

方、成熟B細胞数は56Rマウスでは著明に減少し、また、DNAに反応するB細胞はほとんど存在しないことが明らかとなった。この結果は、56Rマウスでは、移行期B細胞段階から成熟B細胞段階にかけて、自己反応性B細胞の除去がおこることを示している。この自己反応性B細胞の除去が、CD40L/56Rダブルトランスジェニックマウスでは破綻していることが明らかとなった。実際、このマウスでは、成熟B細胞数がほぼ正常マウスと同程度に回復し、また、移行期B細胞と同程度のDNAとの反応性を認めた。

自己反応性成熟B細胞の減少は、移行期B細胞から成熟B細胞にかけての、自己反応性B細胞の分化の阻害、あるいは、細胞死によると考えられる。CD40Lが分化阻害を解除するか、あるいは、細胞死を阻害するかを検討するために、我々は、マウスに経口的にBrdUを投与することにより、B細胞のターンオーバーを検索した。その結果、移行期B細胞のターンオーバーは、56RとCD40L/56Rダブルトランスジェニックマウスで変化はなかった。一方、成熟B細胞のターンオーバーは56Rマウスでは正常マウスに比べ著明に亢進していたが、CD40Lにより著明に遅延し、正常マウスと同程度になった。この結果は、CD40Lにより短縮していた成熟B細胞の寿命が、正常化したことを示し、自己反応性B細胞の細胞死が阻害されたことを強く示唆する。

以上の結果から、2本鎖DNA反応性B細胞は、骨髄内でのクローン除去とともに、末梢組織の成熟B細胞段階でも、細胞死によるクローン除去を受けることが明らかとなった。そこで、骨髄での除去と末梢での除去は、同様の自己反応性B細胞が骨髄および末梢の2段階の除去を受けるのか、あるいは、それぞれが異なった性状の自己反応性B細胞を標的にするのかが問題となる。56Rは、抗DNA抗体のH鎖のみのトランスジェニックマウスで、このH鎖は種々のL鎖と会合してDNAと反応する。しかし、56RはL鎖により

DNAへの親和性などが少しずつ変化する。56RとλL鎖の組み合わせで抗2本鎖DNA抗体ができあがり、このような自己反応性B細胞が骨髄で除去を受けることは既に知られている。CD40L/56Rダブルトランスジェニックマウスの成熟B細胞中のλL鎖陽性細胞はフローサイトメトリーではほとんど検出できなかった。この結果は、λL鎖陽性DNA反応性B細胞は骨髄で除去はされるが、末梢での除去は受けていないことを示す。したがって、末梢での除去は、骨髄で除去を受けなかった自己反応性B細胞を除去するものと考えられる。どのような性状の自己抗体が末梢で除去を受けるのかを明らかにする目的で、現在、CD40L/56Rダブルトランスジェニックマウスの脾細胞由来のDNA抗体のL鎖のレパートアを検索中である。

D. 考察

本研究において、我々は、B細胞上におけるCD40Lの検出法を開発した。これまで、SLE患者およびSLEモデルマウスBXS BのB細胞でCD40Lの異所性発現があることが報告され、また、我々が明らかにしたようにCD40LのB細胞での異所性発現によりSLE様の自己免疫疾患の発症がおこるなど、SLEの発症、病態形成にCD40Lが重要な役割を果たすことが示唆される。しかし、B細胞がCD40を発現するために、B細胞でのCD40Lの発現を正確に測定するのは容易ではなかった。今回の我々の成果により、SLE患者B細胞でのCD40Lの発現を正確に検出することができるようになり、その結果、B細胞でCD40Lを発現するSLE患者を正確に把握し、さらに、CD40LのSLE発症における役割について検討することが可能になった。B細胞上にCD40Lの発現が見られた場合には、そのCD40Lが、疾患制御の重要な標的となると考えられる。

さらに、我々は、CD40Lによる自己トランス破綻の詳細について明らかにし、自

己反応性B細胞の除去がこれまで知られていた骨髄の未熟B細胞段階のみではなく、末梢の成熟B細胞段階でもおこること、CD40Lが未熟B細胞段階のクローン除去は解除しないが、成熟B細胞の除去を解除することを明らかにした。CD40Lにより自己免疫疾患が発症するので、この結果は、自己免疫疾患発症防止における成熟B細胞段階でのトレランスの重要性を示している。さらに、ある特定の自己反応性B細胞が、中枢と末梢とトレランスを2段階受けるのではなく、異なった自己反応性B細胞が標的となっていることが示唆された。今後、どのような性状の自己反応性B細胞が末梢トレランスの標的になっているのかを明らかにする必要がある。このような点が明らかになれば、自己免疫疾患患者由来の自己抗体の性状を検討することにより、中枢性または末梢性トレランスの異常を明らかにできるようになり、予後の予測因子となると共に、中枢性または末梢トレランスを標的とした治療法の開発とあいまって、原因に応じたオーダーメイド治療ができるようになると思われる。

E. 結論

SLE 発症にCD40LのB細胞での異所性発現の関与が示唆される。B細胞でのCD40L発現の検索は容易ではなかったが、今回我々は、その的確な検出法を開発した。また、また、末梢リンパ組織の成熟B細胞段階で自己反応性B細胞が死滅し、CD40Lがこの自己反応性B細胞の死滅を阻害し、自己トレランスの破綻を引き起こすことを明らかにした。したがって、末梢B細胞トレランスの異常の修復によりSLEのより根本的な治療法の開発が可能となることが示唆される。

F. 研究発表

1. Tsubata, T., Wakabayashi, C. and Adachi, T. (2001): Regulation of B cell antigen receptor signaling by CD72. In "Activating and Inhibitory

Immunoglobulin-like Receptors" (ed. by Max D. Cooper, Toshiyuki Takai, and Jeffrey V. Ravetch) p. 123-128, Springer-Verlag Tokyo.

2. Suzuki, A., Tsukio-Yamaguchi, M., Ohteki, T., Sasaki, T., Kaisho, T., Kimura, Y., Yoshida, R., Wakeham, A., Higuchi, T., Fukumoto, M., Tsubata, T., Ohashi, P., Koyasu, S., Penninger, J. M., Nakano, T. and Mak, T. W. (2001): T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* 14: 523-534.
3. Adachi, T., Wienands, J., Wakabayashi, C., Yakura, H., Reth, M. and Tsubata, T. (2001): SHP-1 requires inhibitory co-receptors to down-modulate B cell antigen receptor-mediated phosphorylation of cellular substrates. *J. Biol. Chem.* 276: 26648-26655.
4. Tsubata, T. (2001): Molecular mechanisms for apoptosis induced by signaling through the B cell antigen receptor. *Int. Rev. Immunol.* 20: 791-803.
5. Higuchi, T., Aiba, Y., Nomura, T., Matsuda, J., Mochida, K., Suzuki, M., Kikutani, H., Honjo, T., Nishioka, K. and Tsubata T. (2002): Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease. *J. Immunol.* 168: 9-12..

