

8. Beg A.A., D. Baltimore: An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 274: 782, 1996
9. Liu Z-G, H. Hsu, D. Goeddel, M. Karin: Dissection of TNF receptor 1 effector function: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* 87: 565, 1996
10. Wang C-Y, M.W. Mayo, A.S. Balwin Jr.: TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* 274: 784, 1996
11. Van Antwerp DJ, S.J. Martin, T. Kafri, D.R. Green, I.M. Verma: Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 274: 787, 1996
12. Baeuerle PA, D. Baltimore: NF- κ B: ten years after. *Cell* 87: 13, 1996
13. Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355, 1997

CD40-CD40L相互作用のブロックによるマウス自己免疫性病変の抑制

菅井 進 (金沢医科大学血液免疫内科)

崔 国惠 (金沢医科大学血液免疫内科)

【研究要旨】

SLEとSSのモデルマウスであるNZB/WF1マウスで、CD40-CD40L相互作用をブロックすることを目的に抗CD40L抗体を投与し、自己免疫性病変に対する影響を調べた。さらに、免疫抑制剤FK506を投与した群との比較を行った。方法：18週令の雌NZB/WF1マウスに、抗CD40L抗体、又はFK506をI.Pした。結果：28週令で抗体治療群の8匹中7匹で自己免疫唾液腺炎、肺のリンパ球浸潤が著明に抑制された。唾液腺のリンパ球浸潤巣ではB細胞の比率が有意に低下し、CD40の発現率の低下も認められた。腎病変について尿蛋白が減少し、糸球体の面積と細胞数に有意な減少が認められた。さらに、脾臓B細胞とCD40の発現率の低下が認められた。FK506投与では唾液腺炎と腎炎を抑制することが出来た。結論：抗CD40L抗体の投与によりB細胞の増殖が抑制され、自己免疫性唾液腺炎などの病変の発症、進展が抑制され、FK506よりも有効であったと考えられた。

【研究目的】

CD40-CD40Lの相互作用は自己免疫疾患の発症において、重要な役割を果たしていることが最近の研究で明らかになりつつある。CD40Lに対する抗体の投与により、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチなどの疾患の発症と進展が抑制されることが報告された。我々はSLEとSSのモデルマウスでもあるNZB/WF1マウスに抗CD40L抗体を投与し、CD40-CD40L相互作用をブロックすることにより、その自己免疫性唾液腺炎、肺リンパ球浸潤、腎病変に対する抑制効果を検討する。また比較としてFK506を投与して、唾液腺、肺、腎に対する効果を検討した。

【研究方法】

1. 抗CD40L抗体の投与方法：雌NZB/WF1マウス治療群と対照群は各8匹ずつとした。18週より週3回、22週よりは週1回、計10週抗CD40L抗体（ハムスターIgG）を50 μ g/回、腹腔内に投与した。対照群は治療群と同じ用法、用量でハムスターIgGを投与した。
2. FK506の投与方法：雌NZB/WF1マウス治療群と対照群は各10匹ずつとした。治療群には18週より週3回、計10週間FK506を毎回2.5mg/kg、腹腔内に投与した。対照群は治療群と同じ用法、用量でplacebo（FK506の溶媒）を投与した。
3. 尿蛋白の測定：28週令でマウスを解剖する前に尿を採取し、エームス尿検査試験紙で尿蛋白を測定した。
4. 組織学的検討：28週令でマウスを解剖し、両側唾液腺、腎臓、肺の一部のパラフィ

ン切片を作製し、HE染色で分析した。唾液腺と肺については浸潤したリンパ球のfocusスコアを算定した。腎臓についてはCAS200イメージサイトメーターを使って、各糸球体の面積と細胞数を計り、1検体につき20個の糸球体を計測した。また腎盂のリンパ球浸潤巣の面積を計測した。

5. 浸潤リンパ球病巣の免疫組織学的検討：腎臓，唾液腺の凍結標本について，連続切片を作製し，リンパ球浸潤巣のCD4，CD8，B220マーカーとCD40をstreptavidin-biotin複合体法を用いて解析した。結果はCAS200イメージサイトメーターで解析した。

6. 脾臓CD40とCD40Lの発現：赤血球を除去した脾単細胞浮遊液のCD4，CD8陽性Tリンパ球の比率，B220によるBリンパ球の比率とCD40陽性Bリンパ球の比率を解析した。又，抗CD3抗体でT細胞の活性化前後Tリンパ球上のCD40Lの発現率を調べた。

【結果と考察】

NZB/WF1マウスは19週より自己免疫性唾液腺炎の発症が始まり，涙腺，肺，腎間質にもリンパ球の浸潤が高頻度に観察される。我々はNZB/WF1マウスで病変の出現前の18週より抗CD40L抗体を投与し，28週令で病変を検索した。対照群マウスの唾液腺では導管周囲にリンパ球の浸潤巣が多数認められた（図1a）。抗CD40L抗体投与群では8例中4例でリンパ球浸潤巣は全く認められなかった。3例で導管周囲にリンパ球の小浸潤巣が認められた（図1b）。抗体投与群ではリンパ球浸潤のFocusスコアが 0.087 ± 0.141 で，対照群は 1.771 ± 0.834 であり，有意な減少が認められた（ $p = 0.002$ ）。肺病変については対照群では気管支，細気管支又は血管周囲にリンパ球の大きな浸潤巣が認められたが（図1c），抗CD40L抗体投与群の病変は明らかに軽減した（図1d）。浸潤リンパ球のFocusスコアは抗体投与群では 0.309 ± 0.379 で，対照群は 2.038 ± 1.410 であり，有意な減少が認められた（ $p < 0.05$ ）。腎病変について対照群の糸球体では中等度から高度のメサンギウム細胞の増殖と基質の増生がみられ（図1e），WHO lupus腎炎分類の4に相当し，8例中2例に腹水を認めた。抗CD40L抗体投与群では8例中7例でメサンギウム細胞の増殖は著明に軽減した（図1f）。糸球体の平均細胞数と平均面積はともに抗CD40L抗体投与群では有意な減少が認められ，尿蛋白も有意な減少が認められた。Earlyらは抗CD40L抗体を投与することによってNZB/WF1マウスのループス腎炎の進展が抑制され，生存期間の延長がみられたと報告した⁽¹⁾。又，彼等は血清中の抗-抗CD40L抗体を測定し，抗-抗CD40L抗体が産生されることが治療群にまれにみられる治療失敗例の原因と考えている。本論文では治療群8匹中1匹が無効例であり，抗-抗CD40L抗体の産生が治療失敗の一つの原因かもしれない。

MohanらはSLEのモデルマウスでもあるSWRxNZB(SNF1)マウスに対して，3回のみ抗CD40L抗体を投与し，抗DNA抗体の産生が抑制され，ループス腎炎の発症が長期間抑制される効果があると報告した⁽²⁾。また，彼らはSNF1マウスの脾臓CD40Lの発現率は正

