

とを考えると、TM が抗酸化作用、細胞保護作用をもつことは生理的にも意義にあることと考えられる。また TM—トロンピンによって活性化された活性化プロテイン C は NF—kB の活性化を抑制することが明らかとなった。

これらは内皮細胞障害とそれに対するプロテクションを考える時、重要な知見であると結論された。

E. 結論

TM に抗酸化作用、細胞保護作用が、活性化プロテイン C に細胞活性化抑制作用があることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1)Yan Liu, Yin Wang, Munekazu Yamakuchi, Sumikazu Isowaki, Etsuro Nagata, Yuichi Kanmura, Isao Kitajima, **Ikuro Maruyama**. Upregulation of Toll-Like Receptor 2 Gene Expression in Macrophage Response to Petidoglycan and High Concentration of Lipopolysaccharide Is Involved in NF-kB Activation. *Infection and Immunity*. 69(5): 2788-2796. 2000

2)Krishna Pada Sarker, Soichi Obara, Masanori Nakata, Isao Kitajima, **Ikuro Maruyama**. Anandamide induces apoptosis of PC-12 cells: involvement of superoxide and caspase-3. *FEBS Letters* 472:39-44, 2000

3)Kishida,A.,Nakashima,M.,Sakamoto,N.,Serizawa,T.,**Maruyama,I.**,Akashi,M. Study on Complex Formation Between Recombinant Human Thrombomodulin Fragment and Thrombin Using Surface Plasmon Resonance. *American Journal of Hematology* 63:136-140,2000

G. 知的所有権の取得状況

特になし

β2-グリコプロテイン I valine/leucine²⁴⁷ 多型が抗リン脂質抗体症候群に与える影響に関する研究

小池 隆夫

（北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学第二内科・教授）

抗リン脂質抗体症候群(APS)における主要な自己抗原であるβ2-グリコプロテイン I (β2-GPI)の valine/leucine²⁴⁷ 多型の APS における意義を明らかにする目的で、日本人および英国人患者について PCR-RFLP 法にてβ2-GPI valine/leucine²⁴⁷ 多型を検討した。また、valine/leucine²⁴⁷ それぞれの変異をもつリコンビナントβ2-GPI を作成し、ELISA 法にて APS 患者より樹立したモノクローナル抗β2-GPI 抗体および APS 患者精製 IgG の結合性を比較検討した。結果、β2-GPI 抗体陽性者における valine²⁴⁷ のアレル頻度は抗体陰性の患者および健康人のそれと比較して優位に高かった。また、マウスを免疫して得られた抗β2-GPI 抗体は何れのβ2-GPI に対しても同等の結合性を示したのに対し、APS 由来のモノクローナル抗β2-GPI 抗体および APS 患者 IgG は valine²⁴⁷ β2-GPI に対してより強い結合性を示した。このことから、valine²⁴⁷ アレルが APS の危険因子であると考えられた。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome; APS)は、抗カルジオリピン抗体 (aCL) やループスアンチコアグラントなどのリン脂質抗体が証明され、動静脈血栓症、習慣流産を呈する疾患の一群である。抗リン脂質抗体症候群は、その症状、重症度とも様々であるが、一般に、アジア人と比較した場合、白人において、その頻度、重症度ともに高いと考えられている。APS における主要な自己抗原であるβ2-グリコプロテイン I (β2-GPI)は、陰性荷電表面に結合した状態でのみ aCL により認識されるが、これはβ2-GPI が陰性荷電表面との相互作用により構造変化を受け、新たなエピトープが表出するためと考えられている。β2-GPI には数種類の遺伝子多型が報告されているが、なかでも valine/leucine²⁴⁷ 多型は、リン脂質結合部位である第5ドメインと aCL の主なエピトープの存在する第4ドメインの中間に位置する。欧米人では valine²⁴⁷ アレルが優位であるのに対し、アジア人では leucine²⁴⁷ アレルが優位であり、また、我々は過去の検討において、白人で valine²⁴⁷ アレルが APS における危険因子となりうる可能性を示唆した。本研究では、β2-GPI の valine/leucine²⁴⁷ 多型が APS の発症に与える影響について、また、人種間の疫学的差異を説明し

うるかどうかについて、検討を加えた。

B. 研究方法

- 1) 日本人 APS/SLE 患者のうち抗リン脂質抗体陽性者 65 名および健康人 61 名について、また、英国人 APS 患者 57 名および健康人 39 名につき、PCR および RFLP 法にてβ2-GPI valine/leucine²⁴⁷ 多型を検討した。
- 2) valine/leucine²⁴⁷ それぞれの変異をもつリコンビナントβ2-GPI を、パキキュロウイルスに感染させた昆虫細胞 Sf9 を用いて作成し、APS 患者より樹立したモノクローナル抗β2-GPI 抗体(EY1C8, EY2C9, TM1G2)および抗β2-GPI 抗体陽性 APS 患者血清より精製した IgG、マウスモノクローナル抗β2-GPI(Cof19-21)の結合性を、ELISA 法にて比較検討した。カルジオリピンをコートしたプレートを用い、リコンビナントβ2-GPI を固相化、ブロッキングした後にそれぞれの抗体を反応させ、アルカリフォスファターゼラベルした二次抗体を用いて検出した。

C. 研究結果

- 1) 健康人における valine²⁴⁷ アレルの頻度は、日本人では 18.9%と白人の 70.5%に比較して明らかに低く、これまでの報告に合致するものであった(表 1)。
- 2) 日本人 APS/SLE 患者において、抗β2-GPI 抗体陽性者の valine²⁴⁷ アレル頻度は 33.8%であり、抗β2-GPI 抗

体陰性者(14.5%, p = 0.014)および健常人(18.9%, p = 0.033)と比較して、優位に高率であった(表 1)。英国人においても、以前我々が報告したとおり、抗β2-GPI抗体陽性者の valine²⁴⁷ アレル頻度は 85.7%であり、抗β2-GPI 抗体陰性者(62.7%)および健常人と比較して優位に高率であった。

3) Cof19-21 は valine²⁴⁷, leucine²⁴⁷ β2-GPI の何れに対しても同等の結合性を示したが、EY1C8, EY2C9, TM1G2 は valine²⁴⁷ β2-GPI に対してより強い結合性を示した(図 1)。また、APS 患者の精製 IgG も、患者の遺伝子型に関わらず、valine²⁴⁷ β2-GPI に対してより強い結合性を示した(図 2)。

D. 考察

病原性を有すると考えられる抗β2-GPI 抗体は valine²⁴⁷ β2-GPI により強く結合し、今回の疫学的検討ともあわせ、valine²⁴⁷ アレルが APS の危険因子であると考えられた。第 4, 第 5 ドメインのヒンジ部分に相当する 247 番目の変異が第 4 ドメインに存在すると考えられている抗β2-GPI 抗体に対するエピトープの表出に影響を与えている可能性があり、抗体陽性率や疾病の伸展に関連しうると推察される。白人において valine²⁴⁷ アレル頻度が高いことで、アジア人と比較して白人では APS の頻度が高く、より重症となりやすいことを説明しうる可能性が考えられた。

E. 結論

1) 抗リン脂質抗体陽性患者において、英国人、日本人とも抗β2-GPI 抗体の有無とβ2-GPI valine/leucine²⁴⁷ 多型との相関が示された。

2) APS 患者から樹立した抗β2-GPI モノクローナル抗体および APS 患者血清由来の IgG の、リコンビナント valine²⁴⁷ β2-GPI への結合は、leucine²⁴⁷ β2-GPI への結合に比べて強かった。

3) β2-GPI の valine/leucine²⁴⁷ 多型は APS の危険因子のひとつである。その免疫学的意義の解明は、APS のより特異的な治療法開発につながる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaguchi, M., Hirayama, F., Kanai, M., Sato, N., Fukazawa, K., Yamashita, K., Sawada, K., Koike, T., Kuwabara, M., Ikeda, H., Ikebuchi, K.: Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *ExpHematol* 2001 29:174-

182.

2. Bertlaccini, M.L., Atsumi, T., Lanchbury, J., Scaliz, A. R., Katsumata, K., Vaughan, R.W., Kondeatis, E., Kamashta, M.A., Koike, T., Huges, G.R.V.: Plasma tumor necrosis factor α levels and the -238* a promoter polymorphism in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2001;85: 198-203

3. Koike T.: Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis. *Ann Med* 2000;32 Suppl 1: 27-31

4. Tsutsumi, A., Ichikawa, K., Matura, E., Sawada, K., Koike, T.: Heterogeneous behavior anti-β2-glycoprotein. *J. Rheumatol.* 2000; 22: 391-397.

5. Bertolaccini, M.L., Atsumi, T., Caliz, A.R., Amengual, O., Khamashta, M.A., Huges, G.R.V., Koike, T.: Association of antiphospholipid antibodies with HLA class II genes. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 683-688..