抗リン脂質抗体症候群の診断における抗プロトロンビン抗体の測定意義について

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）

研究要旨

【目的】抗プロトロンビン抗体は重要な抗リン脂質抗体のひとつであるが、抗リン脂質抗体症候群(APS)の臨床症状との相関が疑問視され、APS の診断には採用されていなかった。我々のこれまでの検討から、ホスファチジルセリンを固相化してカルシウムの存在下でプロトロンビンとの複合体をつくってこれを抗原とするホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)が APS のマーカーとなりうるということがわかった。本研究では抗プロトロンビン抗体の測定意義について検討する。【方法】当科および英国人自己免疫疾患患者あわせて 441 人を対象とした。aPS/PT は、PS を ELISA プレートに固相化後、5mM CaCl₂ の存在下でプロトロンビンを加え、PS-プロトロンビン複合体をプレート上の抗原として測定した。次に、マウス抗ヒトプロトロンビン抗体 231D を作成した。231D は aPS/PT 活性をもつが、プロトロンビンを ELISA プレートに直接固相化した場合は結合せず、APS 患者にみられる aPS/PT と類似していた。231D を正常血漿に 50-2 μ g/ml に加えると LA スクリーニング検査(希釈 aPTT, dRVVT および KCT)で濃度依存性に凝固時間延長を示した。サンプル血漿を同じ正常血漿で 1:4 に希釈し、上記 3 法で LA テストをおこなって、231D の段階希釈で作成した標準曲線から 231D 1.0 μ g/ml に相当するサンプル血漿の抗凝固活性を 1.0 ACU として半定量化した。【結果】IgG aPS/PT は APS と診断された患者の 43% に検出され、非 APS 患者の 6% に比べて有意に高頻度であった。163 人の自己免疫疾患患者を対象とした。このうち 40 人に APS の臨床症状を認め、ACU が基準値（健常人 30 例の平均+2SD）を超えたものはそのうち 20 人で、非 APS 患者 123 人中 33 人に比べて有意に多かった（オッズ比 2.73[1.31-5.70]）。ワーファリン使用患者で LA 陰性者 6 人の ACU は全員感度以下であった。【結語】aPS/PT は APS に特異性の極めて高いマーカーとして有用である。モノクローナル aPS/PT である 231D は LA の半定量化に使用可能で、これを利用すれば LA の標準化が可能である。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は代表的な獲得性血栓性疾患で、静脈血栓症、動脈血栓症あるいは流産の臨床症状に伴って抗リン脂質抗体が検出される症候群である。抗リン脂質抗体とは、凝固検査であるループスアンチコアグラント(LA)と、抗カルジオリピン抗体(aCL)あるいはカルジオリピン以外のリ

ン脂質を「抗原」とした免疫学的検査 (ELISA など) によって検出される自己抗体の総称である(1)。

1998 年に APS の診断基準案が国際抗リン脂質抗体シンポジウムにて提案され (Sapporo-Criteria) (2)、これをもとに我が国での診断基準を整備する予定である。この診断基準案のなかで、APS の診断のために

IgG または IgM の β 2-グリコプロテイン I 依存性抗カルジオリピン抗体、あるいはルーブスアンチコアグラント(LA)陽性を証明することが必須となっている。しかし、比較的標準化がすすんでいる前者にくらべて LA の判断基準は各施設でまちまちで、結果の解釈に大きな差異がでる。LA 判定のためのガイドライン作成が診断基準整備のために急がれている。

抗プロトロンビン抗体は重要な抗リン脂質抗体のひとつであるが、APS の臨床症状との相関が疑問視され、APS の診断には採用されていなかった。しかし抗プロトロンビン抗体は測定法によって結果がまったく異なっている。昨年国際血栓止血学会の標準化検討委員会 (ISTH-SSC)でも抗プロトロンビン抗体がとりあげられ、その標準化につき議論されたが、APS のマーカーとしての意義については未解決のままであった。SSC でとりあげられたのはプロトロンビンを抗原として直接 ELISA プレートに固相化する方法 (aPT)のみであったが、我々(2)のこれまでの検討から、ホスファチジルセリンを固相化してカルシウムの存在下でプロトロンビンとの複合体をつくってこれを抗原とするホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT)が APS のマーカーとなりうることがわかった。

今回、3年間のまとめとして、aPS/PT の測定意義、モノクローナル aPS/PT を使用した半定量的 LA、また APS 患者から作成したヒト型のモノクローナル aPS/PT の特性を検討した結果をふまえて、現在の APS 診断における抗プロトロンビン抗体測定の意義につきディスカッションする。

B.研究方法

1. aPS/PT の測定と aPT との比較

当科および英国人自己免疫疾患患者あわせて 441 人を対象とした。aPS/PT は、PS を ELISA プレートに固相化後、5mM CaCl_2 の存在下でプロトロンビンを加え、PS-プロト

ロンビン複合体をプレート上の抗原として測定した。aPT はヒトプロトロンビンを直接酸化プレート(Maxisorp、Nunc 社)に固相化して測定した(4)。

2. モノクローナル aPS/PT の作成

Balb/c マウスをヒトプロトロンビン (Enzyme Research、米国) 50mg/マウスで完全フロイントアジュバンドとともに 1 回、続いて不完全フロイントアジュバンドとともに 2 回免疫した。脾細胞とミエロマ細胞を融合してハイブリドーマを作成し、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体アッセイでスクリーニングした。陽性ウエルのうち aPT 陽性ウエルを除外、すなわち aPS/PT 陽性、aPT 陰性クローンを選択した。

得られたホスファチジルセリン依存性モノクローナル抗プロトロンビン抗体、231D を Balb/c ヌードマウス腹腔内に注入し、3 週目に腹水を採取した。プロテイン A カラムを用いて IgG を精製した。

3. 半定量的 LA アッセイ

正常血漿に 231D を 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 mg/ml として調整し、aPTT(試薬名 PTT-LA、Diagnostica Stago 社、仏国)、dRVVT(試薬名グラディポア試薬 1、グラディポア社、米国)、KCT(試薬名カオリンサスペンション、ベーリング社、独国)を測定した。

163 人の自己免疫疾患患者を対象とした。このうち 47 人に抗リン脂質抗体症候群分類基準案(1998)に記載された APS の臨床症状 (血栓症または流死産)のエピソードがあった。

患者血漿：正常血漿を 20:80 でミックスして測定サンプルとし、上記試薬をそれぞれの試薬を用いて aPTT、dRVVT、KCT を測定した。

231D を加えた正常血漿の凝固時間を Y 軸、231D の濃度を X 軸としてそれぞれの凝固時

間をプロットし、標準曲線を作成した。測定サンプルの凝固時間を標準曲線から「231D X $\mu\text{g/ml}$ に相当する抗凝固活性」として X Anticoagulant Unit(ACU) と表現した。健康人 30 人より同様に測定サンプルを用意し、その凝固時間の平均+2SD をそれぞれの試薬の正常上限とした。

C. 研究結果

IgG aPS/PT は APS と診断された患者の 43% に検出され、非 APS 患者の 6% に比べて有意に高頻度であった。抗体価の分布を図 1 に示す。IgG aPT もあわせて測定したが、APS 群で 22%、非 APS 群で 12% と、aPT も APS と有意に相関していたが、その相関は aPS/PT と APS のそれにくらべると弱かった。

231D は aPS/PT 活性をもつが、プロトロンビンを ELISA プレートに直接固相化した場合は結合せず、APS 患者にみられる aPS/PT と類似していた。また、231D はプロトロンビナーゼの存在下のプロトロンビン生成を強く抑制し、抗凝固活性をもつことが示された。

163 人の対象患者を APS の臨床症状のある群のない群にわけ、ACU の分布を検定したところ。aPTT、dRVVT、KCT のいずれにおいても APS の臨床症状をもつ群の ACU はもたない群にくらべて有意に高かった。

3 試験のうち少なくともひとつの ACU が正常値を超えている場合を LA 陽性とした。APS の臨床症状をもつ群 47 人中 LA 陽性は 22 人であり、もたない群 116 人中 31 人にくらべて有意に多かった (オッズ比 2.41 [1.19-4.88])。

古典的 LA 検査で陽性であった患者はワーファリンの使用の有無にかかわらず ACU は正常値を超えていたが、ワーファリン使用前に LA 陰性が確認できている患者ではすべて ACU は正常範囲であった。

aPTT と dRVVT、および KCT と dRVVT

での ACU を比較した。それぞれ ACU には有為な相関があったが、乖離する例が多くみられた。

D. 考察

aPT/PS は APS の臨床症状に特異性の高いマーカーとしての役割をもつ可能性が示された。また、おそらく LA の補助診断として有用である。多施設での確認が今後必要であるが、APS の診断基準案にとりいれていくことを検討したい。aPT で検出される抗プロトロンビン抗体は、aPS/PT 陽性者にもみられる一方、多くの不一致例が認められた。aPT と LA や APS の相関は弱く、aPT の APS のマーカーとしての有用性は確認されなかった。LA や APS と関連した抗プロトロンビン抗体検出の方法としては aPT より aPS/PT が優れていることが示された。