常のSWRマウスより高かったと報告した。我々はNZB/WF1マウスで抗CD40L抗体投与群と対照群の脾臓CD40Lの発現率は有意な差が認められなかったが、抗体投与群のB細胞の比率は32.9%で、対照群の43.9%より有意に減少を示した。これはCD40の発現率と合わせ著明な低下であった。

免疫染色の解析では唾液腺の浸潤巣については、抗CD40L抗体投与群と対照群共にCD4⁺T細胞が優位であった。B細胞の平均比率は抗体投与群では16.2±4.8で、対照群の29.5±9.1に比べ有意な減少が認められ、CD40の発現率も低かった。個々の浸潤巣について、対照群の17箇所、浸潤巣においてB細胞とCD4、CD8の比0.7以上は9箇所であり、抗CD40L抗体投与群の6箇所中では0箇所であった。このことは抗体の投与でCD40-CD40Lの相互作用がブロックされることによりB細胞の増殖が抑制され、病変の発症、進展が抑制されたことによると考えられた。

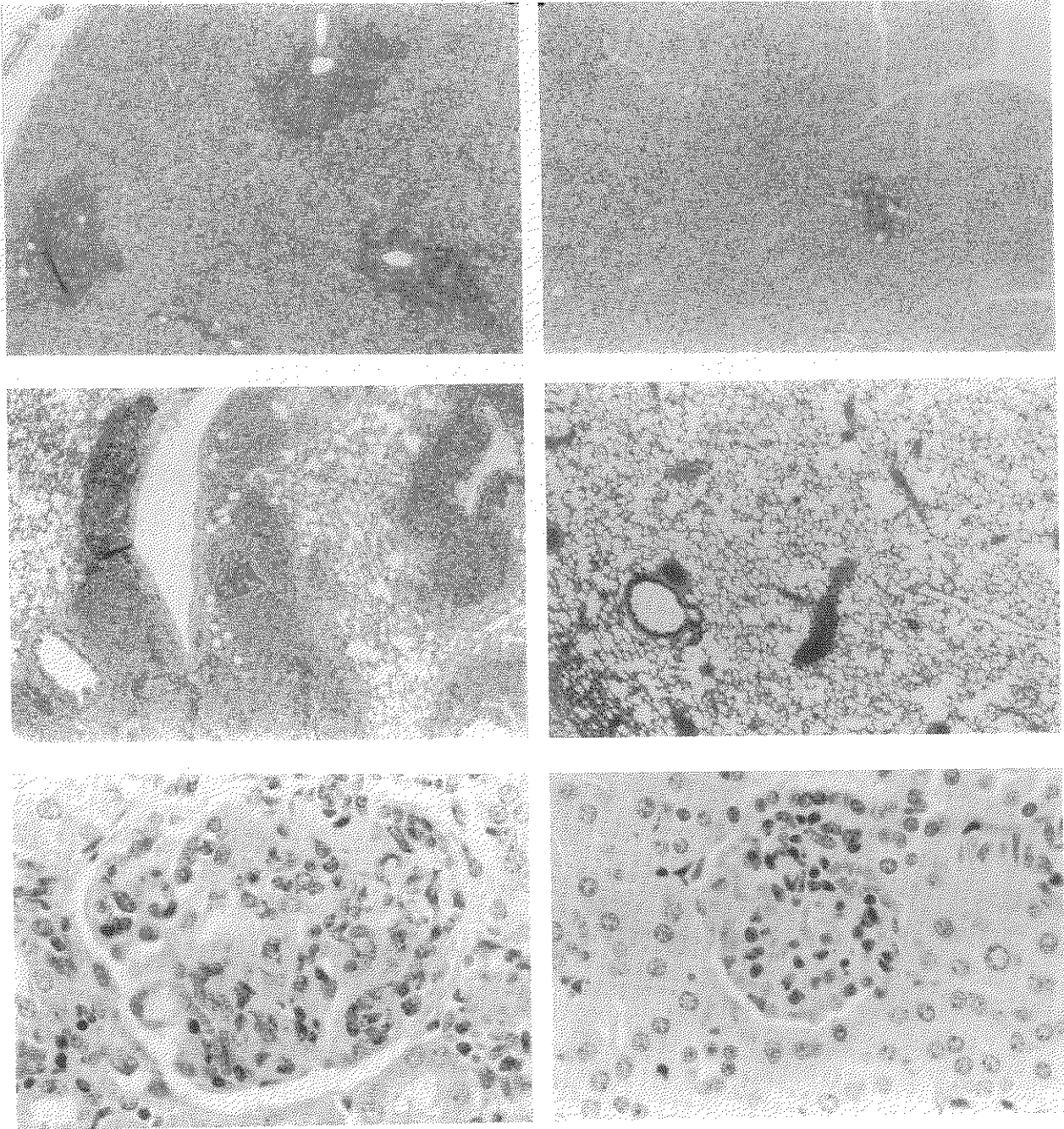
一方、FK506投与群では唾液腺導管周囲に浸潤リンパ球のFocusスコアは0.608±0.624で、Placebo投与群ではFocusスコアは1.752±2.324であり、有意な減少が認められた(p=0.018)。腎病変については、対照群に比べて、軽度ながらFK506投与群はメサングウム細胞の増殖が軽減し、糸球体細胞数に有意な減少が認められ、糸球体面積は減少傾向があったが、有意な差ではなかった。尿蛋白も対照群より有意な減少が認められ、Takabayashiらの報告と一致した⁽³⁾。FK506の作用機序は主にIL-2の産生を抑制し、その作用はシクロスポリンの約100倍であり、T細胞の活性化や増殖を抑制する。今回の実験ではNZB/WF1マウスに対してFK506が自己免疫性唾液腺炎を抑制することが証明されたが、抗CD40L抗体投与はFK506治療効果と比べ優れていることが判明した。

【結論】

抗CD40L抗体投与によって、マウスの自己免疫性唾液腺炎、肺リンパ球浸潤、腎病変を著明に抑制することができた、CD40-CD40Lの相互作用がブロックされることによりB細胞の増殖が抑制され、病変の発症、進展が抑制されたと考えられた。人のシェーグレン症候群に於ても抗体投与による治療への応用の可能性が示唆された。

【参考文献】

1. Early, G. S., Zhao, W., Burns, C. M., et al.: Anti-CD40 ligand antibody treatment prevents the development of lupus-like nephritis in a subset of New Zealand Black × New Zealand White mice. *J. Immunol.* 157: 3159-3164, 1996.
2. Mohan, C., Shi, Y., Laman, J. D., et al.: Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J. Immunol.* 154: 1470-1480, 1995.
3. Takabayashi, K., Koike, T., Kurasawa, K., et al.: Effect of FK-506, a novel immunosuppressive drug on murine systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 51: 110-117, 1989.



a	b
c	d
e	f

図1. 抗CD40L抗体治療群と対照群の28週令の唾液腺、肺と腎糸球体における光学顕微鏡的所見。a、b：唾液腺，c、d：肺，e、f：腎糸球体。（HE染色，a、b、c、d：40倍，e、f：400倍）