6. Matura, E., Koike T.: Accelerated atheroma and anti-β2-glycoprotein I antibodies. *Lupus.* 2000; 9:210-216.

7. Ieko, M., Ichikawa, K., Atsumi, T., Takeuchi, R., Sawada, K., Yasukouchi, T., Koike, T.: Effects of β2 glycoprotein I and monoclonal anticardiolipin antibodies on extrinsic fibrinolysis. *Seminars Thrombosis Hemostasis.* 2000; 26: 85-90.

8. Atsumi, T., Koike, T. Cardiac valve diseases and antiphospholipid syndrome. *Int.med.* 2000; 39:446-447..

9. Takeda, T., Mizugaki, Y., Matsubara, L., Imai, S., Koike, T.: Lytic Epstein-Barr virus infection in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis.Rheum.* 2000; 43: 1218-1225..

Tsutsumi, A., Koike, T.: Antiphospholipid syndrome in the elderly. *Int .Med.* 2000; 39:529-530.

Matsuura, E., Inagaki, J., Kasahara, H., Yamamoto, D., Atsumi, T., Kobayashi, K., Kaihara, K., Zhao, D., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Yasuda, T., Triplett, A.D., Koike, T.: Proteolytic cleavage of β2-glycoprotein I: reduction of antigenicity and the structural

relationship. *Int Immunol.*2000; 12.1183-1192.

Takeuti,R.,Atsumi,T.,Ieko,M.,Takeya,H.,Yasuda,S.,Ichikawa,S.,Tsutsumi,A.,Suzuki,K.,Koike,T. : Coagulation and fibrinolytic activities in 2siblings with β 2-glycoprotein I deficiency. *Blood.* 2000; 96:4.

Yasuda,S.,Tsutsumi,A.,Chiba,H.,Yanai,H.,Miyoshi,Y.,Takeuchi,R.,Horita,T.,Atsumi,T.,Ichikawa,K.,Mastuura,E.,Koike,T. : β 2 -blycoprotein I deficiency: prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. *Atherosclerosis.*2000; 152 : 337-346.

tsumi,T.,Ieko,M.,Bertolaccini,M.L.,Ichikawa,K.,Tsutsumi,A.,Matsuura,E.,Koike,T. :Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-proteronbin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum.*2000; 43: 1982-1993.

Koizumi,K.,Nishio,M.,Endo,T.,Takashima,H.,Haseyama,Y.,FujimotoK.,Ymamamoto,S.,Sato,N.,Ikebuchi,K.,Ikeda,H.,Koike,T.,Sawada,K. : Large scale purification of human blood CD34+ cells from cryopreserved peripheral blood stem cells,using a nylon-fiber syringe system and immunomagnetic microspheres. *Bone Marrow Transplantation.* 2000; 26. 787-793.

Takeuchi,M.,Bucala,L.,Suzuki,T.,Ohkubo,T.,Yamazaki,M.,Koike,T.,Kameda,Y., Makita, Z. : Neurotoxicity of advanced glycation end-products cultured cortical neurons. *J.Neuropathol Exp. Neurology.* 2000; 59: 1094-1105.

Takeuchi,M.,Makita,Z.,Bucala,L.,Suzuki,T.,Koike,T.,Kameda,Y. : Immunological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds in vivo. *Molecular Medicine.* 2000; 6: 114-125.

Subang,R.,Levine,J.S.,Janoff,A.S.,Davidson,S.M.K.,Taraschi,T.F.,Koike,T.,Minchey,S.R.,Whiteside,M.,Tannenbaum,M.,Rauch,J.: Phospholipid-bound β 2glycoprotein I induces the production of anti-phospholipid antibodies. *J. Autoimm.* 2000; 15:21-32.

11.Koike,T.,Ichikawa,K.,Atsumi,T.,Kasahara,H.,Mastuura,E.: β 2-blycoprotein I -anti- β 2-blycoprotein I Interaction.. *J Autoimm.* 2000; 15: 97-100.

12.Sasaki,K.,Tsutsumi,A.,Wakamiya,K.,Ohtani,K.,Suzuki,Y.,Watanabe,Y.,Nakayama,N.,Koike,T.: Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus Infection. *Scand J Gastroenterol.* 2000; 9: 961-965.

13.Nishio,M.,Koizumi,K.,Endo,T.,Haseyama,Y.,Fujimoto,K.,Ymamamoto,S.,Kobayashi,H.,Koike T.,Sawada,K. : Effective high+dose chemotherapy combined with CD34+-selected autologous peripheral blood stem cell trnsplantation in a patient with cutaneous CD30-negative Large T cell Lymphoma. *Bone Marrow Transplantation.* 2000; 25. 1315-1317

14. Matsuura E, Kobayashi K, Kasahara J, Shoenfeld Y, Koike T: Oxidized autoantigens in atherosclerosis.. Y Shoenfeld, D. Harats, G Wick ed. In *Atherosclerosis and Autoimmunity.* Elsevier Science B.V 143-150, 2001

15. Tsutsumi A, Koike T: Measurement of anti- β 2glycoprotein I antibodies. M Khamashta ed in *Hughes Syndrome;Antiphospholipid Syndrome.* Springer . 238-244. 2000

2. 学会発表

G. 知的所有権の取得状況

特になし

整形外科領域における血栓が原因として起こる疾患の臨床的研究

久保 俊一

（京都府立医科大学整形外科・助教授）

関節疾患と骨折は、人口の高齢化に伴いその数が年々増加するとともに手術を要する例が増えている。手術治療を行うにあつて、術後の血栓形成から引き起こされる肺梗塞は大きな問題である。本研究では、fibrin monomer (FM)の人工関節置換術後肺塞栓症診断に対する有効性を検討した。対象は人工股関節置換術を施行した患者 17 名であった。術前を含めて経時的に PT, aPTT, D-dimer, ATIII, TAT および FM を測定した。FM 測定には特異的認識抗体を新たに作成した。肺血流シンチグラムで肺塞栓陽性群と肺塞栓陰性群に分けて各種因子の変動を検討すると、PT, aPTT, ATIII および TAT では肺塞栓有無による差は認められなかった。しかし、FM と D-dimer では手術後陽性群と非陽性群で統計学的有意差が認められた。FM では、術直後と術後 2 日であり、D-dimer では術後 7 日であった。FM 値は肺塞栓陽性群の全例で 40 μ g/ml 以上の値を示し、術後早期の血栓形成予測に有用であった。

A. 研究目的

整形外科領域では四肢、脊椎などの運動器における様々な疾患を取り扱っている。その中でも関節疾患は大きな weight を占めている。

関節疾患の内、特発性大腿骨頭壊死症（以下、骨頭壊死症）は難病として取り扱われている。大腿骨頭の荷重部に阻血性壊死が発生することにより関節面の陥没や破壊が起こり、股関節の機能障害が惹起される疾患である。両側性に発生しやすいこと、日常生活活動には著しい障害が生じること、そして、比較的若年者で発症頻度が高いことなどの特徴がある。また、本疾患はステロイド治療によりしばしば経験するものであり、ステロイドの使用量の増大とともにその頻度は増加してきている（ステロイド骨壊死症とも呼ばれている）。骨頭壊死症の病態に関しては、各種の要因があげられているものの、詳細な機序は明確にされていない。血液凝固・線溶系異常による血栓形成の可能性も大切な要因であると考えられる。この要因の関与を明らかにしておくことは、本疾患の予防にもつながる。

一方、関節疾患と骨折は人口の高齢化に伴い、その数が年々増加するとともに手術を要する例が増えている。変形性関節症や大腿骨頸部骨折は代表的な疾患で

ある。近年の人工材料の発達と早期関節運動の重要性の認識のもと、人工骨頭・人工関節置換術などがよく選択されている。しかしながら、術中・術後に生じる血栓による障害が報告されるようになってきた。すなわち、肺梗塞や血栓性静脈炎である。重篤な場合は、生命予後は不良であり、診断、治療、予防法を開発しておくべき疾患である。

本研究では、特発性大腿骨頭壊死症における血栓形成の可能性と人工関節置換術の血栓形成に注目している。前者については、過去 2 年間報告を行ってきた。本年は後者の結果について報告する。

深部静脈に発症する深部静脈血栓症(Deep Vein thrombosis, DVT)は整形外科手術後に発症しやすく、欧米では人工股関節全置換術後では 34-63%、人工膝関節全置換術後では 41-88%の報告がある。現在、DVT は肺塞栓に移行することが多く、抗凝固療法を怠った人工関節置換術後の肺塞栓は致死性のものが 0.1-5%、非致死性のものが 0.5-10%と報告されている。肺塞栓はその血栓源の 90%以上が下肢および骨盤腔内の深部静脈由来であることが知られている。肺梗塞を予知する検査法として超音波検査、静脈造影があり、膝窩部より近位に血栓が存在する場合、肺塞栓に至る危険性

