

厚生省特定疾患調査研究事業班
(重点研究)

平成 10 年度 研究報告書

まえがき

血液凝固系は最も代表的で、かつ基本的な生体防御システムである。従ってこの凝固系は、その他の生体制御系ともリンクして大きなネットワークを作っている。そしてお互いに呼応しあって、時々刻々と多様に変貌する外界に対応している。凝固系がリンクするその他の生体防御システムとしては、免疫系、脂質代謝系、神経内分泌系などがある。

一方社会が複雑化、西欧化、高齢化してくると上述の生体防御系も当然それに対してシフトして来ている。これらは複雑に絡み合って本邦の疾病構造を急激に変化させつつある。

本班会議では、原因不明の血栓が疾患の難治化に関わっていると想定される疾患の中から、大腿骨頭壊死、特発性肺高血圧症、難治性腎炎、ウイルス輪動脈閉塞症、膠原病などを選び、重層的、横断的に研究し、上記疾患に新たな治療のストラテジーを立案することを目的としてスタートした。血栓が出来れば当然当該臓器の機能不全、そして薬剤のターゲッティングが出来なくなり、疾患は難治化するのである。

研究の成果が上がり、上述の疾患の「難治化」に大きな風穴があくことを期待している。

平成10年3月31日

厚生省特定疾患調査研究事業班
班 長 丸山 征郎

= 目 次 =

- | | | | |
|-------------------------|-----|----|------|
| 1) まえがき | ・・・ | 班長 | 丸山征郎 |
| 2) 平成10年度研究班構成員名簿 | | | |
| 3) 平成10年度総括研究報告書 | ・・・ | 班長 | 丸山征郎 |
| 4) 平成10年度分担研究報告書 | ・・・ | 班員 | 丸山征郎 |
| | ・・・ | 班員 | 小池隆夫 |
| | ・・・ | 班員 | 久保俊一 |
| | ・・・ | 班員 | 小嶋哲人 |
| | ・・・ | 班員 | 北本康則 |
| | ・・・ | 班員 | 池田栄二 |
| | ・・・ | 班員 | 坂巻文雄 |
| 5) 平成10年度研究成果の刊行に関する一覧表 | | | |

研究班構成員名簿

◇◆平成10年度 厚生省特定疾患調査研究事業（重点研究）研究者名簿◆◇

研究課題名：原因不明の血栓が病因となる難治性疾患の横断的研究 (課題番号) 9809						
区分	氏名	ふりがな	所属施設名及び職名(役職)	所属施設所在地	電話番号	FAX番号
主任	丸山 征郎	まるやま いくろう	鹿児島大学医学部臨床検査医学講座(教授)	〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1	099-275-5437	099-275-2629
分担	小池 隆夫	こいけ たかお	北海道大学医学部第二内科学講座(教授)	〒060-0815 札幌市北区北15条西7丁目	011-716-2111	011-736-0958
分担	久保 俊一	くぼ としかず	京都府立医科大学整形外科学講座(助教授)	〒602-0841 京都市上京区 河原町広小路上る梶井町465	075-251-5549	075-251-5841
分担	小嶋 哲人	こじま てつひと	名古屋大学医学部第一内科学講座(助手)	〒466-0065 名古屋市昭和区鶴舞町65	052-744-2145	052-744-2161
分担	北本 康則	きたもと やすのり	熊本大学医学部第三内科学講座(講師)	〒860-0811 熊本市本荘1-1-1	096-373-5164	096-366-8458
分担	池田 栄二	いけだ えいじ	慶應義塾大学医学部病理学講座(助手)	〒160-8582 東京都新宿区信濃町35	03-3353-1211	03-3353-3290
分担	坂巻 文雄	さかまき ふみお	国立循環器病センター心臓内科(医師)	〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1	06-6833-5012	06-6872-7486

経理事務担当者

区分	氏名	ふりがな	所属施設名及び職名(役職)	所属施設所在地	電話番号	FAX番号
経理	酒匂 和子	さこう かずこ	鹿児島大学医学部臨床検査講座(秘書)	〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1	099-275-5437	099-275-2629

総括研究報告書

原因不明の血栓が病因となる難治性疾患の横断的研究

丸山 征郎

(鹿児島大学医学部臨床検査医学・教授)

本プロジェクトでは、血栓形成と疾患の難治化の問題に、横断的かつ、重層的に取り組んだ。横断的(横系)には凝固・線溶系、血管内皮機能、血流、などの面から、縦断的には肺高血圧、腎炎、大腿骨頭壊死、モヤモヤ病などを選び研究した。先ず大腿骨頭壊死では、ステロイド投与による本疾患のモデルをウサギの作成に成功したが、本モデルでは血管内皮細胞の拡大とトロンボモデュリンの減少が証明された。慢性肺高血圧では肺内血管内皮細胞の障害と血液凝固系の活性化が明らかになった。腎炎ではメサンジウム増殖型の腎炎において、尿中に活性トロンピンが証明されたことから、腎局所でのトロンピンの生成が推定された。モヤモヤ病の場合には血栓に引き続く新生血管が出血に関与すると想定されたが、その新生血管では脳血管閉塞の形成不全が存在するか否かが次の問題として残った。横断的な研究では、内皮細胞の抗血栓活性は糖化タンパク、酸化変性LDLで損なわれた。また微小循環系の血液の円滑な流動に重要な役割を果たすプロテインCは肝臓細胞で合成された後、分泌される場合にそのC末端が重要であることが示された。