ファージ・ディスプレイによる抗イディオタイプ抗体のエピトープ解析

菅井 進 (金沢医科大学, 血液免疫内科)

正木康史 (金沢医科大学, 血液免疫内科)

【研究要旨】抗イディオタイプ (Id) 抗体 A-SF18/2は、シェーグレン症候群 (SS) 患者の血清やリンパ球に高率に反応し、合併した悪性リンパ腫 (ML) にも反応する。この抗体のエピトープが、SSに合併するMLの発生機序を解明する上で重要と考えクローニングを行なった。SS患者の骨髄よりファージ・ディスプレイ型抗体Fabライブラリーを作成し、A-SF18/2に対してファージ・パンニングを行ない、結合するクローンの反応性およびシークエンスを検討した。計5つ (STSF κ -1,2,3,6,8) のFabクローンが得られ、うち1,2,8は軽鎖遺伝子を有しなかった。3はA-SF18/2に強く結合したが、オバルブミンやヒトおよびマウスのIgG-Fcにも結合した。CDR3領域のアミノ酸配列には明らかな共通性が認められなかった。この方法によりId抗体のエピトープを決定でき、Idネットワークの理解にも役立つであろう。

【研究目的】SSにはB細胞性MLやM蛋白血症等のリンパ増殖性疾患 (LPD) の発生が多い事が知られている。我々の作成したマウス・モノクローナル抗ヒトId抗体 A-SF18/2 (高 γ グロブリン血症性紫斑病、過粘稠症候群、IgA- λ 型のM蛋白血症を有するSS患者SF由来) は自己のM蛋白と反応するほかに、幅広い交叉反応性を呈した。この抗体はIgA- λ 単クローン性RFに対して作製されたにもかかわらず、IgM- κ のリウマトイド因子 (RF) や κ 鎖および μ 鎖にも反応し、またRF活性の無いM蛋白とも反応した。SF18/2-Idは単クローン性RFの11例中4例 (36%)、RF活性を有しない単クローン性血清の11例中2例 (18%)、SS患者血清の70例中20例 (29%) に認められたが、一方健常人では共通Idを認めたものは31例中2例 (6%) のみであった。更に、SS患者の末梢血リンパ球の膜表面にSF18/2-Idが26.7%認められ、健常人に比し優位に高率であった。これらの結果より、SF18/2-IdはSS患者に多く認められ、RF陽性率やLPDの発生が高率に認められることの一つの原因となっている可能性がある。従って、この抗体のエピトープを決定することは、SSおよびそこから発症するMLの機序を解明する上で重要である。近年ファージ・ディスプレイ型のコンビナトリアル抗体Fabライブラリーが開発され、ヒト型のモノクローナル抗体の発現クローニングが可能となった。今回我々は、この方法を用いてA-SF18/2のエピトープ・クローニングを行なったので報告する。

【研究方法】慢性関節リウマチ、Felty症候群、二次性SS (後にMLを発症し死亡) であり、検査所見では抗核抗体 $\times 160$ (Speckled)、RF $\times 10000$ で、かつ血清がELISA法でA-SF18/2に強陽性に反応する患者の骨髄RNAより、コンビナトリアル抗体Fabライブラリーを構築した。まず、RNAよりcDNA合成後に各々数組のPCRにて軽鎖および重鎖Fd部分を増幅した。制限酵素処理 (重鎖はXho1, Spe1、軽鎖はXba1, Sac1) の後に、pComb3ベクターに順次組み込みコンビナトリアルFabファージミド・ライブラリーを構築した。更に、M13系ヘルパー・ファージを感染させる事によりファージ・ディスプレイ型のライブラリーへ転換した。

次に、A-SF18/2に対するクローンの選別は、以下の方法で行なった。まず、A-SF18/2をコートしたELISAプレートにライブラリーのファージ溶液を反応させ、非特異的なファージを洗い除いた後、特異的に反応しているファージを酸にて溶出し、大腸菌 (XL1 blue)

に感染させ増幅後、M13 ヘルパー・ファージにて救済し、再度ファージを抽出し、この作業を6ラウンド繰り返した (Panning)。最終ラウンド後の大腸菌よりDNAを抽出後、GeneIII遺伝子部分を制限酵素 (NheI, SpeI) にて切断した後、セルフ・ライゲーションし、再度大腸菌 (XL1 blue) にトランスフォームし、数十クローンのコロニーを増幅した。大腸菌のペレットを凍結/融解し、可溶性のFabを含むライゼートを作成し、ELISAにてA-SF18/2に反応するクローンをスクリーニングした。

得られたFabクローンは6×His-tagを持つため、Ni-NTA Spin Kit (QIAGEN) にて精製した。精製したFabを10 μg/mlより段階希釈し、A-SF18/2および、オバルブミン、ヒトIgG-Fc、マウスIgG-Fcとの反応性を検討した。

DNAシーケンスは、重鎖はT3 (Forward Primer) とGz (Backward Primer) を、軽鎖はKEF (Forward Primer) とKb (Backward Primer) を用いて、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitにて行ない、各々Forward PrimerとBackward Primerによる結果をコンピューター上で合成した。

【結果と考察】 計5クローンのFab; SFST κ-1,2,3,6,8が得られた。このうちSFST κ-3はA-SF18/2と強い親和性を有していたが、オバルブミン、ヒトIgG-Fc、マウスIgG-Fcとも交叉反応性を示した (図1)。

