

(2) DIC モデルに対する TAK の効果

LPS-DIC モデルに対して TAK 2,10,50 mg/kg を投与したところ、血中 D-dimer は有意に上昇し（それぞれ 3.83 ± 0.66 , 3.61 ± 0.47 , 2.54 ± 0.63 、LPS 投与の対照群 $1.15 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ ；ともに $P < 0.01$ ）血中 PAI 活性は TAK50 mg/kg で有意に低下した（ 233.7 ± 20.3 、対照群 $292.4 \pm 4.1\text{U/ml}$ ； $P < 0.05$ ）。他の凝血学的マーカーに対する影響はみられなかった。Cr 値、ALT 値は TAK50 mg/kg で有意に低下した（Cr 0.27 ± 0.01 、対照群 $0.32 \pm 0.02\text{mg/dl}$ 、ALT 72.0 ± 9.6 、対照群 $153.7 \pm 26.4\text{U/l}$ ；ともに $P < 0.05$ ）。腎糸球体におけるフィブリン沈着は有意に抑制された（それぞれ 84.0 ± 2.3 , 85.0 ± 1.8 , 76.1 ± 2.9 、LPS 投与の対照群 $94.6 \pm 1.4\%$ ；ともに $P < 0.05$ ）。低分子ヘパリンとともに、TAK を併用しても、TAK の追加効果はみられなかった。

TF-DIC モデルに対して TAK を投与した場合は、血中 D-dimer（それぞれ 5.60 ± 1.35 , 4.92 ± 0.98 , 4.60 ± 0.82 、TF 投与の対照群 $12.24 \pm 2.07 \mu\text{g/ml}$ ；ともに $P < 0.10$ ）については低下傾向がみられた。一方、血中 PAI 活性は TAK 投与により有意に上昇した（それぞれ 95.4 ± 6.9 , 111.0 ± 4.5 , 107.5 ± 6.7 対照群 $49.7 \pm 13.3\text{U/ml}$ ；それぞれ $P < 0.10$, 0.05 , 0.05 ）。他の凝血学的マーカーに対する影響はみられなかった。TF-DIC モデルにおいては、Cr 値、ALT 値は元々上昇せず、腎糸球体におけるフィブリン沈着は元々ほとんどみられないが、TAK 投与に伴う影響もみられなかった。低分子ヘパリンとともに TAK を併用しても、TAK の追加効果はみられなかった。

D. 考察

今回の検討において、TF、LPS いずれの DIC モデルにおいても、血小板数の低下および血中 TAT 値の上昇はほぼ同様の推移を示した。このため両モデルは、ほぼ同等の凝固活性化がみられると思われたが、TF-DIC モデルにおいては、血中 D-dimer 値が明らかに上昇し（血中 PAI 活性は低値）、臓器障害および腎糸球体におけるフィブリン沈着はほとんど見られなかったのに対し、LPS-DIC モデルにおいては、血中 D-dimer 上昇は軽度にとどまり（血中 PAI 活性は高値）、血中 AT III 活性の低下はより高度であり、臓器障害および腎糸球体におけるフィブリン沈着は高度で、しかも、死亡率は 11 hr 以降では 71.4% と非常に高率となった点は、両モデルの大きな差異と思われた。このように、TF 誘発 DIC モデルは臨床上的線溶優位型 DIC に、LPS 誘発 DIC モデルは凝固優位型 DIC モデルに類似した性格を有するモデルと考えられた。

エンドセリンは、血管内皮細胞より産生される強力な血管収縮性ペプチドである。エンドセリン受容体拮抗薬である TAK は阻血後肝障害、急性腎不全などの臓器障害に対して有効であることが既に報告されている。TAK は、TF モデルに対しては、凝血学的データおよび病理学的データのいずれにおいても無効であったが、TAK の投与により血中 D-dimer 値の低下傾向および血中 PAI 活性の有意な増加がみられた。LPS モデルに対しては、凝血学的データに対する影響はほとんどみられなかったが、血中 D-dimer 値は有意に上昇し、高用量の TAK 投与で PAI 活性が有意に低下した。また、LPS モデルにおける臓器障害は高用量の TAK 投与により改善され、腎糸球体

におけるフィブリン沈着も抑制された。血中 D-dimer 値は、微小血栓の主成分であるフィブリンのプラスミンによる分解産物を反映しているため、D-dimer 値の上昇がみられたことは、抑制されている線溶が若干亢進し（PAI 活性の低下もそれを支持する）、フィブリンの分解が促進したためではないかと思われた。ただし、TF モデルにおいては、LPS モデルと逆の現象がみられ、動物モデルの線溶活性化（または線溶抑制状態）の違いにより、エンドセリンは異なる作用を有する可能性も考えられるが、今後検討すべき問題である。

E. 結論

以上、TF-DIC モデルと LPS-DIC モデルは、凝固・線溶学的特徴、フィブリン沈着度、臓器症状の点で、大きな差異がみられ、前者は臨床の線溶優位型 DIC に、後者は凝固優位型 DIC に類似した性格を有するモデルと思われた。エンドセリン受容体拮抗薬は、LPS-DIC モデルにおいては微小血栓形成を減少し、臓器障害を改善させることが示された。動物 DIC モデルを用いて薬効を検討する際、用いるモデルにより成績が大きく異なることがあることが明らかになり、今後の DIC 研究を行う上での重要な留意点と思われた。

F. 研究発表

1. 市野典, 朝倉英策, 松田保ほか: 組織因子および LPS 誘発ラット DIC モデルに対する all-trans retinoic acid, 活性化ビタミン D3, 低分子ヘパリンの薬効比較検討. 日本血栓止血学会誌 11: 65-73, 2000.
2. 市野典, 朝倉英策, 松田保ほか: 組織

因子 (TF) 又は lipopoly-saccharide(LPS) によるラット DIC モデルの分類と使い分けについて. 日本血栓止血学会誌 10: 451-456, 1999.

抗血小板抗体産生を誘導する自己反応性 T 細胞が認識する

GPIIb-IIIa のエピトープの解析

(分担) 研究者 池田 康夫

慶應義塾大学医学部 内科

研究要旨

我々はこれまで、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)における抗血小板抗体の産生には血小板膜蛋白 GPIIb-IIIa を認識する CD4 陽性 T 細胞が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。今回、GPIIb、GPIIIa の部分断片を発現する 7 つのリコンビナント融合蛋白を用いて、23 例の ITP 患者末梢血中の GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞が認識する GPIIb-IIIa 上のエピトープ領域を調べた。7 つの GPIIb、GPIIIa 融合蛋白は ITP 患者末梢血 T 細胞により様々な組み合わせで認識された。特に、GPIIb、GPIIIa とともに N 末端側をコードする融合蛋白がそれぞれ 48%、57% の ITP 患者末梢血 T 細胞により認識された。さらに、ITP 患者 5 例から樹立した GPIIb-IIIa 反応性 CD4 陽性 T 細胞株のうち、単一の GPIIb、GPIIIa 融合蛋白と反応する 8 株について詳細な検討を行った。GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞株はいずれも HLA-DR 拘束性で、おもに GPIIb、GPIIIa の N 末端側を認識した。これら GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞株は自己末梢血または脾臓 B 細胞から抗 GPIIb-IIIa 抗体産生を誘導した。以上の成績より、抗血小板抗体産生を誘導する GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞が認識する主要なエピトープは GPIIb、GPIIIa の N 末端側の細胞外ドメインに存在することが明らかにされた。