が高いと言われている。現在のところ術後血栓症の予測が可能な血液学的検査法はない。そこでわれわれは最近、血栓傾向を迅速かつ有効に診断できる方法として注目されている fibrin monomer (FM)の人工関節置換術後肺塞栓症診断に対する有効性を検討した。用いた FM 測定法は新しい FM 特異抗体を用いたラテックス凝集法で測定する方法である。なお、同時に各種血液凝固・線溶系因子の動態も測定し、それらの検査法との比較も行った。

B. 研究方法

対象は平成 10 年 12 月から平成 11 年 4 月までに京都府立医科大学で人工股関節置換術を施行した患者 17 名である。内訳は男性 2 名、女性 15 名であり、年齢は 47 歳から 73 歳、平均 63.1 歳であった。すべての患者は手術後 1 4 日間から 2 8 日間にわたりアスピリンが投与されていた。また肺塞栓の有無を検索するため術後 6 から 21 日目に肺血流シンチグラフィを施行した。術前、術直後術後 2、7、14、21、28、35、42 日目に静脈血を採血し、クエン酸血漿で血液凝固能検査を行った。プロトロンビン時間 (PT) と活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を光散乱法、D-dimer を Latex photometric immunoassay (LPIA) 法、アンチトロンビン III (ATIII) は合成基質法、トロンビン・アンチトロンビン III 複合体 (TAT) は酵素免疫測定法 (Enzyme immunoassay: EIA) 法で測定した。

フィブリンモノマー (FM) に関しては新しい測定法で行った。本方法の特徴は FM を特異的に認識する抗体を新たに作成した点である。この抗体 F405 は従来の抗体作成法である合成ペプチドでなく desAAfibrin をホールのまま免疫源として取得した抗体でフィブリンモノマーの α 鎖末端領域をエピトープとして認識している。本抗体を基にラテックス凝集法で FM を特異的かつ簡便に測定する方法である。

C. 研究結果

肺血流シンチグラムで肺塞栓の所見が見られた症例は 17 例中 4 例であった。この 4 症例は呼吸困難など臨床的症状は認められなかったが、動脈血酸素分圧が低下していた。

肺血流シンチグラム肺塞栓陽性群と肺塞栓陰性群で手術後における凝固系因子経時的な変動を検討した。血液凝固時間 PT, APTT, ATIII および TAT は手術後の経時的変動や肺塞栓有無による差は認められなかった。しかし、FM と D-dimer では手術後陽性群と非陽性群で統計学的有意差が認められた。その時期は FM では、

術直後と術後 2 日であったのに対し、D-dimer では、術後 7 日であった。

FM 値は肺塞栓陽性群 4 例とも検討期間中のいずれかで $40 \mu\text{g/ml}$ 以上の値を示した。

D. 考察

本研究において、われわれは人工股関節置換手術の術後に FM と D-dimer は有意に上昇することを認めた。術直後の凝固系の亢進は術中操作によるものである可能性が高い。実際、股関節手術直後の深部静脈血栓症とこれに続発する肺塞栓症の原因は手術創からの組織因子の血中流入が血栓傾向を呈する原因である考えられている。股関節手術の組織侵襲により組織因子や cell fragment が静脈血に放出され静脈血流に乗ると肺毛細血管が最初の標的になり、肺塞栓が誘発されることが推定される。

今回、血液凝固時間と ATIII の計測値から股関節置換手術自体では大きな血液凝固能に影響をもたらさないであろうと思われる。また、肺塞栓発症例と非発症例との間にも有意差は見られなかったことから、これら PT, APTT, ATIII, TAT は肺塞栓診断には有用ではないと結論できた。

最近、急性と慢性期における hypercoagulable state を評価するのにフィブリンとその代謝産物が判定に有効であるという報告がある。従来より D-dimer が Fibrin の分解産物の指標として測定され、Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) の診断に用いられてきた。実際に enzyme immunoassay 法を用いた D-dimer が深部静脈血栓診断に有用であるという報告がある。われわれの検討した結果でも D-dimer は肺塞栓陽性群、肺塞栓陰性群とも術後に有意な高値を示した。しかし、その時期は術後 7 日であり早期の予測には適していなかった。DVT や肺塞栓発症の早期では DIC における凝血的異常と比較して軽度であることが多く、より感度の高い hypercoagulable state を感知できる因子や測定技術の開発が重要と思われる。

Fibrin は thrombin か thrombin-like proteases と fibrinogen が反応してできるものである。一方、FM は fibrinogen のアミノ酸末端の Aa- and Bb-chains から fibrinopeptide A and B が離れて生じるものである。手術後早期の値変動と肺塞栓の関連においては FM のみ関連が認められた。その FM の値は $40 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。Vogel らは下肢骨折後手術が行われた患者 156 名の血液凝固検査と下肢静脈造影検査を行ない、DVT を合併した 36 名のうち 34 名に FM の上昇を認め、DVT

発症のない患者群は26%のみがFM増加を示したと報告している。同様に腹部手術を行った患者129名のうち術後DVTを発症した12名の血液凝固系検査を検討したところ、FMが最も関連し91.7%の陽性率を示し、続いてDダイマーが75.0%、TATが41.7%であった。さらにFM陽性のDVT発症患者全員がDVT臨床症状発現1日前からFM値が急増していた。

E. 結論

FMによりDVTや肺塞栓発症準備状態を早期に診断できる可能性が示唆された。われわれの今回開発したFM測定法を用いた検討結果に基づくとFM40 μ g/ml以上は肺塞栓危険域といえる。しかし、実際の臨床では高値を示すものは肺血流シンチグラフィでは検出されない深部静脈血栓が存在する可能性があるため、超音波検査などにより下肢の深部静脈血栓を検索するなど早期の対策が必要と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kubo T, Tsuji H, Yamamoto T, Nakagawa M, Nakahara M, Hirasawa Y. Antithrombin III deficiency in a patient who have multifocal osteonecrosis. Clin. Orthop. 2000 in press
- (2) Motoo Hosokawa, Wook-Cheol Kim, Toshikazu Kubo, Yuichi Tsuchida, Torao Kusakabe, Yasusuke Hirasawa. Preliminary report on usefulness of magnetic resonance imaging for outcome prediction in early-stage Legg-Calv-Perthes disease. Journal of Pediatric Orthopaedics Part B, 8: 161-164, 1999
- (3) Nobuhiko Sugano, Toshikazu Kubo, Kunio Takaoka, Kenji Ohzono, Takao Hotokebuchi, Tadami Matsumoto, Hayato Igarasi, Setsuo Ninomiya, Multicenter Study of Diagnostic Criteria for Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head. J Bone Joint Surg 81-B:590-595, 1999
- (4) T Yamamoto, T Kubo, Y Hirasawa, Y Iwamoto, K Sueishi. A clinicopathologic study of transient osteoporosis of the hip, Skeletal Radiology, 28: 621-627, 1999
- (5) Tamon Kabata, Toshikazu Kubo, Tadami Matsumoto, Mitsuru Nishino, Katsuro Tomita, Shogo Katsuda, Takeshi Horii, Nobue Uto, and Isao Kitajima. Apoptotic cell death in steroid-induced osteonecrosis: An experimental study in

rabbits. Journal of Rheumatology, 27; 2166-2171, 2000

(6) Toshikazu Kubo, Takuaki Yamamoto, Shigehiro Inoue, Motoyuki Horii, Keiichiro Ueshima, Yukihide Iwamoto, Yasusuke Hirasawa. Histological Findings of Bone Marrow Edema Pattern on MR in Osteonecrosis of the Femoral Head - a case report -. Journal of Orthopaedic Science, 5; 520-523, 2000

(7) Toshikazu Kubo, Masafumi Kobayashi, Toshihiro Ishida, Shoichi Yamazoe, Mikihiro Fujioka, Shigehiro Inoue, and Yasusuke Hirasawa. A case of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head treated with transtrochanteric anterior rotational osteotomy combined with vascularized iliac bone grafting, Journal of Orthopaedic Science, 5; 610-613, 2000

(8) Toshikazu Kubo, Keishi Kamata, Masahiko Noguchi, Shigehiro Inoue, Motoyuki Horii, Mikihiro Fujioka, Yasusuke Hirasawa. Predictive value of MRI in avascular necrosis following talar fracture. Journal of Orthopaedic Surgery, 8: 59-63, 2000

(9) Toshikazu Kubo, Akihiro Kojima, Shoichi Yamazoe, Keiichiro Ueshima, Takuaki Yamamoto, Yasusuke Hirasawa. A case of osteonecrosis of femoral head which was developed after long-term topical steroid application. Journal of Orthopaedic Science, 6: 92-94, 2001

(10) Yukio Torii, Yukiharu Hasegawa, Toshikazu Kubo, Yoshihisa Koderu, Minami Yoshihisa, Yamada Yoshiaki, Hisashi Iwata: Osteonecrosis of the femoral head after allogenic bone marrow transplantation. Clin. Orthop. 2001, in press