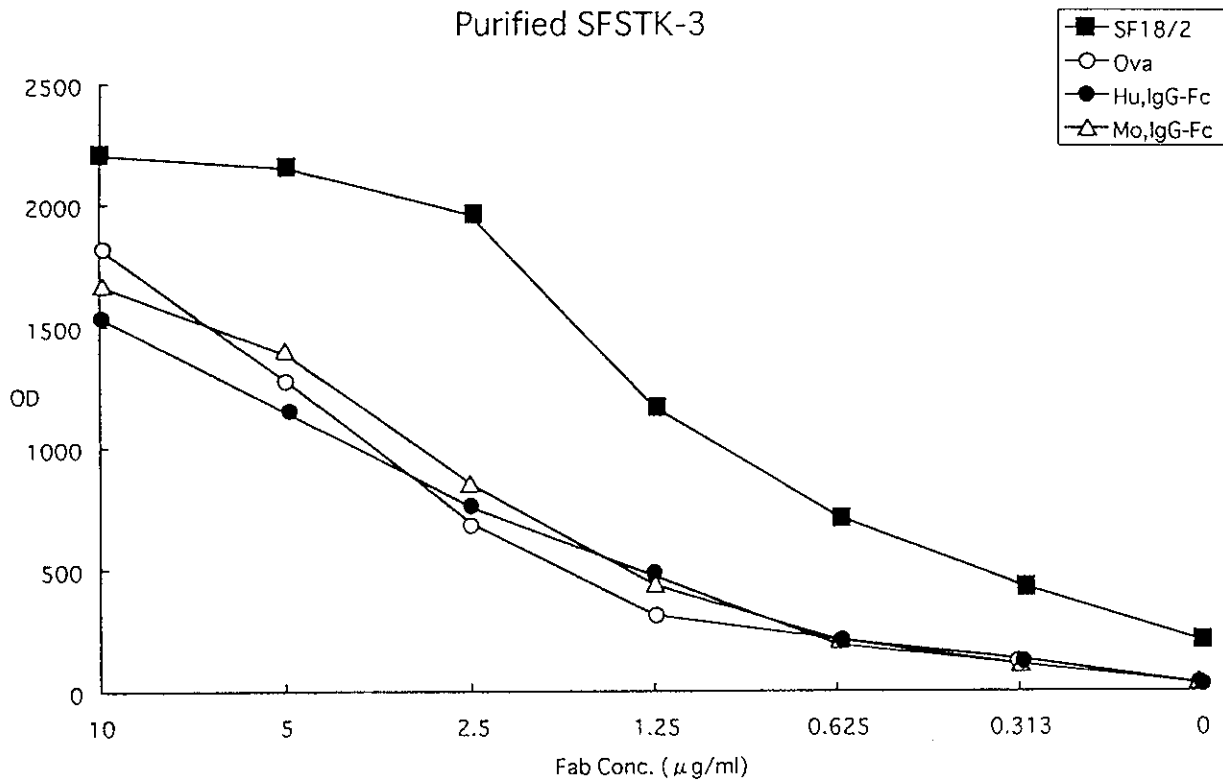


図1

一方、SFST κ-1,2,6,8はA-SF18/2との親和性は弱かったが交叉反応性は無かった。また5つのFabクローンの全てが重鎖遺伝子を有していたが、軽鎖遺伝子はSFST κ-3と6のみにあり、1,2,8は軽鎖がなかった。重鎖のみでも親和性を認めたクローンがあることから、A-SF18/2は重鎖および軽鎖のどちらか一方にでも結合しうる事が示唆された。最も近い Germline 遺伝子は、重鎖はSFST κ-1がDP-77/WHG16、2がDP-47/V3-23、3がDP-38/9-1、6がDP-47/V3-23、8がDP-50/hv3019b9であり、2と6が共通で、また全てVH3 subgroupであった。一方、軽鎖のGermlineはSFST κ-3および6が共に最も近いのがDPK22/A27で、2番目に

近いものが前述のVgであった。また、抗体の抗原特異性はCDR3領域が重要とされているため、各クローンのCDR3領域を比較したところ、重鎖ではSFST κ -1；DRGMYSSGT、2；QGSGWHHDA、3；ARLGYGRAL、6；DPTYYGDFGG、8；DDGGSであり、軽鎖では3；QNYGNSP、6；QQYSRSPで明らかな共通性は認められなかった。従って、A-SF18/2は免疫グロブリンの特定のアミノ酸配列（一次構造）ではなく、何らかの立体構造を認識している可能性が示唆された。SFST κ -3のように強い親和性を有するクローンがもっと多く得られれば、結合するエピトープを更にはっきりと同定できると考えられ、現在当研究を継続中である。

【結論】 フェージ・ディスプレイ型のコンビナトリアル・ライブラリーから、抗Id抗体に結合する抗体Fabクローン；抗-抗Id抗体が得られる事が明らかとなった。この方法を用いることにより、抗Id抗体のエピトープを同定でき、Idネットワークや自己抗体産生の機序に対する理解を深められるであろう。

【参考文献】

1. Shimizu S, Sugai S, Imaoka T, et al. Monoclonal anti-idiotypic antibodies against monoclonal rheumatoid factors derived from patients with Sjögren's syndrome. *Scand.J.Rheumatol.* 1986; Suppl 61: 106-110.
2. Sugai S, Shimizu S, Tachibana J, et al. Monoclonal-gammopathies in patients with Sjögren's syndrome. *Jpn.J.Med.* 1988; 27: 2-9.
3. Sugai S, Shimizu S, Tachibana J, et al. A high incidence of rheumatoid factor idiotypes in monoclonal proteins in the serum and in lymphoma cells in patients with Sjögren's syndrome. *J.Autoimm.* 1989; 2: 471-476.
4. Sugai S, Saito I, Masaki Y, et al. Rearrangement of the rheumatoid factor-related germline gene Vg and bcl-2 expression in lymphoproliferative disorders in patients with Sjögren's syndrome. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1994; 72: 181-186.
5. Burton DR. Monoclonal antibodies from combinatorial libraries. *Acc.Chem.Res.* 1993; 26: 405-411.

SLEにおけるTh1・Th2関連サイトカインと病態に関する研究

橋本博史（順天堂大学 膠原病内科）

戸叶嘉明（順天堂大学 膠原病内科）

金子博行（順天堂大学 膠原病内科）

森本真司（順天堂大学 膠原病内科）

高崎芳成（順天堂大学 膠原病内科）

【研究要旨】急性期SLE患者のTh1・Th2関連サイトカインを血中及びT細胞の細胞質染色で測定し、病態との関連を検討した。血中ではIL-6, IL-13を中心とするTh2関連サイトカインが主体であったが、CD4陽性細胞に関してはTh1関連サイトカイン産生細胞の比率が高かった。Th1関連サイトカインが高い症例ではIL-12が高値で肺病変が多い傾向が見られた。

【研究目的】これまでSLEではIL-2, γ IFN, IL-6, IL-10等のサイトカイン異常が報告されてきた。IL-2に関しては、産生能は低下しているが、血中は増加しており（1）、また、 γ IFN（2）、IL-6（3）、IL-10（4）の増加を認め、これらのサイトカインが病態に関わっている可能性を示唆している。しかしながら、サイトカインは近年ネットワークとして捉えられ、単一のサイトカインでは語れなくなっている。これまでの報告は個々の単一のサイトカインの報告のため、サイトカイン間の相互関係は明らかでなかった。一方、これらのサイトカイン産生細胞に関しては当初CD4陽性T細胞と考えられていたが、その後の研究でB細胞、マクロファージ等の関与も示唆されてきた。本研究ではこれらの点を明らかにする目的で、急性期のSLE患者の血中のTh1・Th2関連サイトカインを測定し、さらに細胞質染色を用いてT細胞のTh1・Th2関連サイトカインも検討した。

【研究方法】急性期で活動性の高い（SLEDAIで8ポイント以上）ACRの診断基準を満たすSLE69例を対象とした。血中の各サイトカイン（IL-2, γ IFN, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13）は反応部位の異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサイドイッチELISA法で測定した。細胞質染色はTh1関連サイトカインとして γ IFNを、Th2関連サイトカインとしてIL-4を用いた。末梢血単核球をPMA, ionomycinの元で37°Cにて2時間培養後、GolgiPlugを加える。2時間後、細胞表面染色の後、Cytotfix, Permwashを反応させた後、細胞質染色を行う。細胞表面及び細胞質の多重染色により、CD4あるいはCD8陽性細胞あたりの γ IFNあるいはIL-4の比率からTh1/Th2細胞のバランスを求めた。