これとは別に、モノクローナル aPS/PT である 231D を用いれば LA の半定量化が可能となり、よりの確な LA 判定が行えることが確認された。ワーファリン投与の影響をうけないのもこの半定量アッセイの大きな利点であり、LA 標準化にむけて有用な材料である。

今後、aPS/PT およびモノクローナル aPS/PT を用いた LA 検査は、抗リン脂質抗体測定 of 標準化に有用であると考えられる。

E. 結論

aPS/PT およびモノクローナル aPS/PT を用いた LA 検査は、抗リン脂質抗体測定 of 標準化に有用であると考えられる。

F. 参考文献

1. Atsumi T, Matsuura E, Koike T. Immunology of antiphospholipid antibodies and co-factors. in "Systemic Lupus Erythematosus". ed. R. Lahita, Academic Press (in press).
2. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T,

Lockshin MD, Branch DW, Piette JC et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11

3. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, Koike T. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 43: 1982-93, 2000

4. Bertolaccini ML, Atsumi T, Khamashta MA, Amengual O, Hughes GRV. Autoantibodies to human prothrombin and clinical manifestations in 207 patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998;25:1104-8

IgG aPS/PT (U)

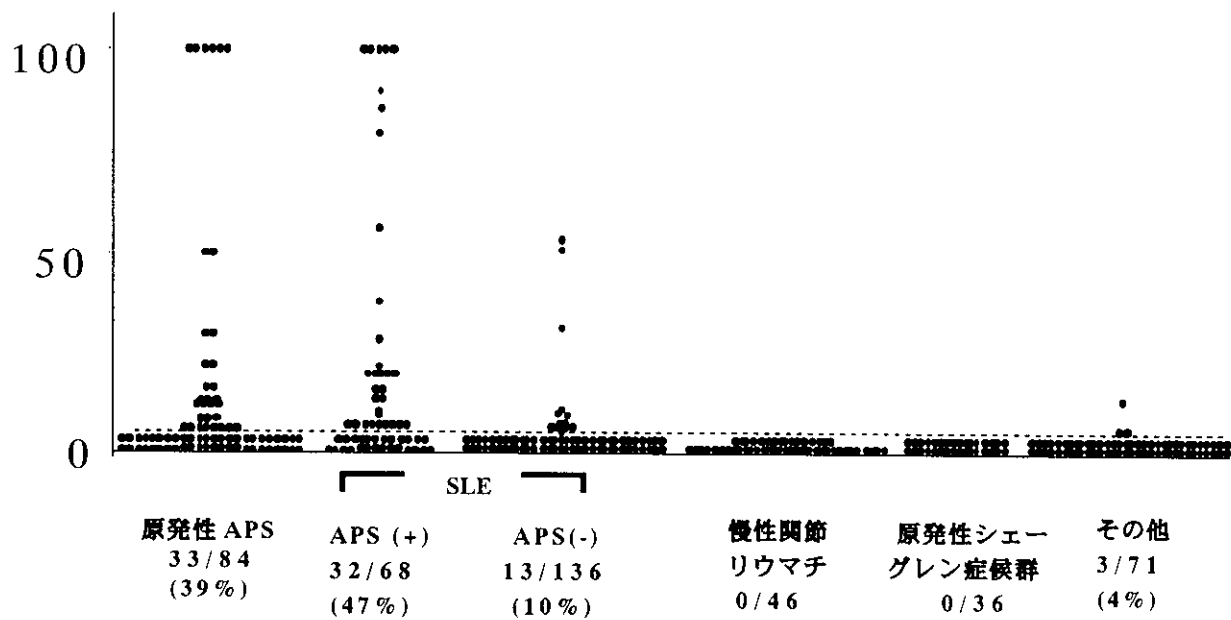


図 1. ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の分布

酸化 LDL の測定法と抗リン脂質抗体症候群における酸化 LDL の臨床意義に
関する研究

松浦栄次（岡山大学大学院医歯学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学・細胞化学分野）

研究要旨

昨年度の本特定疾患対策事業で、抗 β 2-グリコプロテイン I 抗体（抗 β 2-GPI 抗体）に特異的な酸化 LDL 由来のリガンドの 1 つ（oxLig-1）が、7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate であることを特定した。本年度は、硫酸銅処理による酸化 LDL より、新たに oxLig-2 を単離精製し、その構造が 7-ketocholesteryl-12-carboxy (keto) dodecanoate であることを明らかにした。また、 β 2-GPI リガンドのアナログとして、7-ketocholesteryl-13-carboxytridecanoate (13-COOH-7KC) を合成した。これら全てのリガンドは、*in vitro* の実験系で、明らかに β 2-GPI および抗 β 2-GPI 自己抗体の標的になっており、マクロファージの Fc γ 受容体を介する酸化 LDL の取り込みに関与していることが示された。さらに、これらのリガンドに共通して存在するカルボキシル基をメチル化すると、 β 2-GPI との反応性が完全に消失してしまうことが、TLC によるリガンドプロット、ELISA、およびマクロファージの培養系で示された。これまでの一連の結果より、 β 2-GPI のリガンドが cholesteryl linoleate の酸化体で、 ω 位のカルボキシル基が活性中心であることが明らかになった。一方、 β 2-GPI リガンド、 β 2-GPI、および β 2-GPI 自己抗体の三者間の反応性を利用して酸化 LDL の測定系を確立し、抗リン脂質抗体症候群（APS）および SLE を中心に血中酸化 LDL の臨床意義について検討を行った。その結果、酸化 LDL が APS における動脈血栓症のリスクファクターであることが明らかとなったほか、APS 患者の血中を酸化 LDL が β 2-GPI および抗 β 2-GPI 抗体との免疫複合体として循環していることが判明した。酸化 LDL 測定法の診断薬としての実用化は、APS の診断や経過観察のために有用で、厚生・保健行政上の意義も大きい。

A. 研究目的

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自己抗体が出現する「抗リン脂質抗体症候群（APS）」は、血栓症に由来する様々な臨床症状を呈する。それらは多彩であり、また、習慣流産と抗体陽性との関連も認められている。とりわけ、aCL の対応抗原が β 2-グリコプロテイン I（ β 2-GPI）であることや、抗 β 2-GPI 抗体と本疾患に於ける動脈血栓症の既往との間に関連がある可能性が示されてきた。

近年、抗 β 2-GPI 抗体に依存的なマクロファージによる酸化 LDL の取り込みが起こることを示した。昨年、酸化 LDL 由来の β 2-GPI リガンドとして cholesteryl linoleate の酸化体の 1 つ（oxLig-1、すなわち、7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate）を同定

した。本年度は、別のリガンド(oxLig-2；7-ketocholesteryl-12-carboxy(keto) dodecanoate)を同定するとともに、7-ketocholesteryl-13-carboxytridecanoate(13-COOH-7KC)を化学合成し、リガンド分子中の β 2-GPI 結合部位を特定した。さらに血中酸化 LDL の診断法を確立し、血中酸化 LDL の病因的意義について解析した。

B. 研究方法

1. β 2-GPI に特異的なリガンドの精製と同定 硫酸銅で処理して得られた酸化 LDL より、 β 2-GPI に特異的なリガンド（oxLig-1 および oxLig-2）を TLC および HPLC を用いて精製し、質量分析（LC/MS）および NMR によって構造決定した。

2. β 2-GPI リガンドの合成 7-ketocholesterol、

azelaic acid、および brassylic acid を用い、縮合反応により oxLig-1 および 13-COOH-7KC を化学合成した。また、これら β 2-GPI の ω 位カルボキシル基を 1-methyl-3-nitro-1-nitrosomethylguanidine を用いてメチル化した。

3. マクロファージによる取り込み実験
精製あるいは合成 β 2-GPI リガンドを組み込んだ ^3H 標識ホスファチジルコリン含有リポソームのマクロファージ (J774A.1) への結合量 (あるいは取り込み量) を測定した。

4. 抗 β 2-GPI \cdot oxLig-1 複合体抗体価の測定
oxLig-1 固相化ポリスチレンプレートおよび β 2-GPI を用いる ELISA にて、血清中抗 β 2-GPI \cdot oxLig-1 複合体抗体価を測定した。なお、 β 2-GPI 依存的 aCL および抗 β 2-GPI 抗体は定法により測定した。

