗原的比例佔 10~20%，對抗 LF 抗原的比例佔少量 5~40%，對抗 LZ 抗原的比例佔非常少量(rare)之結果吻合，顯示這些抗體只佔次要角色。

3. 螢光表現 pANCA 型式

利用西方墨點法分析 pANCA 陽性血清中，專一性抗原之表現。

- (1) 以嗜中性白血球溶解產物當作受質，全部血清均為陰性反應。可能是因為拿到的嗜中性白血球數目不夠，因嗜中性白血球取得不易，加上分離嗜中性白血球期間，常會造成白血球活化，使得抗原之製備困難重重，因此改用培養細胞 HL-60 cells 作常規 ANCA 分析[63]。其優點①HL-60 cells 降低檢查者於操作全血期間暴露於感染物的機會。②HL-60 cells 提供較固定的受質，但嗜中性白血球來自不同捐贈者；而且 HL-60 cells 較方便取得，但嗜中性白血球需受限於捐贈者，靜脈採血及使用之前須與其它細胞種類分離[63]。
- (2) 以 HL-60 cells 溶解產物當作受質，其中只有 1 支血清呈現陽性反應，表現 1 條 59 kDa band，其餘血清均為陰性反應。此點可能因抗原製備的問題，由於 HL-60 cells 每個細胞含多寡不同之顆粒，所

以可能細胞數目夠，但所含的顆粒卻不多，而造成抗原不足。又此細胞培養數目達到一定量，會進行凋謝死亡，但屍體仍保留在培養瓶(Flask)中，造成計數失誤，使得拿到的細胞不足。

4. 螢光表現 cANCA 型式

利用西方墨點法分析 cANCA 陽性血清中，專一性抗原之表現。

不管是以嗜中性白血球溶解產物或 HL-60 cells 溶解產物當作受質，全部血清均為陰性反應。此可能在抗原製備過程中加入 PMSF 有關，因其為 serine proteinase 的抑制劑[28]，可能影響一些酵素之活性如 PR3，因此看不見帶(Bands)出現，或者血清抗體本身所對抗的抗原決定點與製備的抗原不同，所以不會認識，因此看不見帶(Bands)出現。

所以根據以上之實驗結果，我們認為 HL-60 cells 可以取代嗜中性白血球，作常規 ANCA 試驗。但是，由於 HL-60 cells 缺乏次級顆粒成份，因此與 HL-60 cells 反應之 ANCA，絕不會與次級顆粒抗原反應如 lactoferrin 或 vitamin B12 binding protein，但此不能排除一些 ANCA subsets 可能與次級顆粒的成分反應，若將此細胞加入 1.25 % DMSO，則此細胞可分化成 myelocyte、metamyelocyte、band 及 segment，這些更成熟的細胞便含有次級顆粒足以去偵測 ANCA 的存在[58]。

四.各種不同自體免疫疾病病人血清產生 ANCA 抗體之分析

1. 全身性紅斑性狼瘡病人

利用酵素連結免疫分析法分析其專一性抗原之表現，與其它實驗室分析結果之比較(如下表)

SLE 病人	Anti-MPO Positive%	Anti-PR3 Positive%	Anti-LF Positive%	Anti-LZ Positive%
中山醫學院	1%	0%	27.2%	29.1%
J. W. Cohern Tervart et al [18]	Not determined	Not determined	Not done	Not done
A. Schnabel et al [12]	0%	0%	Not done	Not done
S. F. Wen et al [6]	5~25%	Not done	5~40%	Not done
A. Wiik et al [7]	Rare	Not done	Inter- mediate	Common
A. Schnabel et al [5]	Not done	Not done	Uncommon	Rare

A. Wiik et al., [7]發表 Lysozyme (LZ)-ANCA 並不具疾病專一性，與疾病活性亦無相關，可於 1/3 的全身性紅斑性狼瘡病人中出現，而本實驗室全身性紅斑性狼瘡病人，出現 LZ 抗體之比例為 29.1%，二者數據接近。A. Schnabel et al., [5]提出 Lactoferrin-ANCA 很少於原發性血管炎(Primary vasculitides)出現，但可於類風濕性關節炎或全身性紅斑性狼瘡次發的血管炎中發現，亦在潰瘍性結腸炎 [41]及初級硬化性膽道炎中發現。S. F. Wen et al., [6]發表全身性紅斑性狼瘡病人，出現 LF 抗體之比例為 5~40%，而本實驗室全身性紅斑性狼瘡病人，出現 LF 抗體之比例為 27.2%，顯示 LF、LZ 抗