A. 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病(ITP)は血小板減少のため出血傾向を呈する後天性疾患である。特に慢性型では自然寛解はまれで、血小板に対する自己抗体による自己免疫疾患と考えられている¹⁾。

1) ITP では抗血小板抗体が結合してオプソニン化した血小板が脾臓などの網内系で Fc リセプターを介してマクロファージに捕捉され、貪食、破壊される。抗血小板抗体が認識する対応抗原として GPIIb-IIIa、GPIb-IX などの血小板膜糖蛋白が同定されている。その中でも GPIIb-IIIa が最も高頻度に抗血小板抗体の標的となり、高感度な検出法を用いると ITP 患者の 90%以上で陽性となる。

昨年度までの本研究班において、我々は還元やトリプシン処理により修飾された GPIIb-IIIa 分子を認識する CD4 陽性 T 細胞が ITP 患者末梢血中で活性化されていることを報告した²⁾。

2) これら GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞は自己 B 細胞からの抗血小板抗体産生を誘導するヘルパー活性を有しており、ITP の病態において重要な役割を果たしている。しかし、これまで GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞の抗原認識機構、特に GPIIb-IIIa 上のエピトープについては明らかでなかった。そこで、本年度は GPIIb、GPIIIa のリコンビナント部分断片を用いて GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞の認識する GPIIb-IIIa 上のエピトープ部位を同定することを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象

末梢血 T 細胞が GPIIb-IIIa のトリプシン断片と反応することが確認されている慢性 ITP 患者 23 例を対象とした²⁾。このうち、9 例は血清中に、16 例は血小板溶出液中に抗 GPIIb-IIIa 抗体が陽性であった。

2) GPIIb、GPIIIa のリコンビナント融合蛋白の発現

GPIIb、GPIIIa の全長をコードする cDNA から特異的プライマーを用いた PCR により図 1 に示した 8 つの部分断片をコードする cDNA を得た。個々の DNA 断片を蛋白発現ベクター pGEX6p-1 にサブクローニング後に大腸菌へ導入し、glutathione S-transferase (GST) との融合蛋白として発現させた。Iib-1、Iib-2、Iib-3、Iib-4、IIIa-1、IIIa-2、IIIa-4 をコードするベクターを導入した大腸菌では融合蛋白の発現を認めたが、cysteine-rich region を含む IIIa-3 の融合蛋白の発現はみられなかった。7 つの融合蛋白と GST を発現した大腸菌菌体成分は直接 10% ポリアクリルアミド-SDS 電気泳動で分画し、各融合

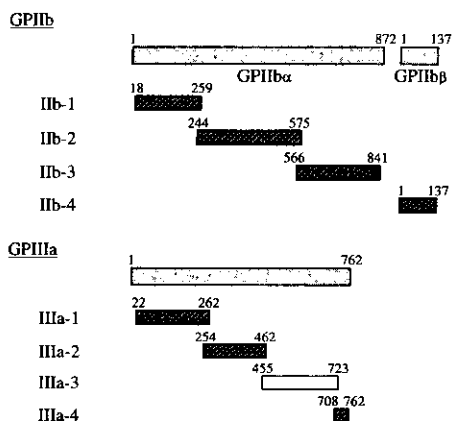


図1. 大腸菌で発現させたGPIIb α 、Iib β 、GPIIIaのリコンビナント断片。いずれの断片もGSTとの融合蛋白として発現させたが、IIIa-3のみは大腸菌での融合蛋白の発現がみられなかった。個々の断片はSDS-PAGEで分画後にゲルから溶出、精製し、T細胞の培養に用いた。

蛋白の分子量に一致するゲル部分から融合蛋白を機械的に抽出した。得られた融合蛋白はPBSに対して透析後、0.22 μ m フィルターで滅菌し、T 細胞の培養に用いた。ポリアクリルアミド-SDS 電気泳動後のクマシーブルー染色したゲルのデンシトメトリーによる解析では、精製した GPIIb、GPIIIa 融合蛋白および GST の純度は 95% 以上であった。

3) 末梢血 T 細胞の抗原特異的 T 細胞増殖反応の検出

PBMC (105/ウェル) を GPIIb-IIIa トリプシン断片 (10 μ g/ml) あるいは GPIIb と GPIIIa のリコンビナント融合蛋白、GST、トリプシン、破傷風トキソイド (5 μ g/ml) 存在下で 7 日間培養した。培養最後の 16 時間に 0.5 mCi/ウェルの ³H サイミジンを加え、マイクロシンチレーションカウンターにより ³H サイミジンの取り込みを測定した。いずれの培養も triplicate で行い、抗原を加えたウェルの平均値から抗原なしのウェルの平均値の差 (Δ cpm) を求めた。各 GPIIb、GPIIIa 融合蛋白に対する特異的反応の指標として stimulation index (SI) を用いた。SI は GPIIb、GPIIIa 融合蛋白を加えた培養の ³H サイミジンの取り込み (Δ cpm) を GST を加えた培養の ³H サイミジンの取り込み (Δ cpm) で除して求めた。

4) GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞株の樹立と解析

末梢血単核球 (PBMC) に GPIIb-IIIa トリプシン断片 (10 μ g/ml) を加え、3 日目にヒト IL-2 (30 U/ml) を添加した。10 日目に自己 PBMC または脾細胞 (40Gy 照射)、GPIIb-IIIa トリプシン断片 (10 μ g/ml)、IL-2 (100 U/ml) で再刺激した。17 日目に生存細胞を比重遠心法により分

離し、限界希釈法を行った。すなわち、96 ウェル丸底プレートの 1 ウェルあたりに 100 個ずつの生存 T 細胞をまき、自己 EBV トランスフォーム B 細胞株 (100Gy 照射)、GPIIb-IIIa トリプシン断片、IL-2 存在下を加えた。その後、7-10 日毎に EBV トランスフォーム B 細胞株、GPIIb-IIIa トリプシン断片、IL-2 による刺激を繰り返し、T 細胞株を維持、増幅した。GPIIb-IIIa トリプシン断片に反応するがトリプシンや破傷風トキソイドと反応しない T 細胞株を GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞株とした。

T 細胞株の CD4、CD8 の発現はフローサイトメトリーで調べた。各 GPIIb、GPIIIa 融合蛋白に対する T 細胞株の反応性は、 5×10^4 の T 細胞株に 5×10^4 の自己 EBV トランスフォーム B 細胞株 (100Gy 照射) を加えて抗原存在下で培養した際の 3H サイミジンの取り込みにより検討した。HLA クラス II 拘束性は培養中に HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP に対するモノクローナル抗体 ($1 \mu\text{g/ml}$) を添加した際の抗原特異的増殖反応の抑制効果により調べた。

5) GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞株と B 細胞の協調作用による抗 GPIIb-IIIa 抗体産生の誘導

GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞株 (2×10^5) と自己末梢血または脾臓由来の B 細胞 (2×10^5) を各種抗原と低濃度の PWM ($1 \mu\text{g/ml}$) 存在下で 10 日間培養し、培養上清を回収した。抗原としては、GPIIb-IIIa トリプシン断片 ($10 \mu\text{g/ml}$) または GPIIb、GPIIIa 融合蛋白、GST ($5 \mu\text{g/ml}$) を用いた。培養上清中の IgG 抗 GPIIb-IIIa 抗体は精製ヒト GPIIb-IIIa を固相化したプレートを用いた ELISA で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた末梢血および脾臓は、患

者からインフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。

C. 研究結果

1) 末梢血 T 細胞の GPIIb、GPIIIa 融合蛋白に対する反応性

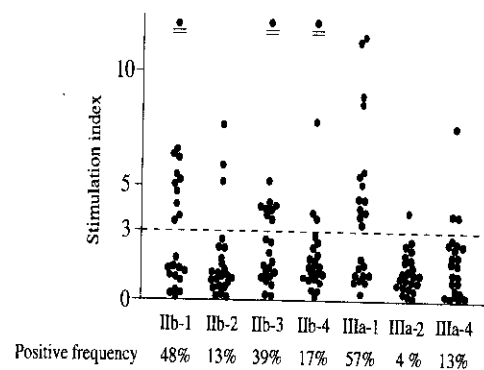


図2. ITP患者23例の末梢血T細胞のリコンビナントGPIIb、GPIIIa融合蛋白に対する特異的増殖反応。下段には、Stimulation indexが3以上を陽性とした際の各GPIIb、GPIIIa融合蛋白に対して反応性を示した症例の頻度を示した。

図 2 に ITP23 例の PBMC における各 GPIIb、GPIIIa 融合蛋白に対する反応性を IIIa-2、IIIa-4 融合蛋白に対する PBMC の反応性はいずれも一部の ITP 患者に検出され、GPIIb-IIIa 上には複数の T 細胞エピートープが存在することが示された。特に IIb-1、IIIa-1 に対する反応性はそれぞれ 48%、57%と高頻度であった。無作為に選んだ ITP5 例の GPIIb、GPIIIa 断片に対する PBMC の増殖反応は、CD4 陽性 T 細胞の除去によりほぼ完全に抑制されたことから、増殖している PBMC 中の細胞は CD4 陽性 T 細胞であった。

ITP23 例中 13 例は複数の GPIIb、GPIIIa 融合蛋白に対して反応し、これら ITP 患者の末梢血中には抗原特異性の異なる GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞が混在した。ITP 患者を診断後 5 年未満と 5 年以上に層別化し、反応する GPIIb、GPIIIa 融合蛋白の数を比較した。診断後 5 年以上経過している

13例では、5年未満の10例に比べて反応するGPIIb、GPIIIa融合蛋白の数が有意に少なかった(1.3±0.48対2.7±1.16; P<0.001)。

2) GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞株の解析

表1. ITP患者末梢血より樹立したGPIIb-IIIa反応性T細胞株のCD4/CD8、認識するリコンビナントGPIIb-IIIa断片、HLAクラスII拘束性

| Line# | CD4/8 | Epitope | HLA restriction |
|-------|-------|---------|-----------------|
| SiM4 | CD4 | Iib-1 | HLA-DR |
| FS4 | CD4 | Iib-1 | HLA-DR |
| SuM7 | CD4 | Iib-3 | HLA-DR |
| NE4 | CD4 | IIIa-1 | HLA-DR |
| SuM8 | CD4 | IIIa-1 | HLA-DR,DP |
| WY3 | CD4 | IIIa-1 | HLA-DR |
| WY5 | CD4 | IIIa-1 | HLA-DR |
| WY9 | CD4 | IIIa-1 | HLA-DR,DP |

ITP患者5例の末梢血T細胞から計15のGPIIb-IIIa反応性T細胞株を樹立した。GPIIb-IIIa反応性T細胞株はすべてCD4陽性であった。15株中7株は複数のGPIIb、GPIIIa融合蛋白と反応し、IIIa-1は10株、Iib-1は8株、Iib-3は2株、Iib-4は2株により認識された。単一のGPIIb、GPIIIa融合蛋白と反応した8つのGPIIb-IIIa反応性T細胞株についてはさらに詳細な検討を行った(表1)。GPIIb-IIIa反応性T細胞株はすべてHLA-DR拘束性であったが、SuM8、WY9では抗HLA-DR抗体に加えて抗HLA-DP抗体による特異的増殖反応の抑制もみられた。GPIIb-IIIa反応性T細胞株8株のうち5株はIIIa-1を認識し、残りの2、1株はそれぞれIib-1、Iib-3と反応した。

GPIIb-IIIa反応性T細胞を自己B細胞とGPIIb-IIIaトリプシン断片存在下で培養すると、いずれのT細胞株も抗GPIIb-IIIa抗体産生を誘導した。GPIIb、GPIIIa融合蛋白およびGSTを抗原として用いると、Iib-1に対して増殖反応を示したSiM4とFS4は

Iib-1を添加した場合のみに抗GPIIb-IIIa抗体産生を誘導した。同様に、Iib-3と反応したSuM7、IIIa-1と反応したNE4、SuM8、WY3、WY5、WY9はそれぞれ、Iib-3、IIIa-1存在下で抗GPIIb-IIIa抗体の産生を誘導した。

D. 考察

末梢血T細胞あるいはin vitroで樹立したGPIIb-IIIa反応性T細胞株を用いた解析により、ITP患者末梢血中のGPIIb-IIIa反応性T細胞はGPIIb-IIIa分子上の複数のエピトープを認識することが明らかにされた。GPIIb-IIIa反応性T細胞により高頻度に認識される主要なエピトープはGPIIb、GPIIIaともにN末端側の細胞外ドメインをコードするIib-1、IIIa-1上に存在した。Iib-1、IIIa-1はいずれも機能的に重要なCa²⁺-binding domain、RGD domainをそれぞれ含んでいた。Iib-1、IIIa-1を認識するT細胞株はin vitroで自己B細胞からの抗GPIIb-IIIa抗体産生を誘導したことから、これらT細胞はin vivoでも抗血小板抗体の産生に関与している可能性が高い。