5. 血中酸化 LDL の測定
血中酸化 LDL を、モノクローナル抗 β 2-GPI 自己抗体 (WB-CAL-1) を固相化したポリスチレンプレートおよび標識モノクローナル抗アポ B-100 抗体を用いて測定した。原理としては、oxLig-1 を介して形成された β 2-GPI \cdot 酸化 LDL 複合体を上記の2種類の抗体を用いて検出するものである。

6. 血中の抗原特異的免疫複合体の測定
マイクロタイタープレートに抗 apoB 抗体もしくは抗 β 2-GPI 抗体を固相化し、プローブとして HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を用いる ELISA 法で、血中の酸化 LDL \cdot β 2-GPI \cdot 抗 β 2-GPI 抗体 (IgG) 免疫複合体および β 2-GPI \cdot 抗 β 2-GPI 抗体 (IgG) 免疫複合体を各々測定した。

C. 研究結果

1. β 2-GPI リガンドの構造 : 抗 β 2-GPI 抗体依存的なマクロファージによる酸化 LDL の取り込みを媒介する複数の β 2-GPI リガンドを酸化 LDL より TLC および HPLC で精製し、質量分析等により構造解析した (J. Lipid Res. 42:697, 2001)。主要なリガンドは、oxLig-1 (7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate; 9-oxo-(7-ketocholest-5-en-3 β -yloxy)nonanoic acid (IUPAC)) および oxLig-2 (7-ketocholesteryl-12-carboxy(keto)dodecanoate) であった。さらに、

β 2-GPI リガンドのアナログとして、7-ketocholesteryl-13-carboxytridecanoate (13-COOH-7KC) を化学合成した (投稿中)。これらのリガンドに共通する構造は、脂肪酸の ω 位がカルボキシル化していることであったため、このカルボキシル基をメチル化により修飾したところ、 β 2-GPI との結合との結合が消失し、マクロファージへの取り込みも見られなくなった。

2. β 2-GPI \cdot oxLig-1 複合体自己抗体、酸化 LDL、および各種免疫複合体の臨床意義 : 合成 oxLig-1 \cdot β 2-GPI を固相抗原として行う ELISA にて APS および SLE (127 例) を対象に自己抗体を測定したところ、本自己抗体陽性と動脈血栓症の既往との間に強い関連が認められた。その他にも、抗体陽性と静脈血栓症や、妊娠中毒症 \cdot 胎盤血流減少を伴った早産 \cdot 習慣流産などの妊娠異常との間に有意な関連が認められたが血小板減少との間には関連が認められなかった。血中酸化 LDL の異常高値は、SLE や APS 以外にも、糖尿病、慢性腎炎、および慢性腎不全で (陽性率 30-70%) 認められた。APS および SLE を対象とする解析では、APS に特徴的ないずれの臨床症状と酸化 LDL との間にも関連が認められなかった。しかしながら、酸化 LDL 陽性群および陰性群別に抗 oxLig-1 \cdot β 2-GPI 複合体抗体と臨床症状との関連について解析したところ、酸化 LDL 陽性患者群でのみ、本抗体と血栓症の既往との間に、強い関連が認められた。更に、抗原特異的な免疫複合体を測定したところ、血栓形成と関連の深い一連の自己抗体、すなわち、 β 2-GPI 依存的 aCL、抗 β 2-GPI 抗体、および抗 β 2-GPI \cdot oxLig-1 抗体価は、 β 2-GPI \cdot 酸化 LDL との IgG 免疫複合体の量と相関があった。

D. 考察

血中酸化 LDL は、APS や SLE に特異的に出現するのではなく、様々な疾患で外因性の酸化ストレスにより出現するが、とりわけ抗 β 2-GPI 抗体陽性の APS 患者においては、血栓症 (特に動脈血栓症) 発症のリスクファクターであると考えられる。抗 β 2-GPI 抗体が酸化 LDL および β 2-GPI との複合

体として APS 患者血中を循環していることも新たに示された。

E. 結論

更に詳細な解析の必要があるが、APS における血栓形成の予知、診断に、自己抗体を測定すると同時に、酸化 LDL を測定することが必要である可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi, K., Matsuura, E., Liu, Q., Furukawa, J., Kaihara, K., Inagaki, J., Atsumi, T., Sakairi, N., Yasuda, T., Voelker, D.R., Koike, T. A specific ligand for β -glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. *J. Lipid Res.* 42: 697-709, 2001.
2. Inagaki, J., Matsuura, E., Nomizu, M., Sugiura-Ogasawara, M., Katano, K., Kaihara, K., Kobayashi, K., Yasuda, T., Aoki, K. IgG anti-laminin-1 autoantibody and recurrent miscarriages. *Am. J. Reprod. Immunol.* 45:232-8, 2001.
3. Kang, Y., Matsuura, E., Sakamoto, T., Sakai, M., Nishi, S. Analysis of epitopes of mouse monoclonal antibodies against human alpha-fetoprotein. *Tumour Biol.* 22: 254-261, 2001.
4. Matsuura, E., Kobayashi, K., Kasahara, J., Yasuda, T., Makino, H., Koike, T., Shoenfeld, Y. Anti- β 2-glycoprotein I autoantibodies and atherosclerosis. *Int. Rev. Immunol.* (in press)
5. Atsumi, T., Matsuura, E., Koike, T. Immunology of Antiphospholipid antibodies and cofactors. *Systemic Lupus Erythematosus*. Fourth Edition, Lahita, R.G., ed., Academic Press, New York, (in press)

2. 学会発表

1. Matsuura, E., Kobayashi, K., Liu, Q.,

Kasahara, J., Kaihara, K., Inagaki, J., Koike, T., Voelker, D.R. OxLDL-ligand for β 2-glycoprotein I and a possible mechanism on autoantibody-mediated atherosclerosis. Gordon Research Conference.

Atherosclerosis Session. (Meriden, New Hampshire, USA, June, 2001)

2. Matsuura, E., Kobayashi, K., Liu, Q., Kasahara, J., Inagaki, J., Koike, T., Voelker, D.R. OxLDL-ligand for β 2-glycoprotein I and a possible mechanism on autoantibody-mediated atherosclerosis. Kern-Aspen Lipid Conference. (Aspen, Colorado, USA, August, 2001)
3. Matsuura, E., Liu, Q., Kobayashi, K., Voelker, D.R., Koike, T. A ligand for β 2-glycoprotein I: ω -carboxyl variants of cholesteryl ester. (The third Int. Congress on Autoimmunity. (Geneva, Switzerland, March, 2002)
4. Matsuura, E., Inagaki, J., Tartakover-Matalon, S., Blank, M., Aoki, K., Koike, T., Shoenfeld, Y. An association of IgG anti-laminin-1 autoantibodies with reproductive failure. (Geneva, Switzerland, March, 2002)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 松浦栄次. β 2-グリコプロテイン I に対するリガンドおよびその用途. 国内特許出願: 特願 2001-272475 号、PCT 出願: PCT/JP02/00723 号
2. 松浦栄次、抗ラミニン-1 抗体の測定法. 国内特許出願: 特願 2000-355148、PCT 出願: PCT/JP01/10138 号