キーワード：肺高血圧、腎炎、大腿骨頭壊死、モヤモヤ病、血管内皮細胞、トロンピン

A. 研究目的

本プロジェクトの目的は、血栓が病因となって原疾患が難治化することの仕組みを明らかにして、その防御策を立案し、疾患の難治化を防ぐことである。疾患としては、モヤモヤ病、肺高血圧、腎炎、大腿骨頭壊死を選び、これらに対し、血栓が関与しているか否か、血栓が関与していたらそのメカニズムはどのようになっているのか? 等について血管内皮細胞機能、血液凝固・線溶系、血液流動性などの諸点から検討した。

B. 研究方法

疾患として、モヤモヤ病、肺高血圧、腎炎、大腿骨頭壊死を選んだ。これは縦軸である。これらについて内皮細胞機能、凝固・線溶系から検討した(横系、横断的)。また膠原病が血栓によりしばしば難治化することから、膠原病で血栓形成に大きな役割を果たすと見なされている抗カルジオリピン抗体の作用機序について解析した。

C. 研究結果

本研究班の成果は、

1. 内皮細胞の機能不全と血栓形成の分子メカニズム

丸山らは、内皮細胞の機能不全により血栓に至るメカニズムについて検討を加えた。内皮細胞は周知のど

とく、1) PGI₂, NO, ADPase を産生、放出して、血小板機能を抑制し、2) トロンボモデュリン(TM)、Tissue Factor Pathway Inhibitor(TFPI), ヘパリンーアンチトロンピンIII で凝固を抑え、3) tissue plasminogen activator(t-PA) を産生、放出して線溶を賦活する、などで多重性に抗血栓性発揮している細胞である。しかし丸山らは糖化タンパク(AGE)や酸化変性LDL、エンドトキシン培養内皮細胞を処理すると、NF- κ B が活性化され、TMやt-PA がダウンレギュレートされ、TMとは正反対の機能を有するトロンピン受容体、t-PA inhibitor(PAI-1)がアップレギュレーションすることを証明した。トロンピン受容体からのシグナルはMAPキナーゼ活性化をへて、NF- κ B を活性化し、proinflammatory, procoagulant なベクトルの発現を増強することが判明した。

生活習慣の著しい欧米化で、日本人の多くが内皮細胞機能の障害されやすい状態になっていることが示唆された。

2. 膠原病の難治化と血栓の関係について

膠原病も血栓が生じ易く、一度血栓が生じると原疾患の難治化する。そこで小池らは膠原病の難治化と血

栓形成の関係について研究した。膠原病の血栓形成には抗カルジオリピン抗体が重要な役割を果たすので、小池らはこの抗体の本態を研究した。結果、本抗体は活性化細胞膜に結合して立体構造の変化した $\beta 2$ GP-1を認識すること、その結果としてリン脂質とも反応するものと考えられた。このプロセスは内皮細胞の機能を傷害して、血栓傾向につながるものと想定される。

3. 血栓形成と大腿骨頭壊死

大腿骨頭壊死はしばしばステロイド投与に伴って発症し、近年移植や免疫抑制剤の多用で増加しつつある疾患である。久保らはそのメカニズムを解明する目的で、家兎(n=5)にメチルプレドニゾロン(4 mg/kg/週を4週間)投与して、大腿骨の組織増を解析した。メチルプレドニゾロン投与群では、正常コントロール群(n=5)に比して、sinusoidの拡張と、その血管内皮細胞におけるトロンボモデュリンの減少を証明した。

4. 血流維持機構障害と特発性血栓

血流の鬱滞は重要な血栓形成のリスクの一つである。一方血流の鬱滞しやすい微小循環系ではトロンボモデュリン-プロテインC(TM-PC)システムが大きな役割を果たすことが判明している。そこでこれらの研究の端緒として、小嶋らはプロテインCの分泌機構を研究した。結果PCの細胞外への分泌にはPC分子のC末端側が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

5. 腎疾患の進展におけるトロンビンの関与

北本らは腎炎の進展とトロンビンの関係を研究した。先ず北本らはトロンビンの微量測定系を確立して、各種腎炎患者の尿中の微量トロンピンを測定した。正常者では尿中にはトロンピンは検出されなかったが、メサンジウム増殖性腎炎では検出されたことから、メサンジウムの増殖と腎内トロンピン生成の間に何らかの関連がうかがわれた。またこの尿中トロンピンはワーファリンの投与で減少することを明らかにした。

6. 慢性肺高血圧の発症機構と肺内微小血栓形成

坂巻らは原発性肺高血圧を始めとする慢性高血圧の発症機構とその病態を明らかにする目的で、可溶性P-selectin, von Willebrand 因子(vWF)、可溶性トロンボモデュリンなどを測定して、肺内での凝固の活性化、肺内血管内皮細胞の活性化などについて検討した。結果、原発性肺高血圧では可溶性トロンボモデュリンの