(11) Sugano N, Ohzono K, Nishii T, Sakai T, Haraguchi K, Yoshikawa H, Kubo T: Early MRI findings of rapidly destructive coxopathy. Magnetic Resonance Imaging. 2001, in press

(15) Toshikazu Kubo, Isao Kitajima, Tadanobu Niratsuka, Atsushi Makinodan, Keiichiro Ueshima, Yasusuke Hirasawa. Fibrin monomer would be a useful predictor of pulmonary embolism following total hip arthroplasty. Journal of Orthopaedic Science, in press

(12)久保俊一：股関節および大腿. 新外来の整形外科
(平澤泰介編) P213-256、南山堂、東京、1999.1.12

(13)久保俊一：特発性大腿骨頭壊死症. 今日の整形外科
治療指針（第4版）668-672、医学書院、東京、
2000.1.15

(14)久保俊一、堀井基行：股関節軟骨と寛骨臼関節唇の
MRI 評価. 股関節外科（新整形外科 MOOK）、2001
印刷中

(15)久保俊一、藤岡幹浩：大腿骨頭壊死症の病態と自然
経過. 股関節外科（新整形外科 MOOK）、2001 印刷
中

(16)久保俊一：MRI. ゴールデンスタンダード. 南光
堂、2001 印刷中

(17)久保俊一：骨壊死症. ダイナミックメディスン. 西
村書店、2001 印刷中

(18)久保俊一：レッグ・カルペ・ペルテス病・単純性股
関節炎. 今日の治療指針. 医学書院、2001 印刷中

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

「血液流動性維持機構障害と特発性血栓症」に関する研究

小嶋 哲人

（名古屋大学医学部・教授）

リュウドカンはマウスにおいて胎盤の胎児血管および腎臓の一部の毛細血管に強く発現していた。ジーンターゲットングの手法を用いて作成されたリュウドカン欠損マウスにおいて胎盤および腎臓の組織像を比較検討した結果、腎臓においては大きな変化を認めなかったが、胎盤の胎児血管において野生型と比べ高度な変性を認め、それに伴うカルシウムの沈着も高度であった。また免疫染色の結果、フィブリンの沈着もリュウドカン欠損型の胎盤の胎児血管において高度であった。リュウドカンはアンチトロンビン、TFPI と親和性をもつ膜結合型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、その欠損により胎児血管のアンチトロンビン、TFPI を介しての血液流動性維持機構が障害され、胎児血管に血栓が生じ、その変性が高度になったことが推察された。

キーワード：血液流動性維持機構、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、リュウドカン、胎盤、ジーンターゲットング、微小血管

A. 研究目的

リュウドカンはラットの培養微小血管内皮細胞からアンチトロンビン (AT) 結合分子としてクローニングされた膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンで、そのヘパラン硫酸鎖には tissue factor pathway inhibitor (TFPI) も結合することが報告され、リュウドカンは生体において特に微小循環の抗凝固に関与していることが示唆されていた。しかし、どのような組織の微小血管においてリュウドカンが発現されているかについてはまだ報告がない。今回、マウスを用いてどのような組織の微小血管においてリュウドカンが発現しているかを解析し、その欠損による影響をリュウドカン欠損マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

リュウドカンの発現を解析は、マウスは 8 週齢の C57BL/6J を用い、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、皮膚、消化管、ならびに妊娠 11.5、13.5、15.5、17.5 日の胎児、胎盤も解析の対象とした。リュウドカン発現の有無は *in situ hybridization* および免疫染色で評価した。

リュウドカン欠損マウスはジーンターゲットングの手法を用いてヘテロマウスを作成し、C57BL/6J に 6 回戻し交配を行い、ヘテロ同士を交配することにより作

成した。胎盤、胎児での比較は欠損型と野生型とが同時に得られた場合に行った。組織は 4 %パラホルムアルデヒド/PBS で一晩 4℃で浸透固定し、その後パラフィンに包埋し、厚さ 6 マイクロメートルの切片を作成した。また、胎盤迷路層における血管変性の程度、カルシウムやフィブリンの沈着の程度はブラインドでスコアリングし、Mann-Whitney 検定を用いて $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

リュウドカンは胎盤の胎児血管と腎臓の一部の毛細血管の内皮において著明な発現を認め、特に胎盤では妊娠 11.5 日から 17.5 日の全て時期において胎児血管で強く発現されていた。他のシンデカンファミリーについても *in situ hybridization* を用いて発現を調べたが、胎児血管における発現はリュウドカンが最も顕著であった。

リュウドカン欠損マウスにおいて、腎臓の組織像には異常を認めなかったが、胎盤では妊娠 17.5 日において野生型と比較しより高度な胎児血管の変性を認めた（図 1 A, B）。コッサ染色を行い変性血管に沈着したカルシウムを比較検討したところ、リュウドカン欠損型においてより高度な沈着を認めた（図 1 C, D）。さ

らにフィブリンに対する免疫染色を行ったところ、同様にリュウドカン欠損型において変性血管により高度なフィブリン沈着を認めた(図 1 E, F)。ブラインドで血管変性、カルシウム沈着、フィブリン沈着について 3~4 段階でスコアリングした結果、いずれにおいても野生型に比べリュウドカン欠損型で有意に高度であった(図 2)。しかし、胎児の発育はリュウドカン欠損型と野生型において有意差を認めなかった。

D. 考察

血液流動性維持には血管内皮に発現している膜結合型ヘパラン硫酸プロテオグリカンが関与していることが示されてきたが、今回、シンデカンファミリーの一つであるリュウドカンがマウスにおいて胎盤の胎児血管と腎臓の一部の毛細血管の内皮で強く発現されることがわかった。胎盤の胎児血管においては、リュウドカンが欠損することによりリュウドカンのヘパラン硫酸鎖を介した AT、TFPI の活性化が低下し、そのため胎児血管内の血液凝固が起きやすくなり血栓形成を起こし、胎児血管の変性がより高度となった可能性が示唆された。しかし、その血管傷害は胎児の発育を妨げるほどではなかったため、リュウドカン以外にも胎児血管の抗凝固機転を維持する分子が働いていることが示唆された。リュウドカンは、特発性血栓症の誘因となる様々な組織傷害やサイトカイン等によりすみやかに発現することがわかっており、血液流動性を維持すべく血栓症の発症を防ぐ生理機能をもつことが示唆された。

E. 結論

膜結合型ヘパラン硫酸プロテオグリカン・リュウドカンは、マウス胎盤の胎児血管と腎臓の一部の毛細血管内皮で強く発現していた。リュウドカンの欠損により胎児血管ではフィブリンの沈着を伴う血管変性が野生型と比較しより高度であり、リュウドカンが胎盤の胎児血管において血液流動性維持に関与していることが示された。したがって、血管内皮障害等のため様々な生体現象に伴うリュウドカンのすみやかな機能発現による血液流動性維持が働かない場合に、特発性血栓症の発症につながることを示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) T. Kojima: Molecular biology of ryudocan, a endothelial heparan sulfate proteoglycan. *Semi. Thromb. Hemost.* 26 (1): 67-73, 2000.
- (2) T. Sugihara, T. Kojima, et al.: Identification of

- plasma antibody epitopes and gene abnormalities in Japanese hemophilia A patients with factor VIII inhibitor. *Nagoya J. Med. Sci.* 63 (1): 25-39, 2000
- (3) A. Katsumi, T. Kojima, et al.: Severe Factor VII Deficiency Caused by a Novel Mutation His348 to Gln in the Catalytic Domain. *Thromb. Haemost.* 83 (2): 239-243, 2000
- (4) K. Ishiguro, T. Kojima, et al.: Syndecan-4 Deficiency Impairs Focal Adhesion Formation Only under Restricted Conditions. *J. Biol. Chem.* 275 (8), 5249-5252, 2000
- (5) K. Iba, T. Kojima, et al.: The cysteine-rich domain of human ADAM12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that leads to b1-dependent cell spreading. *J. Cell. Biol.* 149 (5): 1143-1155, 2000.
- (6) I. Takahashi, T. Kojima, et al.: Detailed characterization of an anti-factor IX monoclonal antibody that neutralizes the prolonged ox brain prothrombin time of hemophilia BM by synthetic peptides. *Peptides* 21 (5): 603-753, 2000.
- (7) M. Sakata, T. Kojima, et al.: Ryudocan expression by luteinized granulosa cells is associated with the process of follicle atresia. *Fertil. Steril.* 74 (6): 1208-1214, 2000
- (8) K. Ishiguro, T. Kojima, et al.: Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J. Clin. Invest.* 106 (7): 873-878, 2000.
- (9) K. Ishiguro, T. Kojima, et al.: Syndecan-4 deficiency impairs the fetal vessels in the placental labyrinth. *Dev. Dynam.* 219 (6): 539-544, 2000.
- (10) T. Nakayama, T. Kojima, et al.: Short report: A case of purpura fulminans is caused by homozygous delta8857 mutation (protein C-nagoya) and successfully treated with activated protein C concentrate. *Br. J. Haematol.* 110 (3): 727-30, 2000.
- (11) Y. Nakayama, T. Kojima, et al.: Cloning and Characterization of the Murine Antithrombin Gene. *Thromb Res* 100 (3): 179-183, 2000.
- (12) T. Shimokawa, T. Kojima, et al.: Down-regulation of murine tissue factor pathway inhibitor mRNA by endotoxin and tumor necrosis

factor- α in vitro and in vivo. Thromb 100 (3): 211-221, 2000.