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

IL-6 阻害による間質性肺炎の治療法の開発に関する研究

西本 憲弘（大阪大学健康体育部健康医学第一部門）

研究要旨

間質性肺炎は膠原病患者の予後を左右する合併症の一つである。間質性肺炎の病態は炎症細胞浸潤と組織修復機転としての肺の繊維化からなる。ラット肺への遺伝子導入実験により前者にはinterleukin-6 (IL-6)が、後者にはtransforming growth factor β (TGF- β) が関与することが示唆されている。過去2年間の研究で、IL-6 トランスジェニックマウスの肺病変が multicentric Castleman's disease (MCD)患者に合併した lymphocytic interstitial pneumonia (LIP) と類似の病理所見を呈したことから、IL-6 トランスジェニックマウスがヒトの LIP のモデルとなること、また、全身的な高 IL-6 血症により LIP が生じることが明らかとなった。このマウスに抗 IL-6 受容体 (IL-6R)抗体を投与すると気管支血管束や肺胞隔壁への炎症細胞浸潤や浮腫状の変化が改善されたことから、ヒトの LIP でも IL-6 阻害治療が有効である可能性が示唆された。今回 MCD に LIP を合併した患者に対してヒト型化抗 IL-6R 抗体治療を行い、治療効果を高分解能 CT(HRCT)を用いて評価した。スリガラス陰影、小葉中心性粒状影、小葉間隔壁の肥厚、気管支血管束の肥厚に関しては改善が認められた。これらの CT 所見は炎症細胞浸潤を反映し、IL-6 阻害により可逆的に改善することが示唆された。浸潤影と嚢胞については改善が見られなかった。IL-6 阻害治療は炎症細胞浸潤が主体の LIP の治療に有効であること、その治療の評価に HRCT が有効であることが明らかとなった。また IL-6 阻害により TGF β が低下すること、ならびに肺間質へのコラーゲン沈着を抑制すると考えられる matrix metalloprotease-2 (MMP-2) が増加することから IL-6 阻害が繊維化をも抑制する可能性がある。今後ヒト型化抗 IL-6R 抗体が肺繊維症への進行を予防するか否かについてさらに検討したい。

A. 研究目的

間質性肺炎は膠原病患者の予後を左右する合併症の一つである。ステロイドや免疫抑制剤といった現在用いられている治療法に抵抗性を示す症例があり、新しい治療法の開発が必要とされている。

multicentric Castleman's disease (MCD)は原因不明の全身性炎症性疾患であり、自己免疫性血小板減少症や自己免疫性溶血性貧血などの自己免疫現象に加え lymphocytic interstitial pneumonia

(LIP)を高頻度(約70%)に合併する。MCDでは腫大リンパ節からinterleukin-6 (IL-6)の過剰産生が認められ、このIL-6が炎症病態を形成すると考えられる。一方、これまでの研究で共同研究者の林らは間質性肺炎においてIL-6とIL-6Rの発現がリンパ球やマクロファージなど炎症性細胞浸潤を、transforming growth factor β (TGF- β)が肺繊維芽細胞の増生と細胞外マトリックスの沈着を伴う繊維化を引き起こすことをラット肺への遺

伝子導入実験により明らかにした。

昨年度、IL-6 トランスジェニックマウスの肺病変が MCD 患者に合併した LIP と類似の病理所見を呈することを明らかにし、全身的な高 IL-6 血症により LIP が生じることを確認した。さらにこのマウスに抗 IL-6 受容体(IL-6R)抗体を投与すると、気管支血管束や肺胞隔壁への炎症細胞浸潤や浮腫状の変化が改善したことから、ヒトの LIP でも IL-6 阻害治療が有効である可能性が示唆された。

今回我々は、MCD に LIP を合併した患者に対してヒト型化抗 IL-6R 抗体治療を行い、LIP に対する有効性を検討した。評価方法としては高分解能 CT(HRCT)を用いた。また肺間質へのコラーゲン沈着を抑制すると考えられる matrix metalloprotease-2 (MMP-2) に対する IL-6 阻害の影響を検討した。

B. 研究方法

(1) 対象患者：インフォームドコンセ

ントを得た LIP 合併 MCD (plasma cell type) の患者 6 人を対象とした。

(2) ヒト型化抗 IL-6R 抗体 (MRA) 治療: 5 人は MCD に対する治験として実施し、残り 1 人は大阪大学先進医療審査会ならびに厚生労働省監視指導課の許可を得て治験外で治療を行った。治験では 2 週間隔で 2mg/kg、4mg/kg、8mg/kg を各 3 回ずつ、治験外では 8mg/kg 投与を 2 週間隔で投与し、投与前および投与開始後約 6 ヶ月後の肺所見を HRCT で評価した。

(3) 評価方法: HRCT を用いた。HRCT はスライス間隔 5-10 mm、スライス厚 1 mm 以下の条件で撮影した。LIP に特徴的な異常陰影をスリガラス影、浸潤影、嚢胞、小葉中心性粒状影、小葉間隔壁の肥厚、気管支血管束の肥厚の 6 種類に細分化し、各々の項目について点数化を行い治療前後で比較検討を行った。気管分岐部および下大静脈流入部を境に左右それぞれ、上肺野、中肺野、下肺野に分けた。その 6 区分それぞれについて、各区分に含まれる全 HRCT スライスを用いその区分の病変を評価した。病変は 0-100%まで 10%間隔で点数化した。今回は 6 区分間で病変に有意な差を認めなかったため 6 区分の平均値で評価した。なお病変は存在するが 10%に満たない場合はすべて 10%とした。

スリガラス影、浸潤影、嚢胞、小葉中心性粒状影に関しては各 HRCT スライスの全体の面積中の病変部の面積の割合を算出した (図 1)。小葉間隔壁は正常では HRCT で検出できないが、肺全体では約 50-100 個の 2 次小葉が存在する。小葉間隔壁の肥厚は、全肺野に網目状にある小葉間隔壁を想定して、そのうちの肥厚した小葉間隔壁の割合で算出した。気管支血管束の肥厚については、分岐の見える部分は分節から分節までを 1 単位、また横断面や斜断面も 1 単位ととらえ、可視範囲の全体の単位数のうち肥厚を有する割合で評価した。

(4) 検定方法: 抗 IL-6R 抗体治療前後の評価は対応ある 2 群間の T 検定で行った。

(5) MMP-2 測定: 抗 IL-6R 抗体治療前および投与後約 6 ヶ月後の患者血清中の MMP-2 を enzyme-linked immunosorbent assay kit (Amersham pharmacia 社) を用いて行った。

C. 研究結果

(1) 抗 IL-6R 抗体治療による HRCT 所見の変化: 抗体治療前後の HRCT での評価結果を図 2 に示した。スリガラス陰影 (治療前 $17.5 \pm 6.2\%$; 治療後 $10.8 \pm 3.7\%$) は改善傾向は見られたものの統計学的な有意差は認められなかった。小葉中心性粒状影 (前 $9.7 \pm 2.0\%$; 後 $5 \pm 2.2\%$)、小葉間隔壁の肥厚 (前 $19.7 \pm 7.9\%$; 後 $12 \pm 6.3\%$)、気管支血管束の肥厚 (前 $22.2 \pm 7.3\%$; 後 $11.7 \pm 5.0\%$) に関しては有意に改善した。浸潤影 (前 $0.8 \pm 0.4\%$; 後 $1.1 \pm 0.6\%$) と嚢胞 (前 $7.8 \pm 2.2\%$; 後 $9.7 \pm 2.3\%$) については有意差は認められなかった。浸潤影については一定の傾向がなく、また嚢胞については変化のない 2 例を除いてむしろ増加傾向が見られた。

(2) 抗 IL-6R 抗体治療前後の血中 MMP-2 の変化: 図 3 は IL-6 阻害治療を行ったときの血清中の MMP-2 の変化を示す。投与前 5 例は正常範囲内であった。抗体療法により増加傾向を示したが統計学的な有意差はなかった。

D. 考察

LIP の HRCT 所見とその所見に対応する病変部位ならびに病理像、抗 IL-6R 抗体治療による HRCT 所見の変化を表に示した (表 1)。HRCT における小葉中心性粒状影、小葉間隔壁の肥厚、気管支血管束の肥厚の病変部位は小葉中心や小葉間隔壁、気管支血管周囲といったいわゆる広義間質である。これらの病理所見には繊維性変化も含まれるがほとんどは炎症細胞浸潤である。HRCT で有意な改善が認められたことは炎症性細胞浸潤が可逆性であり IL-6 阻害により改善することを示唆する。スリガラス陰影は肺胞隔壁がその病変部位で、炎症細胞浸潤を反映すると考えられ、改善傾向を示したのはやはり IL-6 阻害が炎症細胞の浸潤を改善したことによると思われる。一方、浸潤影に対応する病変部位は肺胞および肺胞隔壁で、炎症細胞浸潤、肺胞内の浸出液、繊維化など多様な病理像を反映していると考えられる。治療により一定の傾向が見られなかったのは、これらの割合が必ずしも均一でなく個々の症例により異なり、しかもその中には不可逆な所見も含まれたと考えられる。嚢胞は肺胞・肺胞