ITP診断後5年未満の症例の多くは複数のGPIIb、GPIIIa融合蛋白と反応したが、5年以上経過した例のほとんどは単一の融合蛋白を認識した。蛋白抗原に対するT細胞の応答はまず最初に単一のエピトープに対する反応性が生じ、それに引き続き同一分子上の他のエピトープに反応性が広がっていく、いわゆる"epitope-spreading"という現象が動物モデルで示されている³⁾。しかし、自己免疫疾患患者では、症状が顕性化して医療機関を受診する時点ですでに多数のエピトープに対する反応性を有しているので、"epitope-spreading"が観察されるこ

とはまれである。一方、自己免疫疾患患者で長期間にわたりエピトープ反応性の推移を追跡すると、複数のエピトープに対する反応性が特定のエピトープに対する反応性に集約されていくことが報告されている。この現象は"epitope contraction"と呼ばれている⁴⁾。その機序は明らかでないが、経過中にminorなエピトープに対するT細胞が除去あるいは不活化され、dominantなエピトープと反応するT細胞のみが存続、増殖するためと考えられている。これらT細胞エピトープに対する反応性の違いはおもにHLA分子、ペプチド、T細胞リセプターとの結合親和性とより規定されると考えられている。今回の検討でも、5年以上経過したITP患者のほとんどがIIb-1またはIIIa-1と反応したことから、dominantなエピトープがこれらの領域に含まれる可能性が高い。罹病期間の長い症例でGPIIb-IIIa反応性T細胞により認識されるエピトープが単一であることは、T細胞によるペプチドの認識機構を難治例に対する免疫療法の標的とする場合には都合がいい。

我々はこれまでITP患者末梢血中のGPIIb-IIIa反応性CD4陽性T細胞が自己B細胞からの抗血小板抗体産生を誘導するヘルパー活性を有することを示してきた。したがって、ITP患者においてGPIIb-IIIa反応性T細胞の活性化を阻害すれば、抗血小板抗体の産生を抑え、その結果血小板破壊を抑制することができる。GPIIb-IIIa反応性T細胞の活性化には、T細胞リセプターを介したエピトープペプチドの認識が必須であり、HLA分子、ペプチド、T細胞リセプターの相互作用をブロックすることによりGPIIb-IIIa反応性T細胞の不活化を誘導できる。このような手法の一つに、エピトープペプチドのアミノ酸配列の一部を置換

した改変ペプチドを用いた免疫制御がある。改変ペプチドに対するT細胞リセプターの結合親和性が変化することで、T細胞に不完全な活性化シグナルが伝わりT細胞のアナジーや機能の変化(サイトカイン分泌パターンの変化など)を誘導できることが報告されている⁵⁾。今後、GPIIb-IIIa反応性T細胞を不活化する免疫療法の開発には、IIb-1、IIIa-1に含まれるエピトープをペプチドレベルで同定することが必要と考えられる。

E. 結論

ITP患者末梢血中のGPIIb-IIIa反応性CD4陽性T細胞により認識される主要なエピトープはGPIIb、GPIIIaいずれもN末端側の細胞外ドメインに存在した。今後、ペプチドレベルでのT細胞エピトープが同定されれば、それに対する免疫応答を制御することで難治性ITPに対する免疫療法への応用が可能性と考えられる。

参考文献

1. 桑名正隆、池田康夫：自己免疫疾患の概念と知見；特発性血小板減少性紫斑病。最新医学 1998；53(6, suppl): 1592-600.
2. Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y: Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura: role in production of anti-platelet autoantibody. J Clin Invest 1998; 102: 1393-402.
3. Lehman PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE: Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic

determinants of an autoantigen.
Nature 1992; 358: 155-7.

4. Burdt MA, Hoffman RW, Deutscher SL, et al : Long-term outcome in mixed connective tissue disease. Arthritis Rheum 1999; 42: 899-909.
5. Nishimura Y, Oiso M, Fujisao S, et al : Peptide-based molecular analyses of HLA class II-associated susceptibility to autoimmune diseases. Intern Rev Immunol 1998; 17: 229-62.

F. 研究発表

論文発表

1. 桑名正隆、池田康夫 : ITP における自己抗体産生機序. 日本内科学会雑誌、1999; 88: 2493-2498.

学会発表

1. 桑名正隆、鏑木淳一、河上裕、猪子英俊、池田康夫 : 特発性血小板減少性紫斑病における免疫遺伝学的解析. 第 27 回日本臨床免疫学会総会(宇都宮). 1999 年 10 月
2. 桑名正隆、池田康夫 : ITP の病態における自己反応性 T 細胞の役割と免疫療法への応用. 第 41 回日本臨床血液学会総会(秋田). 1999 年 10 月

アンチトロンビンによる血管内皮細胞活性化の抑制

(分担) 研究者 岡嶋 研二

熊本大学医学部 臨床検査医学講座

研究要旨

アンチトロンビン(AT)は血管内皮細胞表面上のグリコサミノグリカンと相互作用することで、血管内皮細胞からのプロスタサイクリン産生を促進し、臓器障害発生を抑制する。AT とヘパリンとの結合には凝固因子が関与しているため、AT によるプロスタサイクリン産生に凝固系の活性化が関与している可能性がある。エンドトキシン誘発肺血管内皮傷害モデルに不活化 factor Xa を投与し凝固系の活性化を抑制すると、AT によるプロスタサイクリン産生や臓器傷害抑制作用は低下した。この結果から AT によるプロスタサイクリン産生には凝固系の活性化が関与していると考えられた。

また、AT の血管内皮細胞に対する直接作用についても検討した。TNF- α や IL-1 β 、LPS などの刺激による培養血管内皮細胞表面上の白血球接着因子の発現増加は、AT によって濃度依存的に有意に抑制した。この作用発現には AT のヘパリン結合能が重要であるが、血管内皮からのプロスタサイクリン産生促進作用には依存していないと考えられた。TNF- α 刺激後に認められる細胞内の IkappaB の分解や JNK の磷酸化に対して AT は影響を与えなかった。

これらの結果から、AT は凝固の活性化が起こっている局所でプロスタサイクリンを産生するとともに、直接血管内皮細胞の活性化を制御し、血管内皮細胞障害を抑制しているものと考えられた。

A. 研究目的

アンチトロンビンは凝固系を制御する重要なセリンプロテアーゼインヒビターである。その抗凝固作用はヘパリンによって促進されるため播種性血管内凝固症候群の治療などにおいては、AT とともにヘパリンが使用される。しかし AT は敗血症に伴う臓器障害を抑制する効果があることも知られており、この作用は AT の抗凝固作用によらないものと考えられている。我々はこれまで、AT の臓器障害抑制作用は、AT が血管内皮細胞上のグリコサミノグリカンと相互作用することで血管内皮細胞からのプロスタサイクリン産生を促進することで発揮されていることを報告してきた。AT と血管

内皮細胞表面上のグリコサミノグリカンとの結合には、トロンビンなどの凝固因子が影響を与えることが示唆されているので、AT によるプロスタサイクリン産生には凝固系の活性化が関与している可能性が考えられる。本研究では、AT による臓器障害抑制作用やプロスタサイクリン産生作用における凝固系の活性化の役割について解析し、さらに *in vitro* の系を用いて AT の血管内皮細胞活性化に対する作用について解析を加え、AT の臓器障害の治療薬剤としての可能性について検討した。