(13) Shinji Kunishima, T. Kojima, et al.: Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombo-cytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome). Blood 97 (4): 1147-1149, 2001.

2. 学会発表

(1) 国島伸治、小嶋哲人ら：連鎖解析による May-Hgglin Anomaly 責任遺伝子座の同定 第 62 回日本血液学会、福岡、平成 12 年 3 月

(2) 石黒和博、小嶋哲人ら：ジーンターゲティングを用いたフォーカルアドヒージョンにおけるリュウドカンの機能解析 第 62 回日本血液学会、福岡、平成 12 年 3 月

(3) K. Ishiguro, and T. Kojima: Syndecan-4 (Ryudocan) is a transmembrane protein with heparansulfate glycosaminoglycans. XVth International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis, Hamamatsu, Japan, 平成 12 年 6 月

(4) 石黒和博、小嶋哲人ら：シンデカン 4 (リュウドカン) 欠損による胎盤胎児血管の障害 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月

(5) 小嶋哲人、高木明ら：Long PCR 法を用いた血液凝固第 VIII 因子遺伝子の逆位 (Inversion) 解析 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月

(6) 高木明、小嶋哲人ら：血液凝固第 XIII 因子の遺伝子多型解析 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月

(7) 山本晃士、小嶋哲人ら：LPS 投与老齢マウスにおける PAI-1、TF 発現変化と血栓傾向第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月

(8) 竹下享典、小嶋哲人ら：早期老化モデル「klotho 遺伝子欠損マウス」における線溶系因子の発現と病理学的検討 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月

(9) 清水敦哉、小嶋哲人ら：アラニンスキャニング法を用いた血小板膜蛋白 GP Ib α 鎖の VWF への結合機序の解明 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月

(10) 清水敦哉、小嶋哲人ら：抗 GP Ib α 鎖抗体を用いた GP Ib α 鎖の VWF への結合機序の解明 第 23 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 12 年 11 月

(12) 石黒和博、小嶋哲人ら：ジーンターゲティングにより解明されたシンデカン 4 (リュウドカン) の生体における機能と疾患における役割 第 23 回日本分子生物学会、神戸、平成 12 年 12 月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

H. 研究協力者

高木明、村手隆：名古屋大学医学部保健学科

石黒和博、柳田正光、中山享之、竹下享典、清水敦哉、山本晃士、松下正、齋藤英彦：名古屋大学医学部第一内科

腎疾患の進展におけるトロンビンの関与

北本 康則

（熊本大学医学部第3内科・講師）

これまでの基礎的な検討結果に基づいて、ネフローゼ症候群をきたす諸種の全身性疾患で尿中のトロンビン活性を測定した。ループス腎炎、糖尿病性腎症、アミロイドーシス症例の約半数でトロンビン活性が陽性となった。また活動度の高いループス腎炎ではトロンビン活性は陽性であり、寛解例では陰性であった。ワーファリン投与により尿中トロンビン活性は低下する傾向にあり、特に活性が高い例では大きく低下した。

A. 研究目的

ネフローゼ症候群では腎静脈血栓症を始め静脈血栓症の合併頻度が高く、過凝固状態にあると考えられている。全身性疾患による二次性ネフローゼ症候群で尿中のトロンビン活性を測定し、腎病変部の凝固活性について解析した。

B. 研究方法

ループス腎炎(LN)16例、糖尿病性腎症(DM)9例、アミロイドーシス3例、健常者13例で新鮮尿を採取し、その遠心上清を冷凍保存し測定に用いた。トロンビン活性は特異的基質の水解活性測定後、ヒルジンを加えて再度活性を測定し、その差を真の活性とした。LNで活動期と寛解期の尿中トロンビン活性を比較した。またワーファリン投与例で治療開始前と治療中の活性を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては特別な検査や特殊な薬物の使用を必要となかった。腎生検、尿の採取、薬剤の投与などについてはインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

LNでは6例で尿中トロンビン活性は陽性で、これは疾患活動性の高い例に多かった。寛解期の症例では活性はすべて陰性であった。DMでは5例で陽性、アミロイドーシスでは2例で陽性となった。健常者では全例陰性だった。LNとDMでは尿蛋白と活性に相関

は見られなかった。ワーファリン投与により5例中4例で活性は低下した。特に活性が高い例ほどよく低下した。尿中トロンビン活性は血中のトロンビン・アンチトロンビン複合体濃度と相関しなかった。

D. 考察

LN、DM、アミロイドーシスでは腎静脈血栓症の合併頻度が高く、DMでは血中でのトロンビン産生増加が報告されている。尿中トロンビン活性は全身のトロンビン産生の影響を受けないことから、これらの疾患で尿中の活性は腎病変部の凝固活性を反映すると考えられた。またLNの尿中トロンビン活性が病勢に応じて変わることから、糸球体の炎症に伴いメサンギウム細胞やマクロファージなどで組織因子発現が亢進し、外因系凝固の活性化によりトロンビン産生が亢進すると推測された。

E. 結論

二次性の腎疾患でも尿トロンビン活性は腎病変部での凝固活性の指標として有用であり、抗凝固療法の適応や治療量の設定に有用と考えられた。またトロンビン活性はループス腎炎の活動性のマーカーとしても有用であると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kitamoto Y, Matsuo K, Tomita K. Different response of urinary excretion of VEGF between

chronic and acute renal failure *Kidney Int* 59, 385-386, 2001

(2)Kitamoto Y, Tokunaga H, Miyamoto K, Tomita K. VEGF is an essential molecule for glomerular structuring. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 2001 (in press)

2. 学会発表

(1)Miyamoto K, Kitamoto Y, Tokunaga H, Tomita K Administration of VEGF165 suppresses endothelial injury and promotes repair of impaired glomeruli in experimental glomerulonephritis. *Mol Biol Cell* 11 (suppl) 235a, 2000

(2)腎炎糸球体でのトロンピン産生とその病態生理学的意義 北本康則、今村隆寿、福井博義、成瀬正浩、富田公夫 *日本腎臓学会誌* 42, 192, 2000

二次性腎疾患における尿中トロンピン活性の病態生理学的意義 北本康則、今村隆寿、福井博義、富田公夫 *臨床病理* 48 (suppl) 148, 2000

(3)VEGFによる糸球体構築とその維持 北本康則、竹屋元裕、徳永 寛、富田公夫 *日本臨床生理学会雑誌 (suppl)* 30, 2000

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

虚血部組織における血管新生誘導機構

池田 栄二
(慶應大学医学部病理・助手)

特発性ウィリス動脈輪閉塞症(脳血管モヤモヤ病)、糖尿病網膜症等の血栓性閉塞性血管疾患では、病変部組織において、虚血に陥った組織への血流を確保するための代償機構として血管新生が起こる。この血管新生過程は、疾患の病態に大きく関与する。これまでに我々は糖尿病網膜症における血管新生には、虚血網膜組織から産生される血管新生因子 VEGF が重要な役割を演じることを明らかにしてきた。今年度は、VEGF 産生細胞である網膜グリア細胞に焦点をあてた解析を行った。網膜組織よりグリア細胞の単離を行い、グリア細胞が遊走するとともに VEGF を産生することにより血管新生病変形成を誘導する機構の解明を試みた。これまでに、家兎網膜組織を用いグリア細胞の単離・培養系を確立し、糖尿病合併症の責任因子として注目されている糖化タンパク (AGE)による VEGF の発現誘導所見を得た。

A. 研究目的

特発性ウィリス動脈輪閉塞症(脳血管モヤモヤ病)、糖尿病網膜症等の血栓性閉塞性血管疾患では、虚血に陥った組織への血流を確保するための代償機構として血管新生が起こる。これまで我々は、糖尿病網膜症における網膜血管新生においては網膜組織より産生される VEGF、特に isoform VEGF165 が重要な役割を演ずることを明らかにしてきた。そこで今回は、VEGF 産生細胞である網膜グリア細胞に焦点を絞り、糖尿病網膜症網膜においてグリア細胞がいかんして血管新生を誘導するかを明らかにすることを目的とした。具体的には、網膜グリア細胞の単離・培養系の確立を行い、グリア細胞が網膜前に存在する基底膜を破壊し遊走するとともに VEGF を産生する機構につき解析を行った。遊走機構については、基底膜分解にかかわるプロテアーゼの特定等を試みた。