隔壁が病変部位で、肺胞の破壊を反映している。嚢胞は不可逆的な変化であり、改善しなかったと思われる。また浸潤影の消失後に嚢胞の出現が見られた症例があった。浸潤影出現の時点で肺胞隔壁の破壊がすでにあり、IL-6 阻害により炎症が改善し、HRCT 所見における浸潤影が消失した後、嚢胞のみが残った可能性がある。嚢胞の出現は治癒機転を示しているのかもしれない。

以上の結果より IL-6 阻害治療は炎症細胞浸潤が主体の LIP の治療に有効であることが明らかとなった。

では IL-6 阻害治療は肺の繊維化に対しても有効であるのだろうか？

IL-6 阻害が炎症性細胞浸潤を改善し、結果的に繊維化へと進行するのを防ぐ可能性がある。昨年示したように IL-6 阻害により TGF β が低下すること、また、IL-6 阻害治療を中止すると病勢の再燃とともに TGF β がもとのレベルにもどったことを考えると、抗 IL-6R 抗体は TGF β の産生抑制を介して、肺繊維化を予防する可能性がある。また、IL-6 阻害による MMP-2 の増加もコラーゲンの沈着を抑制しているのかもしれない。しかし、今回検討した MCD では、LIP が中心で、繊維化病変がもともと少なく、そのことは KL-6 が正常範囲にあることにも反映されている。IL-6 阻害治療が真に繊維化を予防できるか否かについては臨床試験で明らかにしていかなければならない。

E. 結論

IL-6 阻害が LIP の治療に有効であること、その治療の評価に HRCT が有効であることが証明された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Sugamata Y, Nakahara H, Katsume A, Sugimoto M, Yoshizaki K, Nishimoto N: The Cytokine Odyssey 2001. Hawaii, USA. Nov. 8-11, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予

定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 評価方法

- 1) スリガラス影
- 2) 浸潤影
- 3) 嚢胞
- 4) 小葉中心性粒状状影



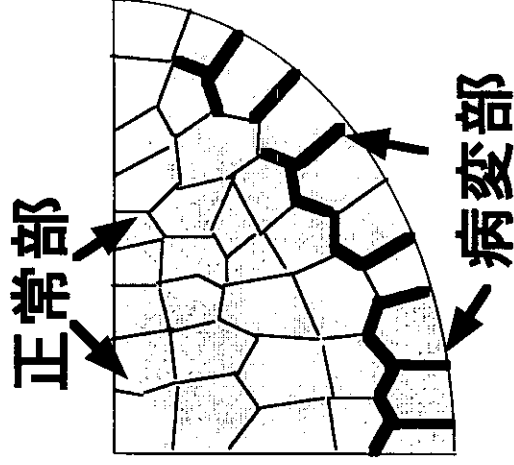
<例 スリガラス影>

各CTスライスにおいて

$$\frac{\text{病変部の面積} \square}{\text{全体の面積}} \times 100 (\%)$$

5) 小葉間隔壁の肥厚

$$\frac{\text{小葉間隔壁の肥厚部分}}{\text{全体の小葉間隔壁}} \times 100(\%)$$



6) 気管支血管束の肥厚

$$\frac{\text{気管支血管束の肥厚部分}}{\text{全体の気管支血管束}} \times 100(\%)$$

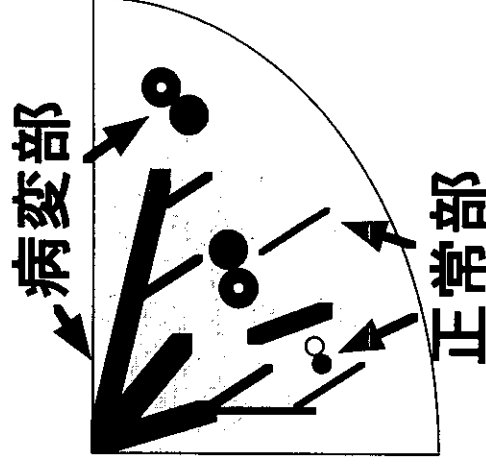
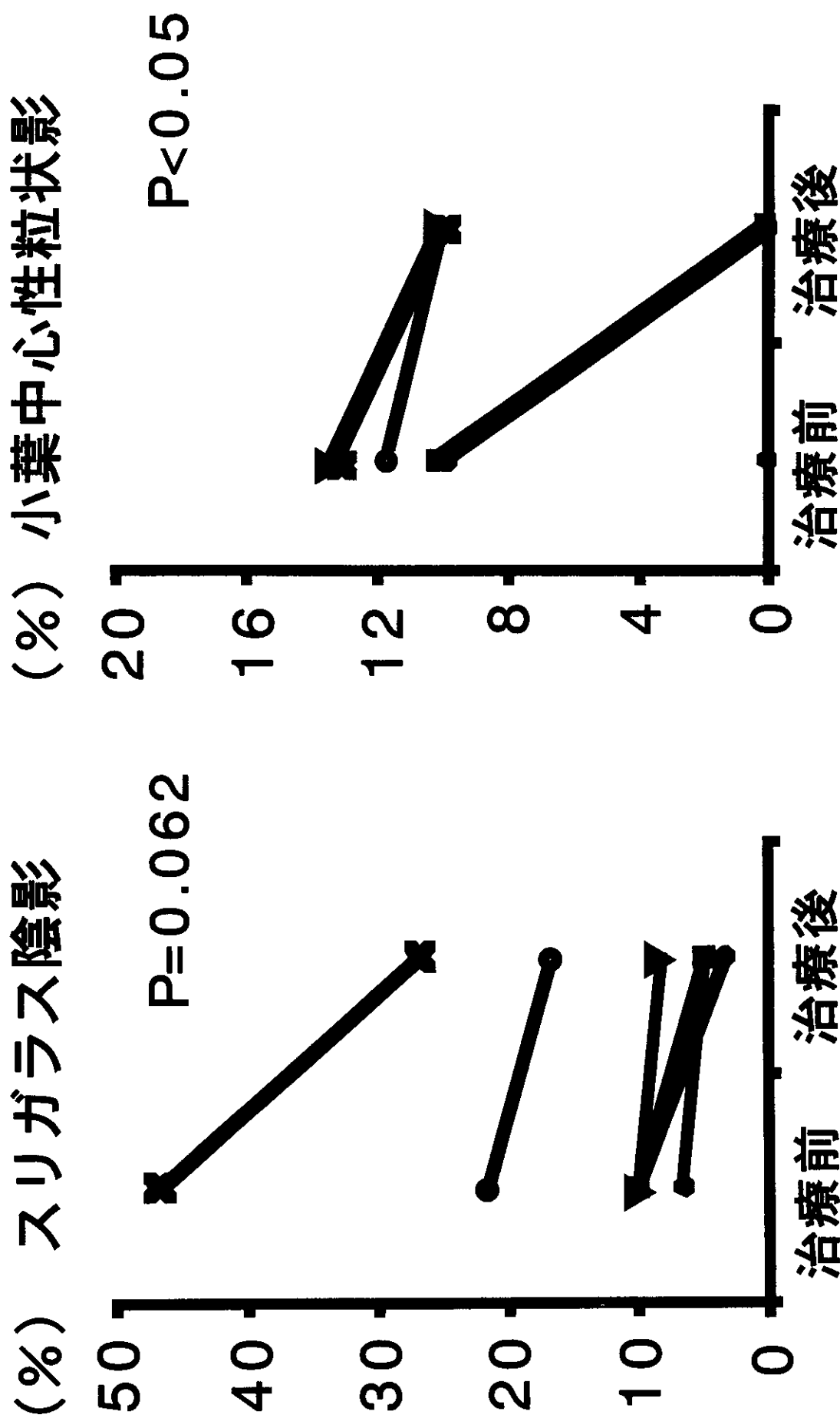
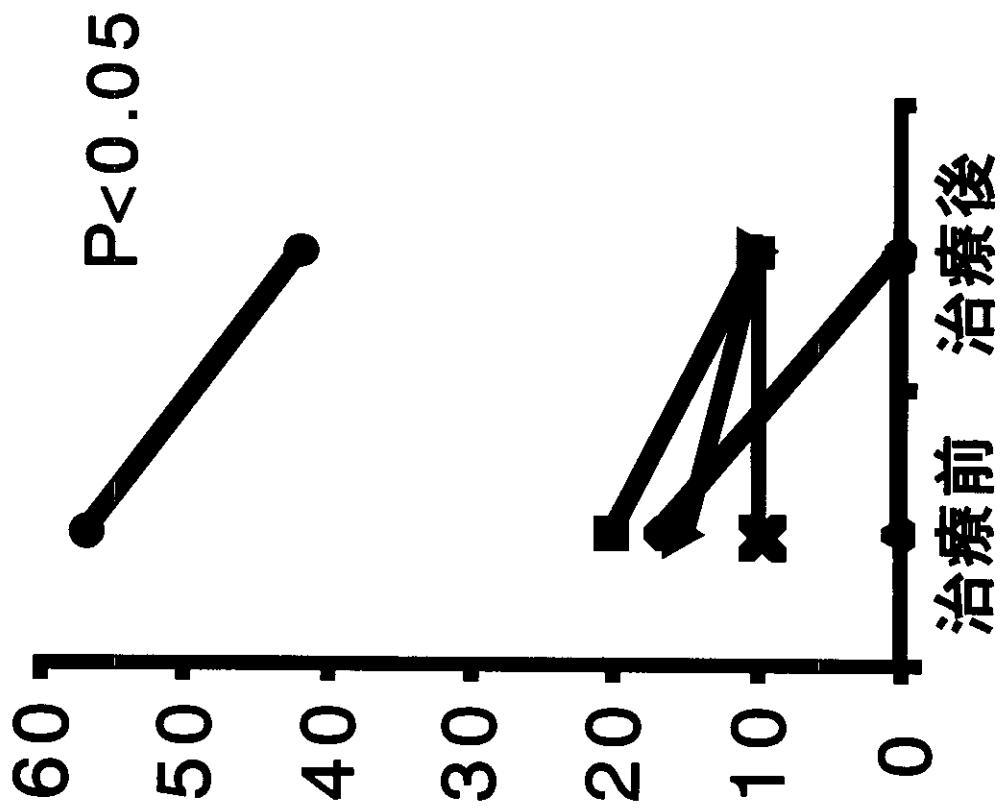