B. 研究方法

In vivo の解析

解析には、エンドトキシン(5mg/kg, iv) 誘発肺血管内皮傷害モデルを用いた。AT による効果発現に凝固系の活性化が関与しているかを検討するために、トロンビン産生の特異的阻害物質である不活化 Factor Xa を投与し、AT によるエンドトキシン誘発肺傷害発生抑制に対する影響を解析した。In vitro の解析

解析には、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVECs)を用いた。腫瘍壊死因子(TNF)-alpha や interleukin (IL)-1beta, lipopolysaccharide(LPS)などで HUVECs を刺激し、血管内皮細胞活性化に対する AT の効果について検討した。血管内皮細胞の活性化の指標として刺激後にその細胞表面に発現が増強する E-selectin や intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 などの白血球接着分子を用いた。これらの分子の発現は cellular ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

In vivo の結果

解析に用いた肺傷害モデルではエンドトキシン投与 6 時間後には、肺血管内皮細胞の透過性は亢進し FDP の上昇が認められる。不活化 factor Xa(10mg/kg)の投与によって、エンドトキシン投与後に認められる FDP の上昇は強力に抑制され、凝固系の活性化は不活化 factor Xa によって抑制されていると考えられた。この不活化 factor Xa の投与によって AT(250U/kg)の肺血管内皮細胞透過性亢進に対する抑制作用は消失した。エンドトキシン投与 90 分後の血中 6-keto-PGF1a の濃度は AT では高値を保っていたが、不活化 factor Xa+AT では低下した。

In vitro の結果

HUVECs を TNF-alpha で刺激すると、その細胞表面上に白血球接着因子である E-selectin や ICAM-1 の発現が増加する。AT はこの TNF-alpha による接着因子発現増加を濃度依存的に有意に抑制した。さらに IL-1beta や LPS などの TNF-alpha 以外の刺激による接着分子発現増加においても AT は抑制効果を示した。AT の 49 番目のトリプトファンを化学的に修飾し、ヘパリン結合能を消失させた化学修飾 AT も、白血球接着分子発現を抑制したがその作用は正常 AT に比較して有意に弱いものであった。この AT による抑制作用が血管内皮細胞からのプロスタサイクリン産生増強作用によるものかを検討するために、血管内皮細胞をシクロオキシゲナーゼの阻害剤であるインドメタシンで前処置し血管内皮からのプロスタサイクリン産生を抑制しても AT による血管内皮細胞活性化抑制作用は認められ、この血管内皮細胞活性化抑制作用は血管内皮細胞からのプロスタサイクリン産生促進作用によるものではないと考えられた。血管内皮細胞の活性化の細胞内情報伝達機構で重要な役割をはたしている NF-kappaB に対する AT の効果について解析するために、TNF-alpha 刺激後に認められる NF-kappaB の生理的インヒビターである IkappaB の分解に対する AT の影響を Western blot 法で解析した。その結果、AT は TNF-alpha による血管内皮細胞内の IkappaB の分解に影響を与えなかった。また、NFkappaB と共に細胞内情報伝達に重要な役割をはたしている JNK に対する AT の効果を検討するために、TNF-alpha 刺激後の JNK の磷酸化に対する AT の効果を Western blot 法で解析した。その結果 AT は JNK の磷酸化に対して影響を与えなかつ

った。

D. 考察

In vivoの解析結果からATのプロスタサイクリン産生促進作用には凝固系の活性化が関与していることが示唆された。この事実から、過剰な抗凝固療法はATの臓器傷害抑制作用を低下させるものと考えられた。このことは、臓器傷害を合併した播種性血管内凝固症候群の治療は抗凝固療法のみではかえって臓器傷害を悪化させる可能性を示唆する。さらにin vitroの解析の結果からATはプロスタサイクリン産生促進作用以外の機序によって血管内皮細胞の活性化を、抑制することが判明した。この作用発現には、血管内皮細胞表面上のヘパリン様物質が重要な役割をはたしていると考えられた。その詳細な作用発現機構は不明であるが、NF κ BやJNKの活性化を抑制するものではないと考えられた。これらの事実から、ATはプロスタサイクリン産生を介する作用や血管内皮細胞の活性化を抑制する作用で臓器傷害発生を抑制しているものと考えられ、播種性血管内凝固症候群や臓器傷害の新しい治療の可能性を示唆するものと考えられる。

E. 結論

ATは血管内皮細胞からプロスタサイクリン産生を促進し臓器傷害発生を抑制する。この作用発現には凝固系の活性化が深く関与している。また詳細な機構は不明であるがATは血管内皮細胞の活性化を直接抑制する。

F. 研究発表

論文発表

1. Am J Respir Crit Care Med 161:57-63,2000.The prevention of lipopolysaccharide-induced pulmonary vascular injury by pretreatment with cepharanthine. Murakami K, Okajima K, Uchiba M.
2. Thromb Haemostas 83: 60-64,2000. Characterization of the acquired inhibitors which induce the factor VII deficiency and life-threatening bleeding. Kamikubo Y, Miyamoto S, Iwasa A, Ishii M, Okajima K.
3. Thromb Haemostas 2000 (in press). Neuroprotection by recombinant thrombomodulin. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Johno M.
4. Digest Dis Sci 2000 (in press). Activated neutrophils impair gastric cytoprotection : Role of neutrophil elastase. Harada N, Okajima K, Liu W, Uchiba M.
5. Ann Surg 2000 (in press). Activated protein C reduces the ischemia-induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation. Hirose K, Okajima K, Taoka Y, Uchiba M, Tagami H, Nakano K, Utoh J, Okabe H, Kitamura N.
6. Crit Care Med 2000 (in press). Inhibition of neutrophil activation by ranitidine contributes to prevent stress-induced gastric mucosal injury in rats. Okajima K, Murakami K, Liu W, Uchiba M.
7. J Neurotrauma 2000 (in press). Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor- α production.

Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Johno M.

8. Pancreas 2000 (in press). Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. Hirota M, Ikei S, Okajima K, Okamoto K, Ogawa M.
9. Blood 2000 (in press). Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Noguchi T.