B. 研究方法

糖尿病網膜症増殖期病変(線維血管性組織)における VEGF 産生細胞の特定

増殖糖尿病網膜症患者より採取された線維血管性組織の組織切片を作製し、免疫染色、in situ hybridization を含む病理組織学的検索を行い、VEGF 産生細胞の特定を行った。

網膜グリア細胞の単離・培養系の確立

網膜組織よりグリア細胞の単離を行う。動物としては家兎を用いた。家兎網膜組織は血管を有する領域と血管のない無血管領域よりなるが、無血管領域網膜を無菌的に採取しハサミにて裁断し小組織片を得た。得られた網膜組織片を 1 週間浮遊培養した後、fibronectin coat dish に移し培養した。Dish に接着した組織片から増殖・遊走する細胞を継代培養することにより、グリア細胞の単離を行った。得られた細胞に関して、GFAP に対する免疫染色を行いグリア細胞の確認を行う。また、fibronectin の他に non-coating dish, type I collagen-coated dish, type II collagen-coated dish, type IV collagen-coated dish を用いた培養も行った。

網膜グリア細胞における VEGF およびプロテアーゼ産生誘導

網膜症をはじめとする糖尿病網膜症合併症の責任因子の候補として知られている糖化タンパク(AGE)を調製し、網膜グリア細胞培養上清に加え細胞の AGE に対する反応性を検討した。今回は AGE として AGE 化 BSA(AGE-BSA)を用いたが、bovine serum albumin (BSA) を glucose と混合し 3 週間インキュベーションすることにより作製した。Non-coating dish, type I collagen-coated dish, type II collagen-coated dish, type IV collagen-coated

dish, fibronectin-coated dish)にて網膜グリア細胞を AGE-BSA (50 μ g/ml)存在下で 4 時間培養し、RNA を抽出、RT-PCR にて VEGF および各種プロテアーゼの発現誘導を検索した。糖尿病網膜症患者眼では非活性型 matrix metalloproteinase 2 (proMMP-2)の含有量が上昇しているが、proMMP-2 が活性化されるためには浸潤部局所に存在する細胞の膜上に膜型 MMP の 1 つである MT1-MMP が存在することが必要である。そこで、今回は AGE-BSA 刺激によりグリア細胞に MT1-MMP が誘導されるか否かについて検索を加えた。

C. 研究結果

糖尿病網膜症患者眼より手術的に切除された線維血管性組織は、新生血管、線維芽細胞、膠原線維よりなる組織であるが、GFAP に対する免疫染色を行った結果、検索した 22 検体全例においてグリア細胞の存在が確認された。さらに、VEGF mRNA に対する in situ hybridization を行ったところ、VEGF 産生細胞がグリア細胞であることが確認された(図 1)。

家兎網膜の組織断片を 1 週間浮遊培養した後、fibronectin-coated dish 上に移し培養したところ組織片から遊走・増殖する細胞がみられ(図 2 A)、継代することによりその純粋培養系をえることができた(図 2 B)。それらの細胞は、免疫染色にて GFAP 陽性でありグリア細胞であることが確認された(図 2 C)。

上記の培養網膜グリア細胞を BSA-AGE 存在下に、non-coating dish, type I collagen-coated dish, type II collagen-coated dish, type IV collagen-coated dish, fibronectin-coated dish にて培養し、RT-PCR にて VEGF の発現を検索した。その結果、VEGF の発現誘導が認められたが、non-coating dish にて培養されたグリア細胞において最も誘導が得られた(図 3)。同様に、グリア細胞における MT1-MMP の発現誘導を検索したが、有意な誘導所見は得られなかった。

D. 考察

糖尿病網膜症の血管新生病変に対する解析の結果、網膜グリア細胞が遊走するとともに VEGF を産生することが重要であることが示唆された。特に、網膜グリア細胞が網膜前に存在する基底膜を破壊し硝子体方向へ遊走することにより、網膜前に血管新生病変形成を誘導することが疾患の難治化につながると考えられた。そこで、我々は網膜グリア細胞に焦点を絞った解析を行うために、家兎網膜組織からのグリア細胞単離を試み、これまでに GFAP 陽性細胞をほぼ純粋培養系として単離することに成功した。

糖尿病には種々に合併症が知られているが、その誘因因子として糖化タンパク(AGE)が注目されている。我々は、糖化 BSA (AGE-BSA)を調製し、単離した網膜グリア細胞が AGE-BSA 刺激に反応して VEGF 産生が亢進されることを確認した。網膜前の基底膜を破壊し硝子体方向へ遊走する機構に関しては、今回は MT1-MMP の発現誘導に焦点を絞り検索した。即ち、グリア細胞の細胞膜上に MT1-MMP が誘導されれば、糖尿病網膜症の眼内で有意な高値を示す非活性型 proMMP-2 がグリア細胞の細胞膜上で活性化され、基底膜を破壊し遊走し得ると考えられる。ところが、今回検索した限りにおいては、少なくとも AGE-BSA 刺激では MT1-MMP の発現誘導所見は得られなかった。今後、AGE-BSA 以外の誘導因子を用いた検索、あるいは MMP-2/MT1-MMP 系以外の基底膜分解機構等に関する解析が必要と思われる。

E. 結論

糖尿病網膜症血管新生病変の形成には、網膜グリア細胞の遊走および VEGF 産生が重要であることが示唆された。また、家兎網膜組織よりグリア細胞の単離し解析した結果、AGE-BSA 刺激に反応してグリア細胞が VEGF を産生し得ることは示された。しかしながら、網膜から硝子体方向への網膜グリア細胞誘導機構に関しては今後の検索が待たれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Ishida S, Shinoda K, Kawashima S, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E: Co-expression of VEGF receptors VEGF-R2 and neuropilin-1 in proliferative diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:1649-1656, 2000
- 2)Otani A, Takagi H, Oh H, Suzuma K, Matsumura M, Ikeda E, Honda Y: Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:1192-1199, 2000
- 3)Takizawa M, Ohuchi E, Yamanaka H, Nakamura H, Ikeda E, Ghosh P, Okada Y: Production of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is selectively enhanced by calcium pentosan polysulfate in human rheumatoid synovial fibroblasts. Arthritis Rheum 43:812-820, 2000
- 4)Nakamura M, Fujishima S, Sawafuji M, Ishizaka A, Oguma T, Soejima K, Matsubara H, Tasaka S,

Kikuchi K, Kobayashi K, Ikeda E, Sadick M, Hebert CA, Aikawa N, Kanazawa N, Yamaguchi K: Importance of interleukin-8 in the development of reexpansion lung injury in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1030-1036, 2000

5)Watanabe M, Yu S-K, Sawafuji M, Kawamura M, Horinouchi H, Ikeda E, Kobayashi K: Experimental lung transplantation using non-penetrating vascular clips for anastomosis of the pulmonary artery. *Thorac Cardiovasc Surg* 48: 120-122, 2000

6)Hirose S, Hosoda Y, Furuya S, Otsuki T, Ikeda E: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors Correlates Closely with Formation of the Plexiform Lesion in Human Pulmonary Hypertension. *Pathol Int* 50:472-479,2000

7)Ikeda M, Hosoda Y, Hirose S, Okada Y, Ikeda E: Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors Flt-1, KDR, and neuropilin-1 in synovial tissues of rheumatoid arthritis. *J Pathol* 191:426-433, 2000

8)Jinzaki M, Tanimoto A, Mukai M, Ikeda E, Kobayashi S, Yuasa Y, Narimatsu Y, Murai M: Double-phase helical CT of small renal parenchymal neoplasms: correlation with pathologic findings and tumor angiogenesis. *J Comput Assist Tomogr* 24:835-42, 2000

2. 学会発表

1)石田 晋、篠田 啓、川島晋一、小口芳久、岡田保典、池田栄二：糖尿病網膜症の線維血管性増殖膜における Vascular Endothelial Growth Factor 受容体の発現. 第 53 回 日本臨床眼科学会 平成 11 年 10 月 東京

2)石田 晋、篠田 啓、川島晋一、小口芳久、岡田保典、池田栄二：若年発症の糖尿病網膜症における線維血管膜の VEGF 産生遊走グリア細胞による自己増殖機構. 第 104 回 日本眼科学会 平成 12 年 4 月 京都

3)池田栄二、石田 晋、岡田保典：増殖糖尿病網膜症血管新生における VEGF - VEGF 受容体系の関与. 第 89 回 日本病理学会総会 平成 12 年 4 月 大阪 ワークショップ III 血管病変の分子病理学的解析

4)Ishida S, Shinoda K, Kawashima S, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E: Co-expression of VEGF-R2 and neuropilin-1 in proliferative diabetic retinopathy.