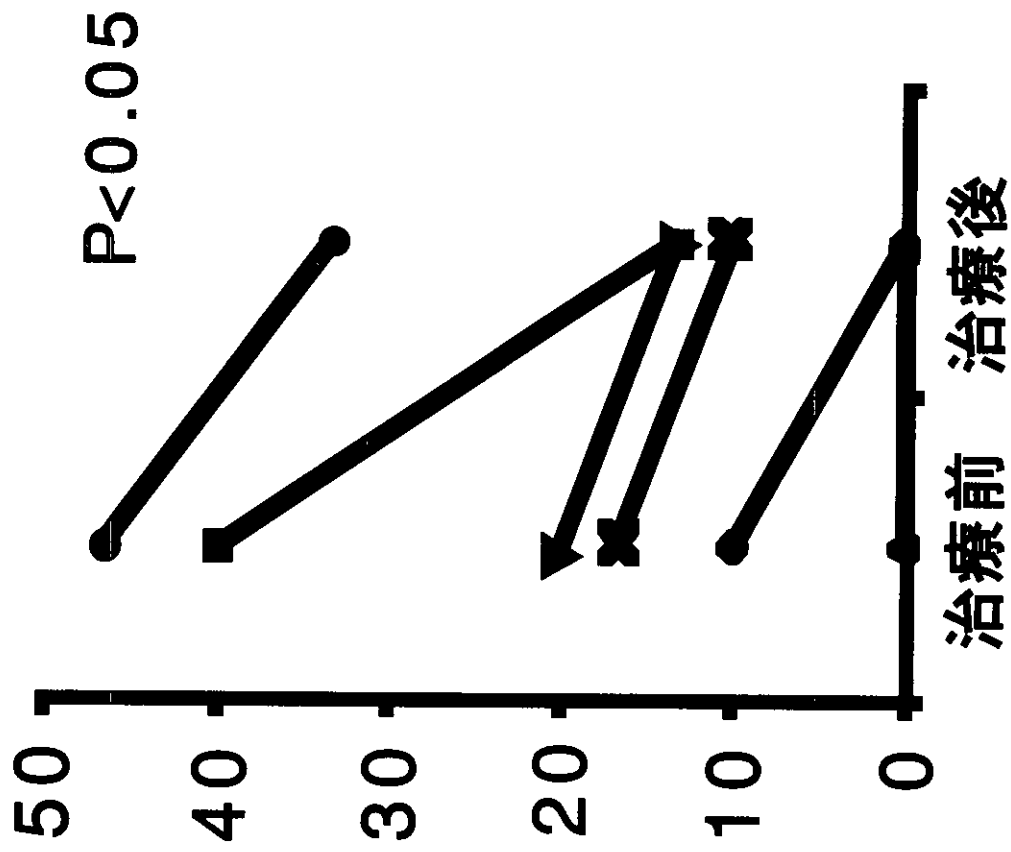
図2 抗IL-6R抗体療法によるHRCT所見の改善



(%) 小葉間隔壁の肥厚



(%) 気管支血管束の肥厚



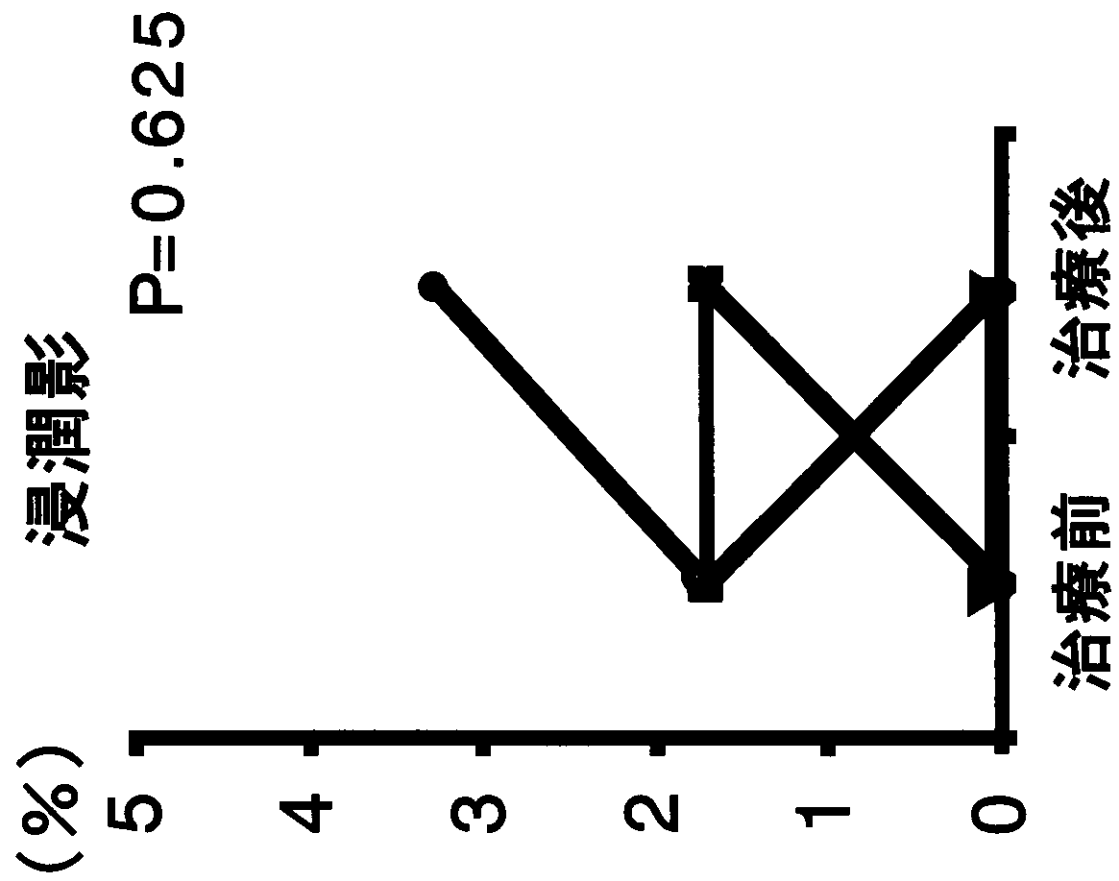
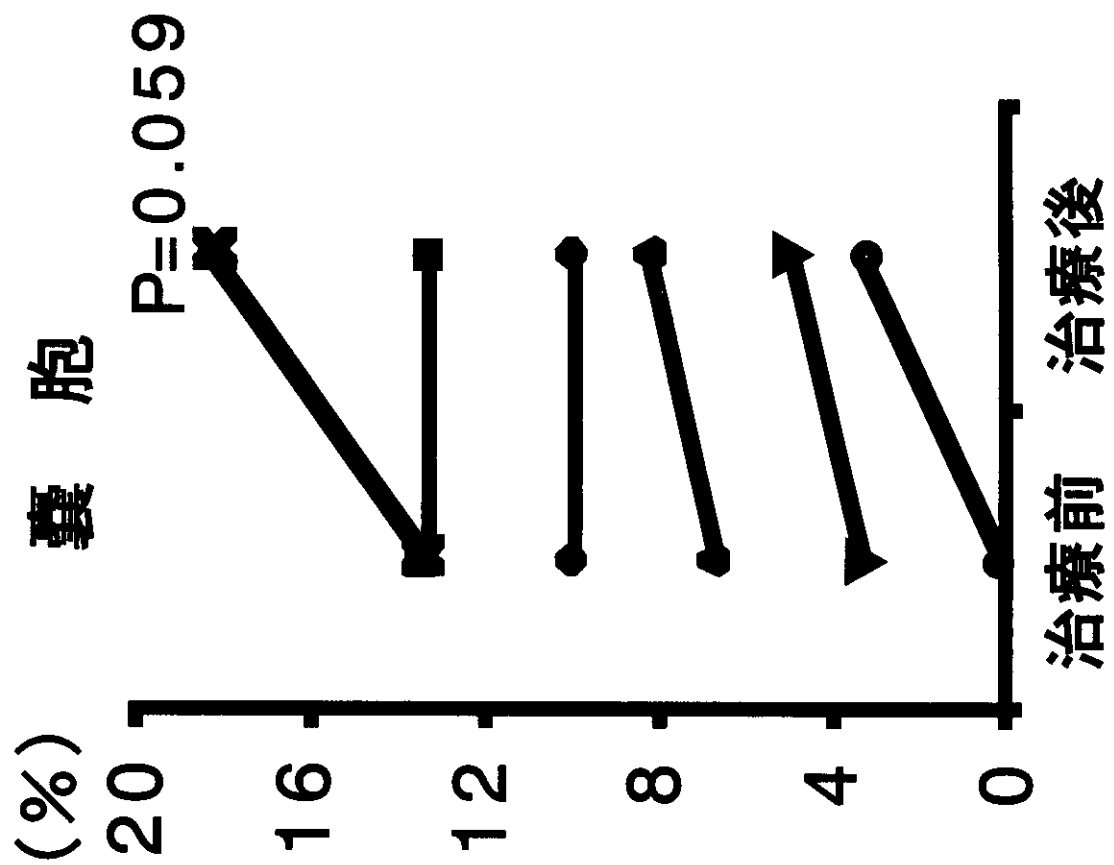


図3 Castlemann病患者者における