血液凝固第 V・VIII 因子合併欠損家系の ERGIC-53 遺伝子解析

(分担) 研究者 岡村 孝

九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学 (第一内科)

研究要旨

出血傾向および貧血を伴った 46 歳女性を発端者とする血液凝固第 V・VIII 因子合併欠損症家系における ERGIC-53 遺伝子の解析を行った。本家系では、ERGIC-53 遺伝子に異常を認めず、本疾患の原因となる他の蛋白の存在が示唆された。

A. 研究目的

血液凝固第 V・VIII 因子複合合併欠損症 (V/VIII 欠損症) は、まれな出血性遺伝性疾患であり、最近その原因因子として、本疾患の 70% で細胞内シャペロンである ERGIC-53 の欠損が報告された。本邦でも 3 例の報告がみられている。われわれはこのまれな疾患を診断したので ERGIC-53 遺伝子を解析し本疾患の本態を解析する。

B. 研究方法

患者およびその家族の血液を informed consent のもとに採血し、血漿の V および VIII 因子の活性および抗原量を測定し、白血球より DNA を抽出した。ERGIC-53 遺伝子は、13 エクソンからなりそれぞれのエクソン-イントロン結合部を含むように 13 対のプライマーを設定した。増幅された PCR 産物をダイレクトシーケンスで解析した。

C. 研究結果

症例は、46 歳女性で、小学生時より紫斑などの出血傾向を呈していた。28 歳時分娩で大量(11L)の出血をきたし輸血をうけている。今回子宮筋腫があり性器出血が持続し貧血 (Hb6.2g/dl) のため受診。この間、vonWillebrand 病や女性血友病と診断されている。両親はいとこ婚である。患者の検査結果は、APTT 72.5sec(31.3), PT 17.6sec, フィブリノゲン 663mg/dl, X 因子活性 88%, vWF 活性 143%であった。V および VIII 因子活性ならびに抗原量は下記表のとおりであった。

患者および家族の ERGIC-53 遺伝子の塩基配列をみると、異常は見られなかった。また、イントロン 6 の t11/12、イントロン 11 の c/t ポリモルフィズムから患者では ERGIC-53 遺伝子はヘテロ接合体であることがわかった。

| | V 活性 (%) | V 抗原量 (%) | VIII 活性 (%) | VIII 抗原量 (%) |
|----|----------|-----------|-------------|--------------|
| 患者 | 23 | <10 | 18 | 14 |
| 母 | 77 | 60 | 84 | 130 |
| 兄 | 115 | 91 | 78 | 102 |

D. 考察

V・VIII 合併欠損症において ERGIC-53 遺伝子異常が報告されている。ERGIC-53 は、ER で合成された蛋白をゴルジに運搬するために必要なレクチン様膜蛋白で糖蛋白を結合して運搬する。凝固 V および VIII 因子は、お互い構造上相同性を有するセルロプラスミンファミリーであり、ERGIC-53 という共通の分子シャペロンを使用することから合併欠損が生じると予想される。V・VIII 合併欠損症の遺伝子解析は、世界的に 17 家系で施行されている。日本人においては、エクソン 3 の del C によるフレームシフト例と、エクソン 5 における 202Arg 部のナンセンス変異の 2 例の報告がみられる。本解析においては、ERGIC-53 遺伝子内に変異は見られず、プロモーター領域の解析は塩基配列が未知のため施行してないが、ポリモルフィズムの解析から発端者 ERGIC-53 遺伝子はヘテロ接合体であると考えられ、血族家系内での遺伝子異常はホモ接合体異常が多いことから、本症例において ERGIC-53 遺伝子は責任遺伝子ではないと考えられる。しかし、V・VIII 合併欠損症症例のうちの約 30%は ERGIC-53 遺伝子に異常がみられないことから、本例を含めて他の責任遺伝子の存在が示唆された。今後、ERGIC-53 の機能を調節する因子の存在あるいは ERGIC-53 と同様の機能を有する他の因子の存在などが本欠損症の解析を通して解明されるであろう。

E. 結論

V・VIII 合併欠損症家系における ERGIC-53 遺伝子の解析を行った。本家系においては、ERGIC-53 遺伝子には欠損を説明する異常変異はみられなかった。よ

って、V・VIII 合併欠損症における他の細胞内蛋白の関与が考えられ、この解析が今後の課題である。

Cyclosporin A と Tacrolimus の血小板凝集亢進作用

(分担) 研究者：垣下 榮三

兵庫医科大学 第二内科

研究要旨

骨髄移植(BMT)後、移植片対宿主病(GVHD)の制御目的に投与される免疫抑制剤の cyclosporin A (CsA)と tacrolimus (Tc) の血小板に対する影響を検討した。CsA、Tc のいずれも血小板 ADP 凝集には影響を及ぼさなかったが、serotonin (5HT)凝集に対しては0.1~10 μ g/ml の濃度で亢進作用が認められた。このことより、両薬剤の投与は移植後の血栓性細血管障害(TMA)や血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)発症の一要因になると想定される。

A. 研究目的

骨髄移植(BMT)後の血栓性細血管障害(thrombotic microangiopathy; TMA)あるいは血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP)はBMT症例の予後を左右する重大な合併症の一つである。その原因の一つとして移植後の移植片対宿主病(graft versus host disease; GVHD)を制御する目的で投与される cyclosporin A (CsA)が想定されている。CsAによりTMAの徴候が認められた場合、すみやかにCsAと同じ免疫抑制剤のTcへ変更するとよいとも言われるが、一方でTcによるTMA発症の報告もあり詳細は不詳である。他方、CsAおよびTcは生体内でserotonin (5HT)レベルを増加させる作用があり、これを介したCsA、Tcによる血小板活性化作用が報告されている。これらをふまえ本研究では、CsAあるいはTcによる移植後TMA、TTP発症機序を明らかにすることを目的として、CsA、Tcの血小板に対する作用を特に5HTを中心に検討した。

B. 研究方法

血小板凝集能はレーザー散乱光を用いた粒子計測型血小板凝集能測定装置(PA-20; Kowa)を用いて検討した。この方法では血小板凝集反応を大、中、小の凝集塊生成として観察することが可能で、血小板活性化の微小変化を小凝集塊生成により観察することが可能である。また本装置は凝集塊生成と同時にこれまでの透光度の変化による凝集曲線も記録することができる。検体は、少なくとも10日間薬剤服用歴のない健常人より3.9%クエン酸ナトリウムで抗凝固して得た血液より作成した。室温下に150xg、10分間遠沈した上清を多血小板血漿(PRP)として採取し、さらに1,500xg、10分間遠沈した上清(乏血小板血漿; PPP)を用いて、PRP中の血小板数を15万/ μ lに調整した。PRP 180 μ lと各濃度のCsAあるいはTc 20 μ lを混和し、PA-20のキュベット内にて1,000rpmで回転攪拌下に3分間、37°Cで保温後、凝集惹起剤(5-HTあるいはADP)を22 μ l添加し、凝集反応を10分間観察、記録した。

表1 5-HT 10 μ g/ml による血小板小凝集塊形成に及ぼす CsA、Tc の影響

| | Control | CsA (μ g/ml) | | | Tc (μ g/ml) | | |
|-----------------------|-----------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | | 0.1 | 1 | 10 | 0.1 | 1 | 10 |
| Max ($\times 10^4$) | 8.72 \pm 0.81 | 8.97 \pm 2.28 | 12.3 \pm 3.21* | 13.5 \pm 0.71** | 12.4 \pm 2.42* | 15.0 \pm 1.73** | 13.67 \pm 1.53 |
| AUC($\times 10^6$) | 5.78 \pm 1.51 | 6.03 \pm 0.91 | 10.0 \pm 0.91* | 8.63 \pm 1.19** | 8.97 \pm 2.85 | 11.7 \pm 3.21** | 11.17 \pm 4.91* |

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, 5-HT; serotonin, CsA; cyclosporin A, Tc; tacrolimus, Max; Maximum formation of small aggregate,

AUC; area under the curve.