體在全身性紅斑性狼瘡扮演重要角色，但仍待釐清。而本實驗室 SLE 病人 MPO 與 PR3 抗體出現比例低，與 A. Schnabel et al [12]所發表的數據相近，顯示此二者抗體在全身性紅斑性狼瘡病人並不是那麼重要。

2. 類風濕性關節炎病人

利用酵素連結免疫分析法分析其專一性抗原之表現，與其它實驗室分析結果之比較(如下表)

RA 病人	Anti-MPO Positive%	Anti-PR3 Positive%	Anti-LF Positive%	Anti-LZ Positive%
中山醫學院	2%	5.9%	7.8%	3.9%
A. Mustila et al [11]	1.6%	0.4%	2.4%	1.2%
J. W. Cohern Tervart et al [18]	Not determined	Not determined	Not done	Not done
S. F. Wen et al [6]	Unknown	Not done	20-40%	Not done
A. Schnabel et al [5]	Uncommon	0%	Uncommon	Uncommon
A. Wiik et al [7]	Rare	Not done	Rare	Inter- mediate

類風濕性關節炎病人，各種 ANCA 出現的比例均低，與 J. A. Savige et al., [25]發表類風濕性關節炎病人不常出現 ANCA，二者結果類似，亦顯示 ANCA 在類風濕性關節炎病人並不是那麼重要，可能只扮演次要角色。

3. 其它自體免疫疾病

利用酵素連結免疫分析法分析其專一性抗原之表現，除了重複口腔潰瘍病人外，修格連氏徵候群、原發性膽道硬化、多肌炎、抗中節抗體陽性及核點狀抗體陽性等病人血清，出現 LF 抗體之比例均很低，顯示此抗體在這些病人並不是那麼重要，重複口腔潰瘍病人雖 20.0% 具 LF 抗體，但由於人數過少很難下定論。重複口腔潰瘍、修格連氏徵候群、原發性膽道硬化、多肌炎、抗中節抗體陽性及核點狀抗體陽性等病人血清，出現 LZ 抗體之比例為 10~28%，但 LZ 抗體並不具疾病專一性，與疾病活性亦無相關[5]，因此難了解 LZ 抗體在這些疾病所扮演的角色及出現之意義，但可作為後續研究目標。

4. 各種自體免疫疾病

利用西方墨點法分析自體免疫疾病病人血清中，專一性抗原之表現。若以市售純化的 LZ 當作受質，全身性紅斑性狼瘡(SLE)病人之血清總共篩檢 165 支血清，只有 6 支血清呈現陽性，其餘血清均為陰性反應。類風濕性關節炎(RA)病人之血清總共篩檢 66 支血清，共有 2 支血清呈現陽性，其餘血清均為陰性反應。重複口腔潰瘍(ROU)病人之血清總共篩檢 10 支血清，共有 2 支血清呈現陽性，其餘血清均為陰性反應。修格連氏徵候群(SS)病人之血清總共篩檢 25 支血清，共有 3 支血清呈現陽性，其餘血清均為陰性反應。原發性膽道硬化(PBC)病人之血清總共篩檢 8 支血清，全部血清均為陰性反應。多肌

炎(PM)病人之血清總共篩檢 11 支血清，全部血清均為陰性反應。抗中節抗體陽性(ACA)病人之血清總共篩檢 54 支血清，只有 1 支血清呈現弱陽性，其餘血清均為陰性反應。核點狀抗體陽性(Nuclear dot)病人之血清總共篩檢 21 支血清，只有 1 支血清呈現弱陽性，其餘血清均為陰性反應，其中陽性反應者皆表現 1 條 13kDa 帶(Band)。LZ 抗體在這些疾病出現的比例並不高，而且所扮演的角色及出現之意義並不清楚，但可作為後續研究目標。

結論:

綜合以上研究結果，我們得知在血管炎及自體免疫疾病等病人當中，所出現的 ANCA 抗體直接對抗不同的嗜中性白血球細胞質抗原。在全身性紅斑性狼瘡病人與類風濕性關節炎病人的血清篩檢當中，我們發現 PR3 和 MPO 抗體並不常出現；而其中全身性紅斑性狼瘡病人血清之中，LF 抗體與 LZ 抗體出現的比例較 PR3 抗體和 MPO 抗體來的高。兔子經 MPO 免疫注射後，間接免疫螢光表現 pANCA 型態；經 LF 免疫注射後，間接免疫螢光亦表現 pANCA 型態；經 LZ 免疫注射後，間接免疫螢光表現 cANCA 型態。

第六章 參考文獻

1. W. L. Gross and E. Csernok, 1995: Immunodiagnostic and pathophysiologic aspects of antineutrophil cytoplasmic antibodies in vasculitis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 7: 11-19.
2. D. J. Davies, J. E. Moran, and J. F. Niai. 1982: Segmental necrotizing glomerulonephritis with anti-neutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br. Med. J.* 285: 606.
3. J. B. Hall, B. McN. Wadham, C. J. Wood, V. Ashton, and W. R. Adam, 1984: Vasculitis and glomerulonephritis: A subgroup with an antineutrophil cytoplasmic antibody. *Aust. N. Z. J. Med.* 14:277-278.
4. F. J. Van der Woude, N. Rasmussen, S. Lobatto, A. Wiik, H. Permin, L. A. Van Es, M. Van der Gissen, G. K. Van der Heen, And T. H. The, 1985: Autoantibodies against neutrophil and monocytes: tool for diagnosis and marker for disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1: 425-429.
5. A. Schnabel, S. Hauschild, W. L. Gross, 1996: Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies in Generalized Autoimmune Diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 109: 201-206.
6. Sung Feng Wen, 1994: Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis: potentially reversible disease. *J. Formos. Med. Assoc.* 93: 545-561.
7. A. Wiik, L. Stummann, L. Kjeldsen, N. Borregaard, S. Ullman, S. Jacobsen and P. Halberg, 1995: The diversity of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) antigens. *Clin. Exp. Immunol. Supp.* 1: 15-17.
8. J. A. Goeken, 1991: Antineutrophil cytoplasmic antibody – a useful serological marker for vasculitis. *J. Clin. Immunol.* 11:161-174.

9. J. C. Jennette, and R. J. Falk, 1995: Clinical and pathological classification of ANCA-associated vasculitis: what are the controversies? *Clin. Exp. Immuno.* 101, Supp. 1: 18-22.
10. C. G. M. Kallenberg, A. H. L. Mulder, J. W. Cohen Tervaert, 1992: Antineutrophil cytoplasmic antibodies: A still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorder. *Am. J. Med.* 93: 675-682.
11. Anu Mustila, Markku Korpela, Jukka Mustonen, Heikki Helin, Heini Huhtala, Esa Soppi, Amos Pasternack, and Ari Miettinen, 1997: Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody in Rheumatoid Arthritis: A Marker of Severe Disease with Associated Nephropathy. *Arthritis & Rheumatism* 40: 710-717.
12. A. Schnabel, E. Csernok, D. A. Isenberg, C. Mrowka and W. L. Gross, 1995: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 38: 633-637.
13. C. G. M. Kallenberg, E. Brouwer, J. J. Weening and J. W. Cohen Tervaert. 1994: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: Current diagnostic and patho-physiological potential. *Kidney Int.* 46: 1-15.
14. R. C. Williams, J. R. Staud, C. C. Malone, J. Payabyab, L. Byres and D. Underwood, 1994: Epitopes on proteinase-3 recognized by antibodies from patients with Wegener's Granulomatosis. *J. Immuno.* 152: 4722-4737.
15. H. Szymkowiak, T. W. Johnston, E. Csernok and W. L. Gross, 1999: Expression of the human autoantigen of Wegener's Granulomatosis (PR3) in a baculovirus expression system. *Bioch. and Bioph. Resea. Communi.* 219: 283-289.