【結果と考案】

1. 血中サイトカイン

急性期 SLE 患者さんの血中サイトカインを ELISA 法で測定すると、表 1 に示すように Th1 関連サイトカインに関しては γ IFN が有意に高値を認め、IL-2 も高値の傾向を示した。一方、Th2 関連サイトカインに関しては IL-6, IL-13 が有意に高値を示し、IL-10 も高値の傾向を示した。IL-4 は正常人と差を認めなかった。このように、急性期 SLE 患者では γ IFN を中心とする Th1 関連サイトカイン及び IL-6, IL-13 を中心とする Th2 関連サイトカインの増加が認められたが、症例によりばらつきが見られた。そこで、各種サイトカインの増加パターンによりグループに分けると、約 70% の症例は Th2 関連サイトカインだけが高値を示したのに対して、残り 30% の症例は Th1・Th2 関連サイトカイン両方が増加していた。一方、臨床所見との関連を調べると、表 2 に示すように、前者では腎症の頻度が多いのに対して、後者では肺病変が多い傾向が見られた。このように、SLE 患者における Th1・Th2 関連サイトカインは症例により多様性があり、これが病態の多様性に結び付いている可能性が示唆された。

さらに、Th1 関連サイトカインの調節に関与する IL-12 について検討してみると、表 3 に示すように IL-12 高値の症例では IL-13 が有意に低値で、 γ IFN が高い傾向を示し、Th1 関連サイトカインの増加に IL-12 が関与している可能性が示唆された。

一方、これらのサイトカインの産生細胞として、T 細胞、マクロファージ、B 細胞が考えられている。そこで、最も細胞数の多い T 細胞に絞り、Th1 あるいは Th2 サイトカインパターンを細胞質染色を用いて検討した。CD4 陽性 T 細胞に関しては、表 4 に示すように γ IFN/IL-4 が高値で Th1 細胞の比率が高かったが、CD 8 陽性細胞では正常人と差を認めなかった。この結果より、Th1 関連サイトカインの産生細胞として CD 4 陽性細胞の役割が大きいと思われるが、Th2 関連サイトカインに関しては産生細胞としてマクロファージ、B 細胞の関与が大きいと思われた。

【結論】

1. 急性期 SLE 血中の Th1/Th2 関連サイトカインを検討すると、約 70% の症例では IL-6, IL-13 を中心とする Th2 関連サイトカインだけが増加していたのに対して、残り約 30% の症例では Th1 関連サイトカインも増加していた。
2. Th2 関連サイトカインだけが高値の群では腎症を高頻度に認めたのに

対して、Th1 関連サイトカインも高値の群では肺病変の頻度が高く、両者は異なった病像を呈した。後者は IL-12 が高値を示し、Th1 関連サイトカインの増加に IL-12 が関与している可能性が示唆された。

3. CD 4 細胞の細胞質染色では Th1 関連サイトカインの産生細胞の比率が高く、Th2 関連サイトカインの産生は T 細胞以外で産生される可能性が示唆された。

【参考文献】

1. Huang N, Perrin LH, Miescher PA : Correlation of T and B cell activities in vitro and serum IL-2 levels in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 1988 ; 141 : 827-833.
2. Al-Janadi M, Al-Balla S, Al-Dalaan A, Raziuddin S : Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases. *J. Clin. Immunol.* 1993 ; 13 : 58-67.
3. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, OzeriChen T, Klinenberg JR. *J. Immunol.* 1991 ; 147 : 117-123.
4. Houssiau FA, Lefebvre C, Vanden Berghe M, Lambert M, Devogelaer J-P, Renauld J-C : Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* 1995 ; 4 : 393-395.

表 1 急性期 SLE 患者血中 Th1/Th2 関連サイトカイン

	SLE (n=69)	正常人 (n=12)	有意差
IL-2	17.2±5.4 pg/ml	13.1±1.9 pg/ml	
γ IFN	16.2±12.8	8.1±10.7	
IL-6	14.1±11.2	4.1±0.5	p<0.01
IL-10	9.8±8.2	4.0±0.9	
IL-13	19.0±10.7	0.1±0.01	p<0.0001

表 2 Th1/Th2 関連サイトカインのパターンと主要病変

	Th 2 増加	Th1・Th2 増加
腎症 (n=26)	23 例 (88.5%)	3 例 (11.5%)
CNS ループス (n=1)	0	1 (100%)
血小板減少 (n=3)	3 (100%)	0
溶血性貧血 (n=1)	0	1 (100%)
血管炎 (n=3)	3 (100%)	0
白血球減少 (n=3)	0	3 (100%)
皮疹 (n=7)	5 (71.5%)	2 (28.5%)
関節炎 (n=4)	3 (75%)	1 (25%)

表 3 IL-12 と Th1/Th2 関連サイトカイン

	IL-2	γ IFN	IL-6	IL-13
IL-12 高値群	30.2±10.2	46.9±33.4	19.1±24.3	76.0±82.5
正常群	28.2±9.2	10.5±14.0	12.6±22.0	304.0±264.1
有意差	p<0.05			