C. 研究結果

凝集惹起剤として 1 μ M の ADP を用いた場合、PRP へ添加後、小、中、大凝集が順次形成されることが観察されたが、一方 1 μ M の 5-HT を惹起剤として用いると、添加直後に一過性の小凝集塊のみの形成が認められた。この 5-HT 刺激による小凝集塊生成は、あらかじめ PRP に 0.1~10 μ g/ml の CsA、Tc を添加することにより亢進することが確認された。表 1 はこれを形成された小凝集塊の最高値 (maximum formation of small aggregate; Max) および小凝集塊の全体数 (area under the curve; AUC) で比較検討したものであるが、CsA、Tc のいずれも対照に比較して 1 μ g/ml 以上の濃度で有意に高値を示した。これに対して、1 μ M の ADP 刺激による反応には、CsA、Tc のいずれも影響を及ぼさなかった。また 0.4 μ M の低濃度 ADP では血小板反応はごく微小となり小凝集塊生成のみが認められるが、この場合でも CsA、Tc 添加の影響は認められず、さらに CsA あるいは Tc と同時に 5-HT の受容体拮抗剤である saropogrelate 10 μ g/ml を添加して ADP 凝集を観察した場合でも、CsA、Tc 添加による変化は認められなかった。

D. 考察

BMT 後の GVHD 制御を目的として投与される CsA は移植後 TMA、ことに allo-BMT 後の TMA 発症と有意な関係があることは以前より知られている。CsA は血管内皮由来の prostacyclin 生成を抑制する一方、腎由来の thromboxane A₂ 生成を亢進させ血栓形成傾向を惹起する。また CsA は直接、内皮細胞を障害すると同時に、血小板活性化作用を有するとの報告もいくつかみられる。これに対して CsA と同じく免疫抑制剤である Tc には CsA とは異なり血小板抑制を介した血栓抑制効果があるとの報告がある一方で、Tc による TMA 発症症例の報告もあり、一定の見解は得られていない。他方、CsA および Tc はいずれも腎摘出を施行した実験動物において、血中の 5-HT 濃度を上昇させると同時に、血小板活性化を惹起するとの報告がある。そこで今回の研究では、CsA、Tc の血小板に対する影響を、5-HT を中心として検討した。

方法として用いた粒子計測型血小板凝集塊測定装置は、血小板凝集反応を小、中、大の凝集塊形成として確認することができ、微小な刺激による血小板反応は小凝集塊形成として観察することができる。従来の透光度の変化でみる血小板凝集計では 5-HT

による血小板凝集は明らかな凝集曲線として記録することが困難であったのに対して、粒子計測法では明らかな小凝集塊形成として記録され再現性も良好である。

この反応にあらかじめ CsA、Tc を添加して観察したところ、両薬剤とも小凝集塊形成を亢進させる作用のあることが明らかとなった。一方、血小板刺激物質として $1 \mu\text{M}$ の ADP を用いると小、中、大凝集塊が順次形成される反応が観察されるが、CsA、Tc を添加した場合でも、この反応に変化はなかった。さらに ADP 凝集において 5-HT の作用を除外したとき、この反応に CsA、Tc は何らかの作用を示すか否かを検討する目的で、 $1 \mu\text{M}$ の ADP による凝集において血小板の 5-HT の受容体拮抗剤である sarpogrelate を用いて検討した。あらかじめ PRP に sarpogrelate $10 \mu\text{g/ml}$ を添加すると ADP $1 \mu\text{M}$ による凝集反応は、sarpogrelate 非添加時の様に反応初期に形成された小凝集塊が順次、中、大凝集塊に移行せず、反応開始 10 分後まで小凝集塊のまま存在することが確認されたが、CsA、Tc はこの反応に対しても影響を及ぼさなかった。また $0.4 \mu\text{M}$ の低濃度 ADP による反応では小凝集塊のみ形成され、5-HT を用いた場合に類似した反応が認められたが、この場合も CsA、Tc 添加による影響はなかった。これらの結果より、CsA、Tc の血小板凝集亢進作用は 5-HT を介した反応に特異的である可能性が示唆された。

E. 結論

CsA および Tc は 5-HT による血小板凝集反応を亢進させる作用があり、これは BMT 後 GVHD 制御目的にこれら薬剤を投与された症例における TMA、TTP 発症の

一要因になると想定される。

F. 研究発表

1. 末廣 謙、長谷川善一、澤田暁宏、丸茂幹雄、辻岡 洋、日笠 聡、垣下榮三； Cyclosporin A と Tacrolimus の serotonin 誘発血小板凝集塊生成亢進作用(第 62 回日本血液学会 ワークショップ「GVHD と thrombotic microangiopathy」平成 12 年 3 月 18 日、福岡市)

急性深部静脈血栓症の実践的診断法に関する研究

(分担) 研究者 川崎富夫

大阪大学付属病院 血管外科

研究要旨

急性深部静脈血栓症(DVT)の診断およびリンパ浮腫との鑑別診断において、CTを応用した簡易診断法の開発と評価を行った。片側性の急性下肢腫脹を主訴とした患者10例(DVT 8例、リンパ浮腫2例)を対象とした。肉眼的に左右差(大腿筋束断面積比=患側/健側)として視認しうるかどうか、および大腿筋束断面積比と脂肪断面積比によりDVTとリンパ浮腫の鑑別診断が可能かどうかを検討した。確定診断はduplex scan、静脈造影、またはRI静脈造影にて行った。その結果、大腿筋束断面積の左右差を視覚的に認識可能であったのは大腿筋束断面積比が1.2以上の時であった。また大腿筋束断面積比1.2以上の全例(7/8)に中枢型DVTを認めた。大腿筋束断面積比1.2以下のDVT1例は深部静脈の血栓辺縁の血流が存在し、さらに大伏在静脈径の拡大所見が著しく側副血行路を介したドレナージが発達していた。リンパ浮腫では大腿筋束断面積比1.2以下で脂肪断面積比のみの増加を認めた(2/2)。以上より片側性の急性下肢腫脹を呈する患者では大腿部のCTで大腿筋束断面積比を比較する事により容易に急性期DVTの診断が可能であり、リンパ浮腫との鑑別診断も同時に行えると考える。

A. 研究目的

急性深部静脈血栓症(DVT)患者の50%に肺塞栓症(PE)が合併しており、DVTの早期発見、治療はPEの予防上重要である。DVTの診断にはこれまで種々方法が報告されており、すでに確立された感がある。しかし現実には、それぞれ特殊で高価な診断機器が必要であり、また手技や読影に専門知識が必要とされる。従って、DVTの診断は血管外科の専門医にはたやすいことであっても一般病院の臨床医には容易でない。重篤な結果をまねきやすいDVTの発生の多くは一般病院であることを考えると、よく普及している検査機器を用いた簡易診断法を確立することは、一般臨床医のDVTに対する興味を高め患者の早期発見と治療開始につながると考えられる。CTスキャンは簡