16. J. W. Cohern Tervaert, F. J. Van der Woude, A. S. Fauci, A. L. Ambrus, J. Velosa, W. F. Keane, S. Meijer, M. van der Giessen, T. H. The, G. K. van der Hem, C. G. M. Kallenberg, 1989: Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch. Intern. Med.* 149: 2461-2465.
17. J. W. Cohen Tervart, R. Goldschmeding, J. D. Elema, M. van der Giessen, M. G. Huitema, G. K. van der Hem, T. H. The, A. E. G. K. von dem Borne, C. G. M. Kallenberg, 1990: Autoantibodies against myeloid lysosomal enzyme in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 37: 799-806.
18. J. W. Cohen Tervart, R. Goldschmeding, J. D. Elema, P. C. Limburg, M. van der Giessen, M. G. Huitema, M. I. Koolen, R. J. Hene, T. H. The, G. K. van der Hem, A. E. G. K. von dem Borne, C. G. M. Kallenberg, 1990: Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different form of Vasculitis. *Arthritis Rheum.* 33: 1264-1272.
19. J. W. Cohen Tervart, P. C. Limburg, J. D. Elema, M. G. Huitema, G. Horst, T. H. The, C. G. M. Kallenberg, 1991: Detection of autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes: a useful adjunct to classification of patients with biopsy- proven necrotizing arteritis. *Am. J. Med.* 91: 59-66.
20. M. Segelmark, B. Persson, T. Hellmark and J. Wieslander, 1997: Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin ? *Clin. Exp. Immunol.* 108:167-174.
21. W. L. Gross, E. Csernok, U. Helmchen, 1995: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies, autoantigens, and systemic vasculitis. *APMIS* 103: 81-97.

22. J. C. Jennette, A. S. Wilkman, R. J. Falk, 1989: Anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated glomerulonephritis and vasculitis. *Amer. J. Pathol.* 135: 921-930.
23. M. Waldendorf, M. Schneider, 1993: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with systemic lupus erythematosus, In ANCA-Associated Vasculitis: Immunological and Clinical Aspects. Edited by W. L Gross. London Plenum.
24. P. E. Spronk, H. Bootsma, G. Horst, M. G. Huitema, P. C. Limburg, J. W. Cohen Tervaert and C. G. M. Kallenberg, 1996: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *British J. of Rheumatology* 35: 625-631.
25. J. A. Savige, M. C. Gallichio, A. Stockman, T. J. Cunningham, M. J. Rowley, T. Georgiou, D. Davies, 1991: Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 86:92-98.
26. E. C. Hagen, B. E. B. P. Ballieux, L. A. van Es, M. R. Daha, F. J. van der Woude, 1993: anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: a review of the antigens involved. The assay and the clinical and possible pathogenetic consequences. *Blood* 81: 1996-2002.
27. U. Specks, C. L. Wheatey, T. J. M. C. McDonald, M. S. Rohrbach, R. A. De Remeé, 1989: Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow-up of Wegener's granulomatosis. *Mayo. Clin. Proc.* 64: 28-36.
28. G. C. M. Kallenberg, J. W. Cohen Tervaert, F. J. van der Woude, R. Goldschmeding, A. E. G. Kr. Von dem Borne and J. J. Weening, 1991: Autoimmunity to lysosomal enzymes: new clues to vasculitis and glomerulonephritis. *Immuno. Today* 12: 61-64.