低下や、vWF抗原の上昇が認められ、肺内での内皮細胞性凝固制御機構が想定された。

7. モヤモヤ病における血管新生の分子機構

モヤモヤ病は、血栓と出血を併発する難治性疾患である。本症における血管新生(それに引き続く出血)の機構を明らかにする目的で、池田らはウズラ-ニワトリ間異種移植系を用いて、血管新生→脳血管関門(BBB)形成について検討した。脳に移植した脳以外の組織ではBBBが形成され、それにはVEGFの関与が考えられた。モヤモヤ病で新生された血管でのBBBの形成などと出血との関係などが今後の問題である。

8. 全体の総括

今回は1年目にしては、予想を超える実績をあげることが出来た。大腿骨頭壊死、肺高血圧、腎炎の発症と病態に凝固の活性化が深く関与すること、が明らかになり、モヤモヤ病における血栓や出血の病態が血管新生、脳血管関門という全く新たな視点から展開可能である、ということが判明した。また抗カルジオリピン抗体症候群での内皮機能障害の分子メカニズム、微小循環の保持機構に重要な役割を果たすプロテインC-トロンボモデュリンシステムのうち、プロテインCの分泌機構が明らかにされた。そして内皮機能が生体内修飾物質で損なわれて、これが血栓の発症のリスクファクターとなっていることなどが明らかにされた。

D. 考察

内皮細胞は通常は抗血栓活性を発揮し、円滑な血液の循環に大きな役割を果たしている。その中でも特に血液の流れに対して抵抗の大きな部位；微小循環系ではトロンボモデュリン-プロテインCが大きな役割を果たす。炎症性サイトカインのIL-1, TNF- α 、生体内修飾物質；酸化変性LDL, 糖化タンパク(AGE)が対外異物の代表であるエンドトキシン(LPS)と同様内皮細胞の抗血栓活性を低下されることが判明した。再生新生血管と内皮機能の関係が判明すれば、これはモヤモヤ病における血栓や出血の病態の一端が判明するものと考えられる。また体内、外物質による内皮機能の障害は、基礎疾患のある患者を向血栓性にする重要な全身性ファクターになるものと考えられる。今回メサンジウム増殖型腎炎に腎局所での凝固の活性化が示唆されたが、この場合にも腎局所での炎症性サイトカインが一定の役割を果たしている可能性が考えられる。また肺高血圧でも内皮細胞の障害と凝固系の活性化が

示唆されたが、この場合、内皮細胞の障害の結果凝固系の活性化が起きている可能性がある。

今回ステロイド投与による実験的大腿骨頭壊死の動物モデルの作成に成功し、このモデルウサギでは大腿骨頭の微小循環系のジヌソイドの拡張とトロンボモデュリンの減少が証明された。今後このメカニズムの解明が重要であるが、大腿骨頭壊死の防止や治療に大きな進歩となるものと思われる。

E. 結論

大腿骨頭壊死や慢性肺高血圧では内皮細胞機能障害が根底にあるものと考えられた。モヤモヤ病では再生内皮の機能の不全が示唆されたが、この証明は今後の大きな問題として残った。血管内皮細胞の抗血栓活性機能は糖化タンパク、酸化変性 LDL など生体内修飾物質、炎症性サイトカイン (IL-1, TNF- α) など、エンドトキシンなどでダウンレギュレーションされた。これは全体的に基礎疾患のある患者においては血栓の大きな原因の一つになるものと考えられる。

F. 参考文献

1. H. Shin., I. Kitajima., T. Nakajima., Q. Shao., T. Tokioka., I. Takasaki., N. Hanyu., T. Kubo., I. Maruyama. Thrombin receptor mediated signals induce expressions of interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor via NF- κ B activation in synovial fibroblasts. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1999;58(1):55-60.
2. M. Nakata., T. Yata., Y. Soejima., & I. Maruyama. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes* 1999; 48:426-29
3. H. Nishio., T. Suda., K. Sawada., T. Miyamoto., T. Koike., Y. Yamaguchi. Molecular cloning of cDNA encoding human Rab3D whose expression is upregulated with myeloid differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1444:283-290.
4. T. Kubo, M. Fujioka, S. Yamazoe, N. Yoshimura, T. Oka, Y. Ushijima, Y. Hasegawa, and Y. Hirasawa. Relationship Between Steroid Dosage and Osteonecrosis of the Femoral Head After Renal Transplantation as Measured by Magnetic Resonance Imaging. *Transplantation Proceedings* 1998;30(7):3039-3040.
5. A. Shimizu., I. Sugiura., T. Matsushita., T. Kojima., M. Hirai.,

and H. Saito. Identification of the Five Hydrophilic Residues (Lys-217, Lys-218, Arg-359, His-360, and Arg-513) Essential for the Structure and Activity of Vitamin K-Dependent Carboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 251:22-26.

6. Y. Kitamoto., T. Imamura., H. Fukui., and K. Tomita. Role of thrombin in mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney International* 1998;54:1767 -1768.