2000 Annual Meeting, Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, Florida, April 30-May 5, 2000)

5)Ikeda E, Okada Y: Changes in the expression of vascular endothelial growth factor isoforms correlate with blood-brain barrier induction in the developing brain. XIth International Vascular Biology Meeting (Geneva, Switzerland, September 5-9, 2000)

6)Ishida S, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E: Co-expression of VEGF-R2 and neuropilin-1 facilitates fibrovascular proliferation in diabetic retinopathy. XIth International Vascular Biology Meeting (Geneva, Switzerland, September 5-9, 2000)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

原因不明の血栓が原因となる難治性疾患の 横断的研究： 慢性肺高血圧における微小血栓の関与について

坂巻 文雄

（国立循環器病センター内科・医師）

原発性肺高血圧症に代表される難治性肺高血圧症例(PH)において血管内皮細胞障害と関連する血栓形成傾向を検討するために血管内皮上に発現する接着因子(ICAM-1, VCAM-1)の血漿中可溶性分画濃度と血漿トロンボモジュリン(Thrombomodulin: 以下 TM)および血小板活性化の指標としての血漿 P-selectin 濃度を測定した。PH 群の血漿中 VCAM-1 濃度、P-selectin 濃度は対照群よりも有意に高値であった。PH 群の血漿中 TM 濃度は対照群よりも有意に低値であった。プロスタサイクリン(PGI₂)の持続注入療法後には血漿 VCAM-1、P-selectin は低下し、一方で血漿 TM 濃度は上昇した。また呼気ガス中の一酸化窒素(NO)含有量が高値であった群は PGI₂ の効果がより良好であった。以上より難治性肺高血圧症例においては VCAM-1、P-selectin の上昇で表される血管内皮細胞障害と炎症細胞の粘着、TM の低下で表される血管内皮の抗血栓活性の低下、P-selectin の上昇で表される血小板活性化が病態に重要な関与をしていることが示唆された。また PGI₂ の治療効果は呼気中 NO の高低に反映される血管内皮機能の残存の有無に影響を受ける可能性があると考えた。

A. 研究目的

原発性肺高血圧症(Primary pulmonary hypertension: 以下 PPH)に代表される重症の肺高血圧 (Pulmonary hypertension: 以下 PH) の成因として肺血管内皮障害による肺血管収縮および血管平滑筋の増殖とともに凝固線溶異常による微小血栓も何らかの役割を果たすことが推測されるがその機序は明らかでない。昨年度までの研究で我々は慢性高度肺高血圧においては肺血管内皮細胞障害に関連した血小板凝集および凝固線溶異常が病態の悪化因子として考えられ、これらは臨床症例において血漿中の P-selectin、トロンボモジュリン(Thrombomodulin: 以下 TM)の異常に反映されることを示した。

今年度は上記指標に加え血管内皮障害の指標および血管内皮細胞と好中球、リンパ球など炎症細胞との接着および相互作用の指標として PH 症例における血中の ICAM-1 (Intracellular adhesion molecule 1)および VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1) の可溶性分画の濃度を測定した。対照群と PH 症例との比較を行うとともに PPH に対する有効な治療法であるプロスタサイクリン(PGI₂)の持続注入療法前後でのこれらの指標の変化を追跡した。また今年度は血栓形成の要因である血管内皮障害を非侵襲的にかつ血液以外の臨床検体を用いて反映させることができるかを検討する目的で血管拡張因子である一酸化窒素(Nitric oxide: 以下 NO)の呼気中濃度を PGI₂の持続注入療法を施行した PH 症例にお

いて測定した。

B. 研究方法

(1) 血管内皮障害と凝固異常の血漿中諸指標の測定

当院に入院し重症の肺高血圧 (PH)と診断され、担当医および2名以上の循環器または呼吸器専門医の判断で PGI2 持続注入療法が必要と考えられ、同療法を開始された PPH13 名と膠原病による2次性肺高血圧症例7名の計20名(男8名、女12名;36±10歳;平均±標準偏差)を対象 (PH 群)とした。投与開始前に右心カテーテルにて肺血行動態を評価し、血漿検体を採取した。内頸静脈または鎖骨下静脈に中心静脈注入手用カテーテルを挿入し、PGI2 を 2ng/kg/min.より投与開始した。関節痛などの副作用が許容範囲内である限り、自覚症状および運動耐用能の改善傾向が認められるまで1週間あたり 2ng/kg/min. ずつ投与量を増量した。投与開始後約3ヵ月後に血漿検体を再度採取し投与前後での上述の血液マーカー(P-selectin, TM, ICAM-1, VCAM-1)の血漿中濃度を EIA 法にて測定した。臨床上明かな循環器および呼吸器疾患を有さない8例(男7例、女1例;35±6歳)を対照群とした。対象とした患者群には糖尿病、血清クレアチニン値 1.6mg/dl 以上の腎機能障害、活動性の感染症を認めなかった。また肺高血圧患者群と対照群の間に末梢血液中の血小板数、血清コレステロール、中性脂肪値に有意差を認めなかった。患者群はすべて循環不全や右心不全の所見を認めない安定期と思われる時期に検体採取をおこなった。われわれの予備的検討では今回重点的に検討した TM と P-selectin および ICAM-1、VCAM-1 はワーファリンの投与により有意な測定値の変化はきたさなかった。

(2) 呼気中一酸化窒素(NO)のプロスタサイクリン治療前後での測定

当院に入院し PGI2 持続注入療法を開始された PPH19 名と膠原病による2次性肺高血圧症例4名の計23名(男7名、女16名;37±11歳)を対象とした。PGI2 持続注入療法の開始前と開始後平均3ヵ月を経過した時点で右心カテーテルにて肺血行動態(平均肺動脈圧: mean pulmonary arterial pressure: mPAP および肺動脈血管抵抗: pulmonary arterial vascular resistance: PVR)を評価するとともに血液中の脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide: BNP)を測定し、肺血行動態、右心負荷の改善程度を評価した。PGI2 投与による mPAP、PVR、

血中 BNP の改善率を以下の式で表した。改善率 (%)= $(\text{PGI2 投与後の値}-\text{投与前の値})/\text{PGI2 投与前の値}$ X100 同時期に呼気中の NO 含有量を米国 Sievers 社製の化学発光一酸化窒素測定装置 (Sievers NO Analyzer: Model-280 NOA)を用いて測定した。被験者にマウスピースを漏れがないようくわえさせ、一定の口腔内圧 (20cmH2O)で10秒以上呼出させ、上気道の NO の関与を除いた呼気中 NO 濃度(単位 ppb)を化学発光法にて測定した。呼気 NO 含有量(FeNO)の治療前の値により肺高血圧患者群を全測定値の中央値を境に2群に細分化した。すなわち中央値より FeNO が高値である高 NO 群と中央値より FeNO が低値である低 NO 群とに2分した。高 NO 群と低 NO 群の間で PGI2 治療による治療前の肺血行動態や BNP の値および PGI2 によるこれらの改善率に違いがあるかを検討した。

すべての結果は平均値±標準偏差で表した。肺高血圧患者群と対照群間の比較および呼気 NO での検討における高 NO 群と低 NO 群間の比較には unpaired-t-test を用いた。肺高血圧群における PGI2 治療前後の比較には paired t-test を用いた。p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

(倫理面への配慮) 検体採取および右心カテーテル検査に際しては患者本人または家族に本研究の意義を説明し、本研究への参加が自由意志によるものであること、参加への同意をいつでも撤回できること、参加を断っても診療上何ら不利益にならないことも説明し、同意を得た。

C. 研究結果

(1)血管内皮障害と凝固異常の血漿中諸指標の測定

表1に対照群と PH 群の血漿中 ICAM-1、VCAM-1、P-selectin、TM 濃度の比較を示した。対照群と比べ PH 群では血漿中可溶性 VCAM-1 濃度の高値、同 P-selectin 濃度の高値、同 TM 濃度の低値を認めた (p<0.05)。血漿中可溶性 ICAM-1 濃度は対照群と PH 群の間に統計学的有意差はなかった。PGI2 治療前後での上記指標の変化を検討した。血漿 P-selectin は PGI2 投与前 (239.1+150.8ng/mL)と比べ投与後(183.2+92)は低下し正常化する傾向を示した (p<0.05)。血漿 TM 濃度は投与前(1.9+0.9ng/mL)と比べ投与後(2.4+0.5)は上昇し正常化する傾向を示した (p<0.01)。血漿 ICAM-1 濃度は治療前(326.2+133.9ng/mL)と治療後(325.9+152.9)で有意

差はなかった。血漿 VCAM-1 濃度は治療前は高値(1082.7+475.7ng/mL)であったが図 1 に示す様に PGI2 投与後は多くの例で低下(894+418)した ($p<0.05$)。