29. J. C. Jennette, 1991: Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated disease: a pathologist's perspective. *Am. J. Kidney Dis.* 18: 164-170.
30. B. Nolle, U. Specks, J. Ludemann, M. S. Rohrbach, R. A. Deremee and W.L. Gross, 1989: Anticytoplasmic autoantibodies: their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis. *Ann. Intern. Med.* 111: 28-40.
31. S. Hardarson, D. R. Labrecque, F. A. Mitros, G. A. Neil and J. A. Goeken, 1993: Antineutrophil cytoplasmic antibody in inflammatory bowel and hepatobiliary diseases. *Am. J. Clin. Pathol.* 99: 277-281.
32. M. O. Pool, G. Bouma, S. G. M. Meuwissen, B. M. E. von Blomberg, J. P. De Merwe, W. L. J. M. Deville, J. C. M. Fonk and A. S. Pena, 1995: Serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Clin. Pathol* 48: 346-350.
33. E. C. Hagen, B. E. P. B. Ballieux, M. R. Daha, L. A. van Es, F. J. van der Woude, 1992: Fundamental and clinical aspects of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity* 11: 199-207.
34. S. V. Shah, W. H. Baricos and A. Basci, 1987: Degradation of human glomerular basement membrane by stimulated neutrophils. *J. Clin. Invest.* 79: 25-31.
35. R. J. Johnson, W.G. Couser, E. Y. Chi, S. Adler and S. J. Klebanoff, 1988: New mechanism for glomerular injury. *Lab. Invest.* 58: 294-301.
36. R. C. Kao, N. G. Wehner, K. M. Skubitz, B. H. Gray and J. R. Hoidal, 1988: Proteinase 3, A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J. Clin. Invest.* 82: 1963-1973.

37. A. Kijstra, 1991: The role of lactoferrin in the non-specific immune response on the ocular surface. *Reg. Immunol.* 3: 193-7.
38. G. J. Ziere, M. C. M. van Dijk, M. K. Bijsterbosch, T. J. C. van Berkel, 1992: Lactoferrin uptake by the rat liver. Characterization of the recognition site and effect of selective modification of arginine residues. *J. Biol. Chem.* 267: 11229-35.
39. J. L. van Snick, P. L. Msaon, J. F. Heremans, 1974: The involment of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. *J. Exp. Med.* 140: 1068-84.
40. T. Skogh, E. Peen, 1993: Lactoferrin and anti-lactoferrin antibodies in inflammatory disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 336: 533-8.
41. E. Peen, S. Almer, G. Bodemar, B. O. Rydem, C. Sjolín, K. Tejle, T. Skogh, 1993: Anti-lactoferrin antibodies and other types of 'ANCA' in Crohn's disease, ulcerative colitis, and primary sclerosing cholangitis. *Gut.* 34: 56-62.
42. J. Sobajima, S. Ozaki, F. Osakada, H. Uesugi, H. Shirakawa, M. Yoshida and K. Nakao, 1997: Novel autoantigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) in ulcerative colitis: non-histone chromosomal proteins, HMG1 & HMG2. *Clin. Exp. Immunol.* 107: 135-140.
43. J. C. Jennette, A. S. Wilkman, R. J. Falk, 1989: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and vasculitis. *Am. J. Pathol.* 135: 921-930
44. C. M. Lockwld, S. Thiru, S. Stewart, G. Hale, J. Issacs, Pwraight, J. Elliott and H. Waldmann, 1996: Treatment of refractory Wegener's Granulomatosis with humanized monoclonal antibodies. *Q. J. M.* 89(12): 903-912.

45. H. P. Strunz, E. Csernok and W. L. Gross, 1997: Incidence and disease associations of a proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibody idiotype (5/7 Id) whose antiidiotype inhibits proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibody antigen binding activity. *Arthritis and Rheumatism*. 40(1): 135-421.
46. R. L. Rubin, F. L. Tang, E. K. L. Chan, L. M. Pollard, G. Tsay and E. M. Tan, 1986: IgG subclasses of autoantibodies in systemic lupus erythematosus, sjogren's syndrome and drug-induced autoimmunity. *J. Immuno*. 137: 2528-2534.
47. A. H. L. Mulder, G. Horst, P. C. Limburg, C. G. M. Kallenger, 1994: Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a FcγRII-dependent process. *Clin. Exp. Immunol*. 98: 270-8.
48. A. J. Proges, P. B. Redecha, W. T. Kimberly, E. Csernok, W. L. Gross, R. P. Kimbery, 1994: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via FcγRII. *J. Immunol*. 153: 1271-80.
49. W. L. Gross, W. H. Schmitt, E. Csernok, 1993: ANCA and associated disease: immunodiagnostic and pathogenetic aspects. *Clin. Exp. Immunol*. 91:1-12.
50. J. C. Jennette, R. J. Falk, 1994: The Pathology of vasculitis involving the kidney. *Am. J. Kidney Dis*. 24:130-141.
51. M. P. Bevilacqua, R. M. Nelson, 1993: Selcetins. *J. Clin. Inverst*. 91: 379.
52. T. M. Carlos, J. M. Harlan, 1994: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068.