7. 坂巻文雄. 症候群辞典 : Rendu-Osler-Weber syndrome (遺伝性出血性毛細血管拡張症). 診断と治療 1998年 ; 86 Suppl : 338.

分担研究報告書

内皮細胞の機能不全と血栓形成の分子機構

丸山 征郎

(鹿児島大学医学部臨床検査医学・教授)

血管内皮細胞は抗血栓活性を持った細胞で、血管内での血液の凝固を制御している。我々はこの内皮細胞の機能不全の分子細胞機構に解析を加え、糖化タンパク、酸化変性 LDL, エンドトキシンが内皮機能障害を招くことを明らかにした。

キーワード：血管内皮細胞、血栓形成、トロンピン、トロンボモデュリン

A. 研究目的

血栓の病態には内皮細胞機能不全が関係していることが明らかになりつつある。一方糖尿病、高脂血症、感染症は血栓塞栓のハイリスクグループであることも明らかになっている。そこで糖尿病、高脂血症、感染症で血中に増加する糖化タンパク、酸化変性 LDL, エンドトキシンの内皮機能に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1) ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) はヒト臍帯静脈より分離培養した。

2) 酸化変性 LDL は、糖化タンパクは自家調整したものをを用いた。

3) 内皮細胞の機能は、細胞表面のトロンボモデュリン (TM), トロンピン受容体 (TR), 組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA), t-PA インヒビター (PAI-1) を測定した。

4) また肥満も重要な動脈血栓症のハイリスクグループであるので、その病因をさぐるため、肥満者の血中に増加するレプチンの血小板に及ぼす影響を調べた。

C. 研究結果

1) 糖化タンパク、酸化変性 LDL, エンドトキシンは血管内皮細胞の TM をダウンレギュレーションし、TR をアップレギュレーションした。さらに内皮細胞からの t-PA の放出もダウンレギュレーションした。PAI-1 はアップレギュレーションされた。

2) レプチンは血小板の機能をポテンシエーションした。

D. 考察

今回の研究は in vitro のものであり、必ずしも in vivo には適応できるものではないが、血中で酸化変性

LDL, 糖化タンパク、エンドトキシンの増加している患者 (高脂血症、糖尿病、肺血症など) では内皮細胞の抗血栓/血栓活性のバランスが崩れ、血栓優位にシフトしている可能性が考えられる。また肥満者では血中レプチン濃度が上昇していることが知られているが、今回肥満者の血中でありうる濃度の 100 mg/ml で血小板機能がポテンシエートされることが判明したことから、肥満に伴う「動脈血栓」の発症には高レプチン血症が大きな役割を果たしているものと考えられる。

E. 結論

内皮細胞は抗血栓活性を有しているが、その機能は生体内修飾物質でモデュレートされることが判明した。これは高脂血症、糖尿病、感染症などにおける血栓傾向の cellular basis を与えているものと考えられる。

F. 参考文献

1. N. Maeno, S. Takei, K. Masuda, H. Akaike, K. Matsuo, I. Kitajima, I. Maruyama, and K. Miyata. Increased Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor in Kawasaki Disease. *Pediatric Research* 1998;44(4):596-599.

2. Y. Motomiya, N. Oyama, H. Iwamoto, T. Uchimura, and I. Maruyama. N^ε-(carboxymethyl) lysine in blood from maintenance hemodialysis patients may contribute to dialysis-related amyloidosis. *Kidney International* 1998;54: 1357-1366.

3. H. Shin, I. Kitajima, T. Nakajima, Q. Shao, T. Tokioka, I. Takasaki, N. Hanyu, T. Kubo, I. Maruyama. Thrombin receptor mediated signals induce expressions of interleukin 6

and granulocyte colony stimulating factor via NF- κ B activation in synovial fibroblasts. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1999;58(1):55-60.

4. O. Watanabe, I. Maruyama, K. Arimura, I. Kitajima, H. Arimura, M. Hanatani, K. Matsuo, T. Arisato, and M. Osame. Overproduction of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is causative in Crow-Fukase (POEMS) syndrome. *Muscle Nerve* 1998;21:1390-97

5. M. Nakata, T. Yada, N. Soejima, and I. Maruyama. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes* 1999; 48:426-29

先天性 β 2-グリコプロテイン1 欠損症の凝固・線溶能

小池 隆夫
(北海道大学医学部二内科・教授)

【目的】本研究は先天性 β 2GPI 欠損症 1 家系(同胞)の凝固・線溶能について検討し、 β 2GPI 欠損の生体内での意義について考察した。【方法】先天性 β 2GPI 欠損者の血漿を採取し、凝固・線溶スクリーニング、生体内トロンビン生成、活性化プロテイン C への反応、内因系線溶能について評価した。【結果】先天性 β 2GPI 欠損者に血栓症、出血傾向の既往はなかった。凝固・線溶スクリーニング検査では異常所見は認めず、プロトロンビンフラグメント 1+2 値などの結果より生体内トロンビン生成亢進、線溶活性亢進を示す所見は得られなかった。活性化プロテイン C は先天性 β 2GPI 欠損血漿の凝固時間を正常に延長した。内因系線溶能は正常範囲であった。【結論】 β 2GPI は *in vitro* では凝固・線溶のいくつかの反応を抑制する活性があるが、先天性 β 2GPI 欠損症に過凝固や線溶異常はみられず、それらの反応は生体内では有為でないか、または他の機構が β 2GPI 欠損を代償する可能性を示唆した。