mean±S. D. pg/ml

高値群: IL-12>57.1pg/ml

表 4 CD 4 陽性 T 細胞の γ IFN, IL-4 の細胞質染色

	γ IFN/IL-4	
SLE (n=12)	7.7 ± 5.3 *	* ; p<0.05
正常人 (n=9)	4.8 ± 1.4	

1. Hashimoto H, Yamanaka K, Tokano Y, Iida N, Takasaki Y, Kabasawa K, Nishimura Y. HLA-DRB1 alleles and $\beta 2$ glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheum.* 1998;16(4):423-427.
2. Hashimoto H, Yano T, Kawanishi T, Tsuda H, Nagasawa T. Outcome of collagen vascular diseases by treatment with plasmapheresis. *Int Soc Apheresis.* 1998;2(4):268-272.
3. Sekigawa I, Kaneko H, Noh LP, Takeda-Hirokawa N, Akimoto H, Hishikawa T, Hashimoto H, Hirose S, Yamamoto, N, Kaneko Y. Differences of HIV envelope protein between HIV-1 and HIV-2: possible relationship to the lower virulence of HIV-2. *Viral Immunol.* 1998;11(1): 8-11.
4. Sugiyama M, Sekigawa I, Tokano Y, Iida N, Hashimoto H, Hirose, S. Effective treatment of autoimmune diseases with extremely low dose cyclosporine. *Jpn. J.Clin.Immunol.* 1998;21(1):20-28.
5. Ogasawara , Sekiya M, Murashima A, Hishikawa T, Tokano Y, Sekigawa I, Iida N, Hashimoto H, Hirose S. Very low-dose cyclosporin treatment of steroid-resistant interstitial pneumonitis associated with Sjögren's syndrome. *Clin Rheum.* 1998;17(2):160-162.
6. Haruta K, Kobayashi S, Hirose S, Hori A, Ohyanagi M, Tanaka M, Kawano T, Shirai T, Takasaki Y, Hashimoto H. Monoclonal anti-cardiolipin antibodies from New Zealand Black X New Zealand white F₁ mice react to thrombomodulin. *J. Immunol.* 1998;160(1):253-258.
7. Sugiyama M, Ogasawara H, Hishikawa T, Sekigawa I, Iida N, Hashimoto H, Hirose S. Effect of extremely low dose cyclosporine treatment on the thrombocytopenia in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1998;7(1):53-56.
8. Ogasawara H, Murashima A, Kaneko H, Hishikawa T, Tokano Y, Sekigawa I, Iida N, Hashimoto H. Effect of low-dose cyclosporin treatment on interstitial pneumonitis associated with Sjögren's syndrome. *Br J Rheum.* 1998;37(3):348-349.
9. Saito K, Sakurai J, Ohata J, Kohsaka T, Hashimoto H, Okumura K, Abe R, Azuma M. Involvement of CD40 ligand-CD40 and CTLA4-B7 pathways in murine acute graft-versus-host disease induced by allogeneic T cells lacking CD28¹. *J. Immunol.* 1998;160(9): 4225-4231.
10. Seki M, Ushiyama C, Seta N, Fukazawa T, Asakawa J, Takasaki Y, Hashimoto H. Apoptosis of lymphocytes induced by glucocorticoids and relationship to therapeutic efficacy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998;41(5):823-830.
11. Kobayashi S, Hashimoto H. A case of empty sella after steroid pulse therapy for nephrotic syndrome. *J Rheum.* 1998;25(4):822-823.
12. Ogihara T, Ando S, Kobayashi S, Hishikawa Y, Takasaki Y, Hashimoto H. A case of intestinal Behcet's disease in association with HLA-B27 and HLA-B51. *J J Rheum.* 1998; 8(1):89-92.
13. Takeda-Hirokawa N, Noh L, Akimoto H, Kaneko H, Hishikawa T, Hashimoto H, Sekigawa I, Hirose S, Yamamoto N, Kaneko Y. Effect of curdlan sulfate on the production of β -chemokines and cytokines. *AIDS Res Hum Retrovir.* 1998;14(9):723-725.

14. Takasaki Y, Ogaki M, Abe K, Takeuchi K, Ando S, Tokano Y, Kobayashi S, Sekigawa I, Tsuda H, Hashimoto H. Expression of costimulatory molecule CD80 on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheum.* 1998; 25(6):1085-1091.
15. Kitoh T, Ishikawa H, Sawada S, Koshino K, Tokano Y, Hashimoto H, Nakagawa S. Significance of stem cell factor and soluble KIT in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheum.* 1998;17(4):293-300.
16. Naito T, Takeda-Hirokawa N, Kaneko H, Sekigawa I, Matsumoto T, Hashimoto H, Kaneko Y. Role of chondran sulfate in the production of β -chemokines and interleukin-16. *Med Microbiol Immunol.* 1998;187(1):43-48.

SLE 患者活性化 CD4 陽性 T 細胞の Th1/Th2 バランス

橋本博史（順天堂大学、膠原病内科）

山田雅人（順天堂大学、膠原病内科）

平島美賀（順天堂大学、膠原病内科）

田村直人（順天堂大学、膠原病内科）

深沢 徹（順天堂大学、膠原病内科）

高崎芳成（順天堂大学、膠原病内科）

高梨 剛（順天堂大学、小児科）

八木田秀雄（順天堂大学、免疫学）

奥村 康（順天堂大学、免疫学）

松島綱治（東京大学、衛生学）

【研究要旨】マウスモデルでの成績をもとにヒトでも自己免疫疾患をはじめとする種々の疾患において、Th1/Th2 比が変動し、CD4 陽性 T 細胞が Th1 または Th2 いずれかの方向への極性化が起こっているか否かが追求されている。全身性エリテマトーデス（SLE）は、Th2 優位の疾患であるとの報告はあるが、未だ確証はない。近年、in vitro において Th1、Th2 のマーカーとして有用であると報告された CC ケモカインに属する CCR5/CCR4 を Th1/Th2 を区別する細胞表面マーカーとし、それぞれに対するモノクローナル抗体に抗 CD4 抗体、抗 CD45RO 抗体を加え、SLE 患者及び正常人の末梢血リンパ球及び胸水中リンパ球を flow cytometry により解析した。まず正常人末梢血リンパ球中の CD4 陽性 CD45RO 陽性細胞上における CCR5、4 の発現を検討したが各々の発現には明らかな偏りは認めず、CCR5、4 double positive の細胞はほとんど認めなかった。さらに CCR5、CCR4 陽性細胞をそれぞれ sorting 後、培養上清中のサイトカイン産生を測定したが、CCR5 陽性細胞培養上清中には Th1 サイトカインのみ認められ、CCR4 陽性細胞培養上清中には Th2 サイトカインのみ認められる事を確認した。次に CCR5、4 の発現を SLE 患者の末梢血 CD4 陽性 CD45RO 細胞上において検討したところ、CCR5 陽性 T 細胞の比率は、正常人との比較において有意に高値を示し、CCR4 陽性 T 細胞は低値を示す傾向を認めた。また、CCR5/4 比は SLE 患者では有意に高かった。治療前後での CCR5、4 の発現を比較すると、CCR4 の陽性率には有意差を認めないものの、CCR5 陽性細胞率が低下する症例を認めた。さらに、胸膜炎合併例の胸水中リンパ球の CCR5、4 の発現を検討したところ殆どは CCR5 を発現しており CCR4 を発現しているリンパ球は殆ど認めなかった。現在、CCR5、4 の発現と病態や治療効果とのより詳細な相関及び、lupus 腎炎合併例の腎臓に浸潤しているリンパ球上の CCR5/4 の発現を検討中であるが、Th1/Th2 のインバランスが

SLE の特定の病態に関与している可能性が示唆された。

【研究目的】全身性エリテマトーデス (SLE) は自己成分と反応する自己抗体が血清中に検出される臓器非特異的自己免疫疾患であるがその原因は不明である。1986 年、Mosmann らがマウスの系において CD4 陽性 T 細胞をサイトカイン産生パターンと機能から Th1 と Th2 細胞に分類して以来¹⁾、生体内の Th1/Th2 バランスの破綻が自己免疫疾患の発症に関与していることが示唆されている。事実、モデル動物においては SLE 発症のモデルである NZB/W F1 マウス²⁾ や、シェーグレン症候群 (SJS) 発症のモデルである ALY マウス³⁾ などの臓器非特異的自己免疫疾患モデルは Th2 介在自己免疫疾患モデルといわれている。逆に慢性関節リウマチ (RA)^{4) 5) 6)}、多発性硬化症⁷⁾、糖尿病⁸⁾ など臓器特異的自己免疫疾患モデルは Th1 介在自己免疫疾患モデルとされている。ヒトの免疫系は、マウスの場合ほど明確に Th1、Th2 の分類は出来ないとされるが、近年ヒトの系においても Th1/Th2 理論が応用できることが認められてきている。しかしながら全身性自己免疫疾患患者においてその末梢血中のサイトカイン測定により Th1/Th2 サブセットのインバランスを証明しようとする試みは、必ずしも統一した結果が得られていない。特にサブセットのインバランスと自己免疫疾患における各々の臓器障害も含めた病態との関連は未知である。最近まで Th1/Th2 細胞亜群を明確に区別する細胞表面マーカーは同定されてなかったが、Bonacchi らにより *in vitro* において、Th1 細胞上または Th2 細胞上にのみ発現するケモカインレセプター (CCR5、CCR4) が報告された^{4) 9) 10)}。我々は臓器非特異的自己免疫疾患の代表である SLE において、東京大学衛生学教室の松島らが作成した抗 CCR5 抗体、抗 CCR4 抗体を用いてそれぞれの発現を検索し、病態との相関を検討した。