(2)呼気中一酸化窒素(NO)のプロスタサイクリン治療前後での測定

投与前の呼気 NO 濃度の中央値($FeNO=14.6ppb$)から対象の肺高血圧患者群($n=23$)は高 NO 群($n=12$)と低 NO 群($n=11$)とに細分化された。高 NO 群と低 NO 群の間には表 2 に示すように PGI2 投与前の肺血行動態 (平均肺動脈圧および肺動脈血管抵抗)や血中 BNP 濃度に有意差はなかった。表 3 に示すように PGI2 投与後の肺血行動態や BNP は高 NO 群および低 NO 群両者で改善したが PVR および血中 BNP の改善率は低 NO 群の方が不良であった。

D. 考察

本年度の研究で我々は PPH を主とする重症肺高血圧症例ではの血漿中 P-selectin 濃度の高値、TM 濃度の低値に加え、血漿 VCAM-1 濃度が対照群よりも有意に高値であることを示した。またプロスタサイクリン (PGI2)の持続注入療法後には P-selectin の低下、血漿 TM 濃度の上昇に加え、血漿 VCAM-1 濃度が低下することを明らかにした。また呼気ガス中の一酸化窒素(NO)含有量が高値であった群は PGI2 の効果がより良好であることを示した。近年血管内皮で産生される様々な抗血栓性因子または血栓形成あるいは血小板凝集を促進または抑制する因子および血管内皮とリンパ球や好中球等の炎症細胞との粘着を介し炎症学的機序の進行に関与する因子が近年明らかにされてきている。生理的条件下では血管内皮細胞は抗血栓活性が優位となっており、一方内皮細胞を炎症性サイトカイン(IL-1、TNF など)やエンドトキシンなどで刺激すると血栓形成的な機能が優位となってくる。この際種々の接着因子が血管内皮あるいは炎症細胞上に発現することが知られている。動物実験においてモノクロタリンによる肺高血圧発症ラットのモデルにおいては微小血栓の存在と同時に近年 IL-1 などの炎症性サイトカインの関与も示されている。また臨床研究においては PH 症例での炎症性サイトカイン 15)の亢進が示されている。また PPH 患者の肺組織においてロイコトリエンの産生を促す 5-lipoxygenase(5-LO)および 5-LO 活性化蛋白の亢進が示されており、凝固線溶の異常と密接な関係があるので

はないかと考えられる。今回示された肺高血圧症例における P-selectin の高値と VCAM-1 の高値は PPH などの原因不明かつ難治性肺高血圧において血管内皮障害と炎症細胞の接着の関与を示すものであり、TM の低値と P-selectin の高値はこれら内皮障害に基づく血管内皮細胞の抗血栓作用の低下と血小板活性化による血栓形成傾向を示唆するものと考えられる。今回の検討で血漿 ICAM-1 濃度が対照群との比較、PGI2 治療前後の比較いずれにおいても有意差を示さなかった原因は不明である。慢性の肺高血圧においては炎症過程の進行あるいは程度は緩徐かつ軽度である可能性がある。

VCAM-1 が少量の炎症性サイトカインの刺激により初めて発現されるのに対し、ICAM-1 常時血管内皮や繊維芽細胞に発現していることは群間の差がでにくかった一つの要因である可能性が考えられる。

PPH における TM の減少、P-selectin の増加および VCAM-1 の増加は同疾患に対する有効な治療法であるプロスタサイクリン(PGI2)の持続注入療法により改善する傾向を示した。PGI2 による治療効果発現機序として PGI2 に平滑筋増殖や血管壁リモデリングに対する抑制作用や血小板凝集抑制作用など血管拡張作用以外の作用が推定されているが明らかにはなっていない。本検討で示された PGI2 による血漿 P-selectin の改善は同薬による血小板凝集抑制作用により肺循環のみならず体循環での血小板活性化の抑制さらには微小血栓形成が抑制された機序が原因の一つと考えられる。しかし血漿中 TM の改善はそれのみでは説明できず PGI2 に血管内皮機能とくに抗血栓活性を改善する効果が期待できると考えられる。さらに VCAM-1 の改善は同剤が炎症や種々の圧ストレスによる刺激により生じる血管内皮上での接着因子の発現を抑制することで病態の進行を抑制している可能性がある。このように PGI2 は肺高血圧に対し種々の効果が期待できるが一方で関節痛、顔面紅潮、低血圧など種々の副作用を有し、また現段階では持続点滴静注のみが唯一の投与経路である。今回述べたような機序の解明から本疾患群に対する血管拡張のみでない、抗血栓および抗炎症さらには血管内皮機能の改善を目標とした特異的かつ簡便な治療法が開発されることが期待される。

PGI2 は確かに PPH など重症肺高血圧に対し有効な治療法であるがその効果には個体差がありその効果の予

測は治療前には困難である。この治療効果の差にはその個体の持っている残存する血管内皮機能に差があると考えられる。低下した血管内皮機能は血栓形成傾向を誘発するためこれを非侵襲的に予測することは臨床的意義を有すると思われる。今回治療前の呼気 NO 含有量が多い群が相対的に PGI₂ 治療反応性の良い傾向が認められた。これはもし喘息をはじめとする気道疾患の関与が少ないあるいは無視できる条件下での検討ならば呼気 NO が血管内皮の発現する NO を反映するとともに、血管内皮の NO 発現能力が豊富もしくは残存している群の方が治療効果あるいは予後が良好であることを示唆すると考えられる。呼気 NO は肺高血圧において肺血管内皮機能の残存を反映し、内皮障害に基づく凝固線溶障害を推定する非侵襲的な方法となりうる可能性が示唆された。

E. 結論

本年度の検討では以下の 2 点が示唆された

(1) 原発性肺高血圧症(PPH)またはその類似病態においては血漿 VCAM-1 高値、P-selectin 高値、トロポモジュリン(TM)低値が認められた。これらは慢性難治性肺高血圧においては血管内皮障害、炎症学的刺激にもとづく内皮細胞と炎症細胞の粘着、および血管内皮のもつ抗血栓活性の低下が関与することを示唆した。またこれらの諸因子の異常は PGI₂ 治療により改善し同剤の血管拡張以外の慢性効果を表すものと考えられた。

(2) PPH をはじめとする難治性肺高血圧症例は呼気 NO の高い群と低い群とに分けられ、高 NO 群は低 NO 群にくらべ PGI₂ 治療の効果が良好であった。肺高血圧の治療において残存する内皮機能、抗血栓形成傾向を非侵襲的に評価する方法として呼気 NO が有用である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Miyamoto, N. Nagaya, T. Satoh, S. Kyotani, F. Sakamaki, M. Fujita, N. Nakanishi, K. Miyatake. Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 487-492; 2000.
- 2) N. Nagaya, T. Satoh, T. Nishikimi, M. Uematsu,

S. Furuichi, F. Sakamaki, H. Oya, S. Kyotani, N. Nakanishi, Y. Goto, Y. Masuda, K. Miyatake, K. Kangawa. Hemodynamic, renal and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 101 (5): 498-503; 2000.

3) T. Hasuda, T. Satoh, A. Shimouchi, S. Kyotani, I. Sakamaki, N. Nagaya, N. Nakanishi, K. Miyatake. Improvement in exercise capacity with nitric oxide inhalation in patients with precapillary pulmonary hypertension. *Circulation* 101: 2066-2070; 2000.

3) H. Oya, N. Nagaya, T. Satoh, F. Sakamaki, S. Kyotani, M. Fujita, N. Nakanishi, K. Miyatake. Haemodynamic correlates and prognostic significance of serum uric acid in adult patients with Eisenmenger syndrome. *Heart* 84: 53-58; 2000.

4) F. Sakamaki, T. Satoh, N. Nagaya, S. Kyotani, H. Oya, N. Nakanishi, S. Kuribayashi, Y. Ishida. Correlation between severity of pulmonary arterial hypertension and ¹²³I-metaiodobenzylguanidine left ventricular imaging. *J Nucl Med* 41: 1127-1133; 2000.

5) N. Nagaya, T. Nishikimi, M. Uematsu, T. Satoh, S. Kyotani, F. Sakamaki, M. Kakishita, K. Fukushima, Y. Okano, N. Nakanishi, K. Miyatake, K. Kangawa. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 102: 865-870; 2000.

6) F. Sakamaki, S. Kyotani, N. Nagaya, N. Sato, H. Oya, T. Satoh, N. Nakanishi. Increased Plasma P-selectin and Decreased Thrombomodulin In Pulmonary Arterial Hypertension Were Improved By Continuous Prostacyclin Therapy. *Circulation* 102: 2720-2725; 2000.

7) N. Nagaya, T. Nishikimi, M. Uematsu, T. Satoh, H. Oya, S. Kyotani, F. Sakamaki, K. Ueno, N. Nakanishi, K. Miyatake, K. Kangawa. Hemodynamic and hormonal effects of adrenomedullin in patients with pulmonary