キーワード：血栓症、抗リン脂質抗体症候群、トロンビン、プラスミン

A. 研究目的

抗リン脂質抗体はリン脂質あるいはリン脂質結合蛋白に結合する一連の自己抗体の総称である。これらの抗体の存在は血栓傾向とつよい相関がみられ、動・静脈血栓症、胎盤血栓症が原因と考えられる流・死産などの臨床症状を伴う場合、抗リン脂質抗体症候群 (APS)(または Hughes 症候群)として扱われている。APS は現在最も頻度の高い後天性血栓傾向のひとつとして重要視されている。

リン脂質結合蛋白のひとつ、 β 2-グリコプロテイン I (β 2GPI) は血栓症と関連した抗リン脂質抗体のもっともメジャーな対応抗原である [1]。 β 2GPI がリン脂質と結合すると抗カルジオリピン抗体 (または抗 β 2GPI 抗体) の対応エピトープが分子表面に露出し、抗原-抗体反応がおこる [2]。 β 2GPI はもともと DNA やリポタンパクなど種々の負電荷物質と結合する性質をもっていることが知られていた。血漿中に約 200 μ g/ml と高濃度で存在し、そのうち約 40% がリポタンパクと結合して存在していることから、他のアポリポタンパクとは構造上まったく異なっているにもかかわらずアポリポタンパク H とよばれることもある。とくに興味深いことは、 β 2GPI は陰性リン脂質と強く結合し、

リン脂質依存性の凝固反応を抑制的に制御していることであろう。

in vitro での凝固反応における β 2GPI の作用については多くの検討がなされている。 β 2GPI は第 XII 因子の活性化、第 X 因子の活性化を抑制、したがって内因系凝固/線溶反応を抑制する。プロトロンビナーゼの抑制、またプロテイン C の活性化や活性化プロテイン C (APC) の第 Va 因子不活化を陰性制御する。したがって β 2GPI はプロコアグラントとアンチコアグラントの両者の制御機能をはばひろくもっていることがわかる [3]。実際に心筋梗塞等の血栓症の急性期ではアンチトロンビン III やプロテイン C などの他の抗凝固因子と平行して血漿 β 2GPI 濃度は消費により低下しており、*in vivo* でも凝固反応制御をおこなっていることが示唆されている。ところで APS 患者における血漿 β 2GPI 濃度の測定についていくつか報告があるが、予想に反して APS 患者では血漿 β 2GPI 濃度は正常かむしろ上昇していた。このことより APS の発症機序は抗 β 2GPI 抗体による β 2GPI の機能不全と考えてよいかどうかとの疑問が生じる。

今回、先天性 β 2GPI 欠損症の 1 家系を見い出した。ホモ接合体の姉弟の血清 β 2GPI 濃度は検出感度以下で

あった。APSの発症機序を考察するためにこの姉弟の血漿を解析し、 β 2GPI欠損が血栓のリスクとなるかどうかを詳細に検討した。

B. 研究方法

先天性 β 2GPI欠損者のゲノムDNAから β 2GPIの各エクソンをPCRで増幅し、各PCR産物をクローニングベクターへ挿入後、標準的な方法でエクソンの塩基配列を決定し、遺伝子異常を同定した。

先天性 β 2GPI欠損症姉弟から0.105Mクエン酸加静脈採血を施行し、0.22 μ m フィルターを通して血小板フリー血漿を調整し、凍結保存した。

凝固反応スクリーニング検査として、プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)、ラッセル蛇毒希釈時間(RVVT)を施行した。生体内トロンビン生成/線溶活性化のマーカーとして、血漿プロトロンビンフラグメント 1+2(F1+2)、トロンビン-アンチトロンビン複合体(TAT)、プラスミノゲン-プラスミンインヒビター複合体(PIC)、D-ダイマーを測定した。

プロテインC系の評価として、血漿プロテインC活性、総プロテインS抗原、フリープロテインS抗原を測定した。また、 β 2GPI欠損血漿に活性化プロテインCを加えたときの凝固時間の変化を記録し、活性化プロテインCに対する反応性を評価した。内因系線溶能は、カオリンの存在下でユーグロブリン分画を調整

し、プラスミノゲン添加フィブリンプレーートの溶解面積により算定した。

C. 研究結果

先天性 β 2GPI欠損者では β 2GPIエクソン4のthymine(cDNAで379位に相当)の欠落が示された。それによりフレームシフト変異がおこり、エクソン6に停止コドンが出現していた。

先天性 β 2GPI欠損症姉弟いずれも血栓・出血の既往はなかった。凝固反応スクリーニング検査(表1)では、PT、aPTTは正常範囲内であったが、両者ともRVVTの短縮を認めた(Fig.1)。しかし先天性 β 2GPI欠損血漿に精製 β 2GPIを加えてRVVTを測定したところ、健常人血漿と同様に β 2GPI濃度依存性にRVVTの延長が認められた。ただし正常濃度の β 2GPIを大きく超える β 2GPIを添加してもRVVTは正常化しなかった。