【研究方法】SLE 患者 (20 名) と同性同年齢の正常人 (19 名) を検討の対象として以下の検討を行った。

(1) CCR5/4 の Th1/Th2 細胞表面マーカーとしての有用性を確認するため、健康人末梢血リンパ球を抗 CCR5 抗体、抗 CCR4 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD45RO 抗体を用いて、flow cytometry により 4 color staining で解析し、CD4 陽性 CD45RO 陽性細胞中の CCR5 陽性または CCR4 陽性細胞をそれぞれ sorting 後、PMA、ionomycin で刺激し、培養上清中の各種サイトカインの産生 (IL-4、IL-5、IL-13、INF- α) を ELISA 法にて測定した。

(2) 同様の抗体を用いて、SLE 患者の末梢血リンパ球及び胸膜炎合併例における胸水中リンパ球を flow cytometry により解析し、CCR5、4 の発現と病態との関連を検討した。又、症例を選択し CCR5、4 の発現を治療前後に測定し、病態改善、治療効果との関連を解析した。

【結果と考察】正常人末梢血リンパ球中の CD4 陽性 CD45RO 陽性細胞上における

CCR5、4の発現の検討では、各々の発現には明らかな偏りは認めず、CCR5/4 double positiveの細胞はほとんど認められなかった。さらにCCR5、CCR4陽性細胞を各々 sorting 後、培養上清中のサイトカイン産生を測定したが、CCR5陽性細胞培養上清中にはTh1サイトカイン（ $\text{INF-}\alpha$ ）のみ認め、CCR4陽性細胞培養上清中にはTh2サイトカイン（IL-4、IL-5、IL-13）のみ認められる事を確認した。次にCCR5、4の発現をSLE患者の末梢血CD4陽性CD45RO細胞上において検討したところ、CCR5陽性T細胞の比率は、正常人との比較において有意に高値を示し（mean \pm S.D 正常人 17.1 ± 6.2 、SLE患者 26.7 ± 11.7 、 $P < 0.005$ ）（Fig.1）、CCR4陽性T細胞の比率は低値を示す傾向を認め、CCR4の発現を殆ど認めない数例が存在した。また、CCR5/4比は正常人が2~4であるのに対しSLE患者では3~66と有意に高かった（mean \pm S.D 正常人 3.14 ± 1.90 、SLE患者 12.15 ± 17.8 、 $P < 0.005$ ）（Fig.2）。治療前後でのCCR5、4の発現を比較すると、CCR4陽性率には有意差を認めないものの、CCR5の陽性率が低下する症例を認めた。さらに胸膜炎を合併した一例において胸水に浸潤しているリンパ球のCCR5、4の発現を検討したところ、その殆どはCCR5を発現しておりCCR4を発現しているリンパ球は殆ど認めなかった。

Fig.1 Distribution of CCR5 expression on peripheral CD4⁺ CD45RO⁺ T cells

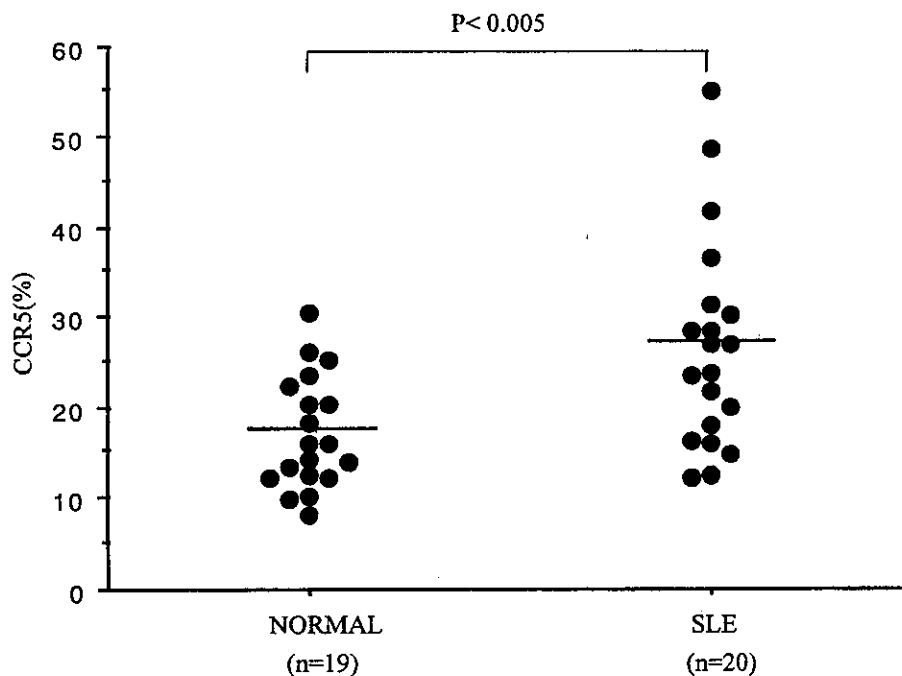
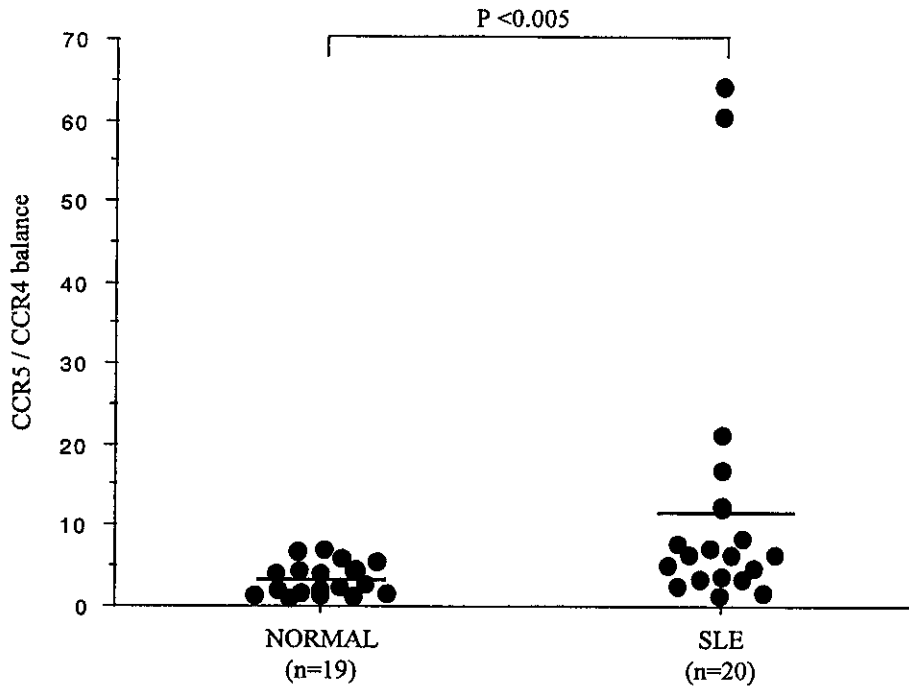