53. R. J. Falk, R. S. Terrell, L. A. Charles, J. C. Jennette, 1990: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4115-4119.
54. C. O. Savage, B. E. Pottinger, G. Gaskin, C. D. Pusey, J. D. Pearson, 1992: Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity towards cultured endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 141: 335-342.
55. W. L. Gross, E. Csernok, W. H. Schmitt, 1991: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: Immunobiological aspects. *Klin. Wochenschr* 69-13: 558-66.
56. W. J. Mayet, E. Hermann, E. Csernok, W. L. Gross and Meyer Zum Buschenfelde KH, 1993: In vitro interactions of c-ANCA (antibodies to Proteinase 3) with human endothelial cells. In: W. L. Gross, ed. ANCA associated vasculitides: Immunodiagnostic and pathogenetic value of antineutrophil cytoplasmic antibodies. London: Plenum Press (in press).
57. C. Savage, G. Gaskin, C. D. Pusey and J. D. Pearson, 1993: Myeloperoxidase binds to vascular endothelial cells, is recognized by ANCA and can enhance complement dependent cytotoxicity. In: W. L. Gross, ed. ANCA associated vasculitides: Immunodiagnostic and pathogenetic value of antineutrophil cytoplasmic antibodies. London: Plenum Press (in press).
58. Steven J. Collins, Francis W. Ruscettei, Robert E. Gallagher, and Robert C. Gallo, 1978: Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2458-24652.

59. N. Borregaard, J. M. Heiple, E. R. Simons and R. A. Clark, 1983: Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase translocation during activation. *J. Cell Biol.* 97: 52-60.
60. M. Slifkin and R. Cumbie, 1992: Comparison of the Histopaque-1119 Method with Plasmagel Method for Separation of Blood Leukocytes for Cytomegalovirus Isolation. *J. Clin. Micro.* 30: 2722-2724.
61. H. Towbin, T. Stachelin, J. Gordon, 1979: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
62. E. C. Hagen, 1995: Development and standardization of solid-phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) for clinical application: report of a large clinical evaluation study. *Clin. Exp. Immunol.* 101, supp. 1: 29.
63. L. A. Charles, R. J. Falk and J. C. Jennette, 1989: Reactivity of Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with HL-60 cells. *Clin. Immunol. and Immunopathology* 53: 243-253.
64. A. Wiik, 1989: Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 97: 12-13.
65. A. Wiik, 1980: Granulocyte-specific antinuclear antibodies. *Allergy* 35: 263-289.
66. W. M. Nauseef, M. Cogley and S. McCormick, 1996: Effect of the R569W Missense Mutation on the Biosynthesis of Myeloperoxidase. *The J. Biol. Chem.* 271: 9546-9549.

67. R. J. Falk, J. C. Jennette, 1988: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N. Eng. J. Med.* 318: 1651-1657.
68. M. Ulmer, A. Rautmann and W. L. Gross, 1992: Immunodiagnostic aspects of autoantibodies against myeloperoxidase. *Clin. Nephrology* 37: 161-168.
69. H. K. Choi, P. A. Merkel, J. W. Cohen Tervaert, R. M. Black, R. T. McCluskey and J. L. Niles, 1999: Alternating antineutrophil cytoplasmic antibody specificity. *Arthritis & Rheumatism* 42: 384-388.
70. M. Segelmark, B. Baslund and J. Wieslander, 1994: Some patients with anti-myeloperoxidase autoantibodies have a C-ANCA pattern. *Clin. Exp. Immunol.* 96: 458-465.
71. I. Green, H. Kirkpatrick and D. C. Dalt, 1971: Lactoferrin specific localization in the nuclei of human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 1311-1317.
72. B. Baslund, A. Wiik, 1994: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) and vasculitis. *Clin. Rev. Allergy* 12: 297-304.
73. J. J. Yang, R. Tuttle, R. J. Falk and J. C. Jennette, 1996: Frequency of anti-bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and anti-azurocidin in patients with renal disease. *Clin. Exp. Immunol.* 105: 125-131.