生体内トロンビン生成/線溶活性化のマーカーはすべて正常範囲内であった(表1)。血漿プロテインCの量は若干正常上限を超えていたが、総プロテインS抗原、フリープロテインS抗原はすべて正常範囲内であり(表1)、活性化プロテインC添加により延長するaPTTは、正常血漿と β 2GPI欠損血漿との間で差がなかった(データは示さず)。内因系線溶能(カオリンの存在下および非存在下で調整したユーグロブリン分画のフィブリンプレーート溶解面積の差)も正常範囲内であった(データは示さず)。

表1 先天性 β 2GPI欠損者の凝固・線溶パラメータ

パラメータ	正常値	β 2GPI欠損者1	β 2GPI欠損者2
PT	70-130 (%)	10.3	10.8
aPTT	24.6-32.6 (秒)	32.3	施行せず
プロテインC	67-127 (%)	137	142
総プロテインS	4.0-13.8 (μ g/ml)	13.8	10.9
フリープロテインS	65-135 (%)	135	129
TAT	< 3.5 (ng/ml)	1.0	1.2
F1+2	0.20 - 1.04 (mol/l)	0.73	0.71
PIC	< 0.8 (μ g/ml)	0.6	0.3
D-ダイマー	< 1.0 (μ g/ml)	0.32	0.27

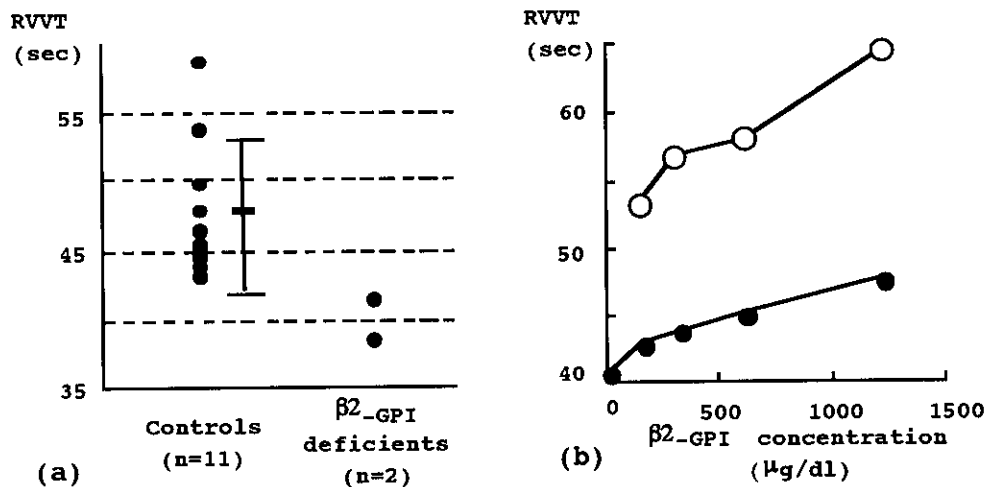


Fig.1 (a) 先天性β2GPI欠損血漿のRVVTを測定した。2名ともRVVTの短縮を認めた。(b) 精製β2GPIを血漿に加えてRVVTを測定した。先天性β2GPI欠損血漿(●)は健常血漿(○)と同様にβ2GPIの濃度依存性にRVVTの延長を認めたが、正常β2GPI濃度をこえるβ2GPIを添加してもRVVTは正常化しなかった。

D. 考察

本研究では先天性β2GPI欠損症は血栓傾向、出血傾向のいずれも認められないことが示された。RVVTの短縮が唯一の異常所見であったが、ラッセル蛇毒は非生理的に強力な第X因子のアクチベータであり、その解釈は難しい。ラッセル蛇毒のように極めて強力で凝固カスケードが活性化される機序が存在する場合にはβ2GPIが有為とその抑制をしているのかもしれない。しかしながら正常以上の濃度のβ2GPIを添加してもβ2GPI欠損血漿のRVVTは正常化しなかったため、このRVVT短縮にはその他の要因が存在していることも明白である。ただし実際に生体内トロンビン生成のマーカーがすべて正常範囲であるので、少なくとも平常時には先天性β2GPI欠損症には過凝固状態(トロンビン過剰産生状態)は存在しないと考えられる。

β2GPIはin vitroでは強力なプロテインC系の抑制因子である。フリープロテインSはプロテインCの補酵素として重要な作用をもつが、C4b結合蛋白(C4BP)と結合すると補酵素活性を失う。β2GPIはフリープロテインSとC4BPの親和性を抑制して結果的にフリープロテインSを増加させるとされるが[4, 5]、β2GPI欠損では総プロテインS、フリープロテインS(従ってC4BP結合プロテインSも)は正常範囲であり、上記のin vitroでの観察は生体内では有為でないかまたは別のフリープロテインSの制御機構が存在する可