Fig.2 Distribution of CCR5 /CCR4 balance on peripheral CD4⁺ CD45RO⁺ T cells



慢性関節リウマチ (RA) 患者では末梢血リンパ球上の CCR5, CCR4 の発現量が正常人と比較して有意に低下しており、滑膜液中の T 細胞のほとんどが CCR5 陽性であったと報告されている¹¹⁾。このことは関節内に CCR5 陽性 T 細胞が浸潤、拘束された為に末梢血中の CCR5 の発現が低下した可能性があることが示唆され、RA が Th1 優位の疾患であるという今までの報告に一致する。SLE は臓器非特異的疾患であり RA と一元的に比較は出来ないが、末梢血リンパ球上の CCR5 陽性 T 細胞の増加、CCR4 陽性 T 細胞の減少傾向と共に胸水中リンパ球は殆ど CCR5 を発現していることより、特定の病態においては CCR5 陽性 T 細胞が病態の主座をなし、Th1 優位の時期が存在する可能性も示唆された。今後は、Th2 上の CCR4 の発現増強は一過性であるとの報告もあるため¹²⁾ 経時的な CCR5、4 の発現を検討すると共に、CCR5/4 が SLE においても Th1/Th2 の細胞表面マーカーとして有用であるかの検討を重ね、さらにステロイドに代表される薬剤の影響についての解析が必要であると思われる。

【結論】現在、CCR5/4 の発現と病態や治療効果とのより詳細な相関及び、lupus 腎炎合併例の腎臓に浸潤しているリンパ球上の CCR5/4 の発現を検討中であるが、Th1/Th2 のインバランスが SLE の特定の病態に関与している可能性が示唆された。また、CCR5/4 が SLE においても Th1/Th2 の細胞表面マーカーとして有用であるかの検討を重ねるとともにステロイドに代表される薬剤の影響についての解析中である。

【参考文献】

- 1) Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 1986;136:2348-2357.
- 2) Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S et al. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J.Exp.Med.* 1994;179(1):305-310.
- 3) Tsubata R, Tsubata T, Hiai H et al. Autoimmune disease of exocrine organs in immunodeficient alymphoplasia mice: a spontaneous model for Sjogren syndrome. *Eur.J.Immunol.* 1996;26:2742-2748.
- 4) Pius L, Mariagrazia U, Lorenza B et al. CCR5 is characteristic of Th1 Lymphocytes. *Nature.* 1998;391:344-345.
- 5) Kusaba M, Honda J, Fukuda T et al. Analysis of type 1 and type 2 T cells in synovial fluid and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 1998;25(8):1466-1471.
- 6) Simon A K, Seipelt E and Sieper J. Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1994;91(18):8562-8566.
- 7) Voskuhl R R, Martin R, Bergman C et al. T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. *Autoimmunity.* 1993;15: 137-143.
- 8) Liblau R S, Singer S M and McDevitt H O. Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune disease. *Immunol.Today.* 1995;16:34-38.
- 9) Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon P P et al. Differential expression of chemokine receptors and chomotactic responsiveness of type1 T helper cells (Th1) and Th2s. *J.Exp.Med.* 1998;187(1):129-134.
- 10) Sallusto F, Lenig D, Mackay C R et al. Flexible programs of chemokine receptors expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J.Exp.Med.* 1998;187(6): 875-883.
- 11) Suzuki N, Nakajima A, Yoshino S et al. Selective accumulation of CCR5⁺T lymphocytes into inflamed joint of rheumatoid arthritis. *Int.Immunol.* in press.
- 12) D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R et al. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J.Immunol.* 1998;161(10):5111-5115.

抗リン脂質抗体症候群全国調査の臨床的検討

橋本 博史	(順天堂大学医学部膠原病内科)
秋元 智博	(順天堂大学医学部膠原病内科)
矢野 哲郎	(順天堂大学医学部膠原病内科)
吉田 雅治	(東京医科大学八王子医療センター 腎臓科)
小林 茂人	(順天堂大学医学部膠原病内科)
津坂 憲政	(埼玉医科大学総合医療センター 第二内科)
中林 公正	(杏林大学医学部第一内科学教室)
居石 克夫	(九州大学医学部病理学教室 第一講座)
尾崎 承一	(京都大学医学部臨床病態医学)
鈴木 登	(聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター病因免疫部門)
松岡 康夫	(川崎市立川崎病院)
稲葉 裕	(順天堂大学医学部衛生学)
箕輪 真澄	(国立公衆衛生院疫学部)
松本 美富士	(豊川市民病院内科)
中山 登志子	(名古屋大学医学部予防医学)
玉腰 暁子	(名古屋大学医学部予防医学)
川村 孝	(名古屋大学医学部予防医学)
大野 良之	(名古屋大学医学部予防医学)
宮坂 信之	(東京医科歯科大学医学部第一内科)
小池 隆夫	(北海道大学医学部第二内科)

【研究要旨】 [目的] 抗リン脂質抗体症候群 (APS) は、抗カルジオリピン抗体、ループスアンチコアグラント (LAC) などの血清学的、血液学的異常に伴って、全身の臓器梗塞その他の血栓症および習慣流産・子宮内胎児死亡をきたす症候群である。我々は本邦におけるAPSの実態を明らかとする全国調査を行なった。[方法] 一次調査で全国の医療機関を対象に厚生省抗リン脂質抗体症候群診断基準に合致する症例の有無を調査し、該当症例ありと返答のあった医療機関に対して臨床における各種検査値、診断病名、合併症、予後などについての二次調査表を送付し、その結果、全国232施設より寄せられた612症例のデータをもとに臨床的な検討を行なった。[結果] 男女比は1対6で女性が多く、平均年齢は41.3±13.8歳 (7~97歳) であった。基礎疾患をもたない原発性抗リン脂質抗体症候群 (PAPS) は275例 (44.9%)、全身性エリテマトーデス (SLE) などの膠原病疾患を合併する二次性抗リン脂質抗体症候群 (SAPS) は337例 (55.1%) であった。45.4%の症例に動脈血栓症、32.6%に静脈血栓症が、38.5%に習慣流産・子宮内胎児死亡が認められた。動脈梗塞の53.7%に脳梗塞が認められ、主な死因ともなっていた。