便、正確、そして再現性に富む測定法であり、現在の日本ではかなり一般に普及した検査である。従来CTによるDVTの診断法は静脈内血栓そのものとならえようとしており、造影剤が必要でかつ造影剤がうまく局所に流れるタイミングをとることが困難であった。私たちは、急性DVTに伴う筋束の拡大に注目して、単純CTスキャンを用いた簡易診断法について検討した。

B. 研究方法

平成10年4月から平成11年9月までに急性片側性の下肢腫脹を主訴として来院した患者10例(中枢型DVT8例、リンパ浮腫2例)を対象とした。DVT8例の発症後の平均日数は 21.8 ± 20.5 日、治療開始後平均日数は 8.6 ± 9.7 日であった。大腿筋群が

らの静脈還流が障害されることによる大腿筋束の腫脹を、CT 画像上で患側と健側の大腿筋束断面積の比として求め、大腿筋束断面積比という指標を設定した。肉眼的に左右差(患側/健側)として視認でき得る大腿筋束断面積比を知るために、健常な大腿部 CT 画像をコンピューター画像に取り込んで、一側の CT 断面像とその鏡面像を等倍、1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍と作成した。これを左右比較し視認可能な大腿筋束断面積比を求めた。大腿部領域の単純 CT を 5mm スライスでスキャンを行った。大腿部の CT 画像をコンピューター画像に取り込んで、大腿周囲径、大腿断面積、大腿筋束断面積、脂肪断面積、静脈径の患側/健側の比較を検討した。DVT の確定診断は Duplex scan、静脈造影で静脈内血栓を証明するか、RI 静脈造影にて行った。

C. 研究結果

CT 画像上で一側の大腿断面像とその鏡面像を等倍、1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍と拡大したものとを比較して、肉眼的に明らかな左右差として視認でき得たのは、大腿筋束断面積比が 1.2 以上の場合であった。これより大腿筋束断面積比の増加が 1.2 以上の症例の DVT 診断率を求めた。対象症例 10 例のうち CT 画像上、大腿筋束断面積比の増加(結果的に 1.2 以上)を認識できた症例は 7 例であり、その総て(7/7)に腸骨一大腿静脈領域の DVT を認めた。大腿筋束断面積比が 1.2 以下の DVT が 1 例あり、DVT 発症後 35 日で治療開始後 14 日の症例で深部静脈の血栓辺縁の血流が存在し、さらに大伏在静脈径の拡大所見が著明であり側副血行路を介したドレナージが発達していた。対象症例 10 例中、大腿断面積の増加が大腿

筋束断面積比 1.1 以下で、脂肪断面積のみに増加を認めた 2 例はいずれもリンパ浮腫であった。深部静脈径の拡大は DVT 全例に認められたが、大伏在静脈径の拡大所見は DVT に特異的なものとは限らずリンパ浮腫でも認められた。

D. 考察

近年、日本でも DVT は PE の原因疾患として注目されはじめている。しかし、その診断は Duplex scan 血管造影、RI 静脈造影などさまざまな診断法が確立されているにもかかわらず、急性期 DVT の診断は一般に容易でない。この理由はベッドサイドでの臨床診断や検査、読影に専門知識が要求されたり、診断機器自体が普及していないことにある。従って、一般的に広く普及している検査機器を用いた簡易診断法を確立することが DVT の早期診断、治療開始につながると考えられる。CT スキャンを用いた DVT の診断についての報告はこれまで僅かしかない。DVT の下肢腫脹は深部静脈が血栓で閉塞することにより下腿、大腿筋群からの静脈還流が障害されるために発症する。特に急性期 DVT ではこれに伴う表在静脈などの代償的な静脈還流増加が対応しきれていないため、筋束の腫脹が強く、これが下肢腫脹の本態である。同様に下肢腫脹を呈するリンパ浮腫ではリンパ還流が障害されるが静脈還流は障害されていない。このためリンパ浮腫では筋束の腫脹はおこらず皮下脂肪組織の腫脹が主となると考えられる。この原理に基づき CT 画像の筋束断面積、脂肪断面積の左右比較を行うことにより DVT とリンパ浮腫の鑑別を試みた結果、左右大腿を比較して大腿筋束断面積比 1.2 以上に増加を認識できた全例(7/7)

に腸骨一大腿静脈領域の DVT を認め、この方法の有用性が確認できた。大腿筋束断面積比の増加が 1.1 以下であった DVT の 1 例は深部静脈に血栓を確認したが、血栓辺縁の血流が存在し、さらに大伏在静脈径の拡大しており副血行路の発達が顕著であった。筋肉使用時も副血行路を介して血流が確保されて静脈筋枝内圧の上昇が比較的少ないと考えられ、従ってこのような症例では PE の原因となる血栓が遊離する可能性は低いと推測できる。リンパ浮腫の 2 例はいずれも患側大腿断面積、脂肪断面積の増加を認めたが、大腿筋束断面積比の増加が無く、DVT との鑑別が可能であった。以上より、片側性の急性下肢腫脹を呈する DVT 患者では、患側大腿部の筋束断面積の増加による大腿断面積の増加を CT 上で確認できれば急性 DVT と診断可能で、このような症例では PE の発症の可能性が極めて高いと考えられる。また、同時に DVT とリンパ浮腫との鑑別も容易であった。

E. 結論

片側性の急性下肢腫脹を呈する患者では、大腿部の単純 CT にて筋束断面積の差を視認できれば DVT と診断できる。またリンパ浮腫との鑑別も容易である。

F. 研究発表

論文発表

1. Fujimura H, Kawasaki T, Sakata T, Ariyoshi H, Kato H, Monden M, Miyata T. Common C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene increases the risk for deep vein thrombosis in patients

with predisposition to thrombophilia. *Thrombos Res* (in press)

2. Kawasaki T, Ozeki Y, Igawa T, Kambayashi J. Increased platelet sensitivity to collagen in individuals resistant to low-dose aspirin. *Stroke* 2000; 31: 591-595.

学会発表

1. 川崎富夫、宮田敏行、末久悦次、有吉秀男、藤村博信、柿木英祐、上道 哲、門田守人。Buerger 病と高ホモシステイン血症、第 27 回日本血管外科学会、ワークショップ、1999。
2. 川崎富夫。動脈・静脈血栓の臨床病態と治療戦略、第 71 回近畿血液学地方会、シンポジウム、1999。
3. 川崎富夫、有吉英男、渋谷 卓、吉川憲秀、春野泰久、辻 慶久、門田守人。肺塞栓症予防のための急性深部静脈血栓症の診断-CT を利用した簡易診断法の意義-第 19 回日本静脈学会総会、シンポジウム 1999。