能性を示した。活性化プロテインCによる第Va因子不活化の抑制はもっともよく知られたin vitroのβ2GPIの機能のひとつであるが[3, 6]、予想に反してβ2GPI欠損血漿の活性化プロテインCへの反応は正常であった。

第XII因子活性化のβ2GPIによる抑制も複数の報告がある[7, 8]。第XII因子活性化は内因系凝固および内因系線溶両者の開始反応であり、極めて重要なステップである。本研究では内因系線溶能も併せて検討したが、先天性β2GPI欠損血漿の内因系線溶能は健常血漿と差がなかった。

E. 結論

少なくとも今回検討した範囲では先天性β2GPI欠損症には血栓傾向、出血傾向は認めなかった。これまで報告されてきたin vitroのβ2GPI活性は生体内では重要な役割をもっていないか、あるいは別の代償機構が存在してβ2GPI欠損を補っている両者の可能性が考えられた。以上よりAPSの血栓形成機序は、抗カルジオリピン抗体(抗β2GPI抗体)によるβ2GPIの二次的欠損が原因であると単純に考えることができないことが示唆された。

F. 参考文献

1. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize b2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. J Exp Med 1994;179:457-62.

2. Koike T, Matsuura E. Immunology of antiphospholipid antibodies. in "Systemic Lupus Erythematosus". ed. R. Lahita, Academic Press, 1999:813-27.
3. Ieko M, Ichikawa K, Triplett DA, Matsuura E, Atsumi T, Sawada K et al. Beta2-glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis Rheum* 1999;42:167-74.
4. Atsumi T, Khamashta MA, Ames PRJ, Ichikawa K, Koike T, Hughes GRV. Effect of b2glycoprotein I and human monoclonal anticardiolipin antibody on the protein S / C4b-binding protein system. *Lupus* 1997;6:358-64.
5. Merrill JT, Zhang HW, Shen C, Antonov IV, Lahita RG, Myones BL. Fluid phase interaction between the anticoagulant protein S and b2-glycoprotein I: inhibition of protein S capture by immobilized C4b binding protein. *Arthritis Rheum* 1997;40:S300(Abstract).
6. Mori T, Takeya H, Nishioka J, Gabazza EC, Suzuki K. b2-glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protien C on the phospholipid surface. *Thromb Haemost* 1996;75:49-55.
7. Schousboe I, Rasmussen MS. Synchronized inhibition of the phospholipid mediated autoactivation of Factor XII in plasma by b2-glycoprotein I and anti-b2-glycoprotein I. *Thromb Haemost* 1995;73:798-804.
8. McNally T, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. beta 2 glycoprotein-I inhibits factor XII activation on triglyceride rich lipoproteins: the effect of antibodies from plasma of patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1996;76:220-5.

ステロイド性骨壊死症の血栓形成機序解明における臨床的・実験的研究

久保俊一

(京都府立医科大学整形外科・助教授)

A. 研究目的

難治性骨疾患である骨壊死症はステロイド治療によりしばしば経験するものであるが、その機序は明確にされていない。その発生には、血液凝固異常による血栓形成が関与していると考えられるが、その詳細は不明であり、これを解明できれば、骨壊死症の予防にもつながる。本研究では、臨床的には腎移植後のステロイド壊死症を対象とし、実験的にはウサギ骨壊死モデルを対象として、骨壊死症における血栓形成機序の解明をめざした。

B. 研究方法

1. (臨床的研究) 京都府立医大第2外科で治療され、同意の得られた腎移植患者を6名を対象とした(表1)。移植直後より、血栓形成に関与する各種の因子(TAT, fibrin monomer, Ddimer, fibrinogen, FDP, PIC)を測定した。壊死発生の有無はMRIにより判別した。

2. (実験的研究) 体重約3.5kgの日本白色家兎10羽を、コントロール5羽(group A)と、メチルプレドニゾロン4mg/kgを週1回、4週間投与したステロイド投与家兎モデル5羽(group B)に分け、比較検討した。これらを安楽死させた後、直ちに大腿骨を摘出して10%ホルマリンで固定し、EDTAで脱灰、パラフィン包埋の後、H-E染色を施行し、大腿骨近位の骨髄および骨内血管を観察した。また同一の標本において、血管内皮細胞上の膜蛋白であり、血液凝固阻止因子であるthrombomodulinをABC法による免疫組織化学法で染色し、大腿骨近位の骨内血管における発現を観察した。使用抗体はADI社の抗ウサギthrombomodulin抗体を用いた。

C. 研究結果

1. (臨床的研究) 結果を表2から表7までに示す。Ddimer, TAT, およびfibrin monomerで個人差がみられた。特に、fibrin monomerで大きく変動する例がみられた。しかしながら、MRIの検索では、大腿骨頭壊死症

に特異的なband像は全例に観察されなかった。従って、壊死群と非壊死群2群に分けて比較することはできなかった。

2. (実験的研究) H-E染色標本では、group Aに比べgroup Bでは、骨髄に占める造血細胞の割合が低下し、脂肪細胞の割合が増加していた。またgroup Bでは、sinusoidは拡張し、間質への血漿成分の漏出がみられた。しかし、細動脈や毛細血管、sinusoidに明らかな変性所見や血栓形成は認められなかった。抗ウサギthrombomodulin抗体による免疫組織染色の観察によると、大腿骨近位のmetaphysisからdiaphysisにおいて、group Aでは細動脈やsinusoidの血管内皮細胞が十分に染色されているのに対し、group Bではすべての検体で血管内皮細胞の染色性が著しく低下していた。