MRA治療前後の血清中MMP-2の変化

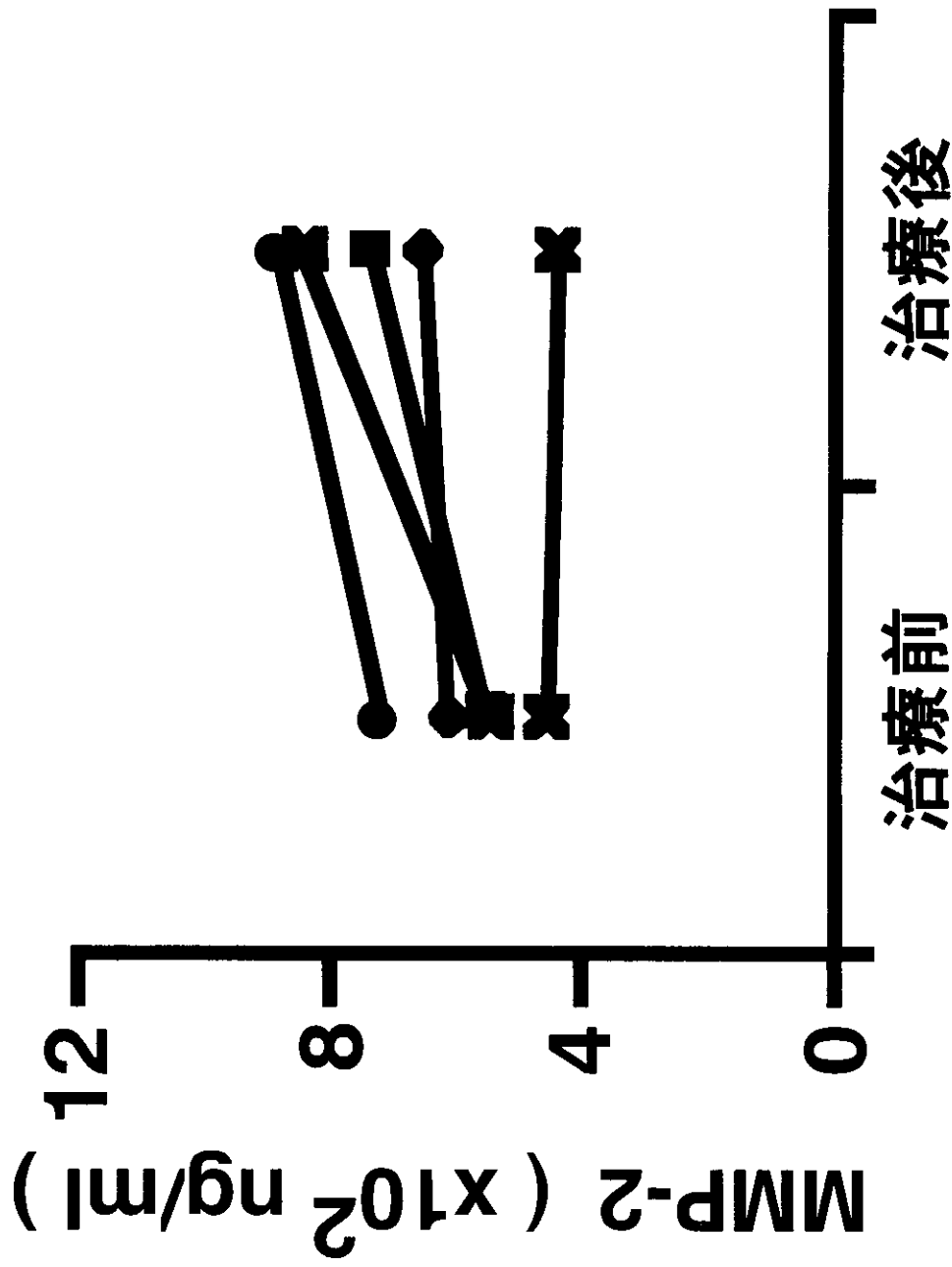


表1 MRA治療によるHRCT所見の変化と病理像

CT像	病変部位	病理像	結果
小葉中心性粒状影 小葉間隔壁の肥厚 気管支血管束の肥厚	広義間質	炎症細胞浸潤 繊維化	↗
スリガラス陰影	肺胞隔壁	炎症細胞浸潤	↗
浸潤影	肺胞・肺胞隔壁	炎症細胞浸潤・肺胞内の浸出液・繊維化など	↑
のう胞	肺胞・肺胞隔壁	肺胞の破壊	↗