D. 考察

(臨床的研究) 腎移植患者を対象として、移植直後(ステロイド投与開始)から、定期的に、MRIでmonitorしたprospective studyでは、壊死発生が従来考えられていたよりも、きわめて早期に発生することが明らかにされている(文献1)。すなわち、MRIの画像上、壊死に特異性のあるband像がもっとも早期のものでは移植後5-6週において検出された。壊死発生からMRIのband像発現までに、約4週間のintervalがあることを考慮すると、移植後かなり早期に血栓形成による阻血性壊死の生じていることが推察できる。そのため、今回の臨床研究では、各種の凝固系に関連する因子の測定は、移植直後から移植後2カ月までとし、2週間隔で測定した。今回の結果、Ddimer, TAT, およびfibrin monomerで個人差がみられた。特に、fibrin monomerで大きく変動する例がみられた。凝固に関連する因子において、個人差があった事実はきわめて興味深い。壊死症例が検出できなかったため、壊死群と非壊死群の2群間で比較はすることができなかった。今後の症例の蓄積が必要と考えている。

(実験的研究) 今回の結果から、あくまで定性的な評価ではあるが、ステロイド投与が血管内皮における thrombomodulin 発現を低下させていることが明らかになり、内皮レベルにおける抗血栓性が低下していることが示された。このような作用が、ステロイドによる直接の内皮細胞への作用なのか、それとも、高脂血症などに続発した二次的作用なのかは不明であるが、ステロイドが骨内血管において一種の血栓準備状態を形成させる原因となっていることは血栓形成機序を考える上で重要な知見である。

E. 結論

腎移植の患者を対象とした臨床的研究では今後症例を積み重ねることで、各種の凝固関連因子の変動を壊死症例と非壊死症例で比較し、壊死症例での特徴を明らかにしていく必要がある。

実験的研究では、今回みられた変化がはたして骨内だけに特異的にみられる変化なのか(全身の血管にもみられる変化なのか)、経時的には回復しうるのか、あるいは thrombomodulin により活性化される proteinC の活性低下がみられるのかなどについて検索するのが今後の課題と考える。

F. 参考文献

1. Toshikazu Kubo, Shoichi Yamazoe, Nobuhiko Sugano, Mikihiro Fujioka, Shoji Naruse, Norio Yoshimura, Takahiro Oka, Yasusuke Hirasawa: Initial MRI Findings of Non-Traumatic Osteonecrosis of The Femoral Head in Renal Allograft Recipients. Magn. Reson. Imaging. 15:1017-23, 1997
2. Matsumoto T, Kabata T, Nishino M, Horii T, Kitajima I, Kubo T, Tomita K. Histopathological and immunohistochemical study of femoral bone and bone marrow tissue in steroid treated rabbits. J Newrol Orthop Med Surg in press.

表 1. 腎移植症例

	症 例	性	年 齢	原 疾 患
1.	AS	Female	33	DN 腎症
2.	TY	Male	29	DN 腎症
3.	TJ	Male	29	ネフローゼ
4.	KY	Male	35	—
5.	TK	Male	45	糸球体腎炎
6.	FY	Male	47	急性腎炎

表 2. TAT

症例	TAT (術前)	TAT(po2)	TAT(po4)	TAT(po6)	TAT(po8)
1.	2.4	1.8	1.5	.	.
2.	3.6	1.9	1.7	2.5	2.1
3.	1.7	2.1	3.1	3.7	2.5
4.	4.4	3.9	4.0	4.6	.
5.	2.0	3.2	3.4	.	.
6.	2.9	.6	1.0	.	.

表 3. fibrin monomer

症例	FM (術前)	FM(po2)	FM(po4)	FM(po6)	FM(po8)
1.	0.0	.4	.1	.8	.
2.	1.1	.8	12.2	0.0	.4
3.	0.0	1.0	1.8	1.6	2.8
4.	.2	.4	2.0	3.1	.
5.	4.5	22.2	2.2	.	.
6.	.6	2.3	0.0	.	.

表 4. Ddimer

症例	Dd (術前)	Dd(po2)	Dd(po4)	Dd(po6)	Dd(po8)
1.	1.0	1.1	0.0	.	.
2.	4.3	1.7	1.0	0.0	1.0
3.	1.0	1.8	0.0	0.0	0.0
4.	3.7	4.1	4.4	5.4	.
5.	1.0	1.2	2.0	.	.
6.	0.0	.	2.6	.	.

表 5. fibrinogen

症例	fibrn (術前)	fibrn(po2)	fibrn(po4)	fibrn(po6)	fibrn(po8)
1.	250	213	230	.	.
2.	370	280	347	259	261
3.	326	230	135	226	321
4.	217	240	228	204	.
5.	253	183	228	.	.
6.	321	187	219	.	.