

リア膜電位低下： $\Delta\Psi_m$ 、caspase 酵素活性）で評価した。

C. 研究結果

1. 免疫組織学的検討（表 1）

SS 症例口唇小唾液腺組織には TLR2、TLR4、MyD88 が発現し、これら発現はコントロール症例と比較し強く認められた。TLR2、TLR4、MyD88 は浸潤単核球ならびに腺房細胞・導管上皮細胞に発現が検出された。

2. HSG 細胞を用いた検討

HSG 細胞には TLR2 および TLR4 発現が検出され、PGN または LPS 刺激により、培養上清中 IL-6 産生は亢進し、また、細胞表面 CD54 発現は増強した（図 1）。

HSG 細胞のアポトーシスは PGN または LPS 刺激では誘導されなかった。また、HSG 細胞の Fas 発現・Fas 依存性アポトーシス感受性および TRAIL 受容体 (DR4、DR5、DcR1、DcR2)・TRAIL 依存性アポトーシス感受性は各々のリガンド刺激で変化は認められなかった（表 2）。

D. 考察

免疫組織学的検討および HSG 細胞を用いた検討により、1. SS 唾液腺細胞には機能的 TLRs (TLR2 と TLR4) が発現していること。2. TLRs からの刺激はアダプター蛋白 (MyD88) により伝達され、サイトカイン産生や細胞浸潤 (CD54: 副刺激分子、接着分子) を介し、SS 腺組織 (唾液腺) の慢性炎症を増強していることが示唆された。しかしながら今回の検討では、これら細胞の TLRs シグナルによる受容体依存性アポトーシスの修飾は認められなかった。

E. 結論

SS 腺組織の慢性炎症への TLRs シグナルの関与が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tamada Y, Eguchi K (9 番目、他 8 名) . Linp48 Overexpression enhances interferon-mediated expression and activity of double-stranded RNA-dependent protein kinase in human hepatoma cells. *J Hepatol* 37 (4): 493, 2002.
2. Takino H, Eguchi K (8 番目、他 8 名) . Antibodies to GAD in Japanese patients classified as Type 2 diabetes at diagnosis. High titre of GAD Ab is a predictive marker for early insulin treatment-report of west Japan (Kyushu, Yamaguchi, Osaka) study for GAD Ab(+) diabetes. *Diabet Med* 19 (9): 730-734, 2002.
3. Miyazoe S, Eguchi K (Last author、他 9 名). Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 97 (8): 2086-2092, 2002.
4. Ohkubo K, Eguchi K (last author、他 7 名) . Viral load is a significant prognostic factor for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer* 94 (10): 2663-2668, 2002.
5. Yamasaki S, Eguchi K (Last author、他 6 名) . Functional changes in rheumatoid fibroblast-like synovial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated signalling pathway. *Clin Exp Immunol* 129 (2): 379-384, 2002.
6. Sun F, Eguchi K (6 番目、他 5 名) . Apoptosis in normal rat embryo tissues during early organogenesis: the possible involvement of Bax and Bcl-2. *Arch Histol Cytol* 65 (2): 145-157, 2002.
7. Degawa-Yamauchi M, Eguchi K (Last author、他 5 名) . Ethanol inhibits leptin-induced STAT3 activation in Huh7 cells. *FEBS Lett* 525 (1-3): 116-120, 2002.
8. Kawakami A, Eguchi K (Last author、他 9 名) . Modulation of the expression of

- membrane-bound CD54 (mCD54) and soluble form of CD54 (sCD54) in endothelial cells by glucosyl transferase inhibitor: possible role of ceramide for the shedding of mCD54. *Biochem Biophys Res Commun* 296 (1): 26-31, 2002.
9. Nakao K, Eguchi K (9 番目、他 9 名) . Association between nonalcoholic fatty liver, markers of obesity, and serum leptin level in young adults. *Am J Gastroenterol* 97 (7): 1796-1801, 2002.
10. Hamada H, Eguchi K (9 番目、他 8 名) . Impact of aging on the development of hepatocellular carcinoma in patients with posttransfusion chronic hepatitis C. *Cancer* 95 (2): 331-339, 2002.
11. Ide A, Eguchi K (Last author、他 12 名) . Genetic association between interleukin-10 gene promoter region polymorphisms and type 1 diabetes age-at-onset. *Hum Immunol* 63 (8): 690-695, 2002.
12. Kawakami A, Eguchi K. Involvement of apoptotic cell death in autoimmune diseases. *Med Electron Microsc* 35 (1): 1-8, 2002.
13. Ishikawa H, Eguchi K (Last author、9 名) . Amyloid a protein amyloidosis in a patient with plasma cell dyscrasia. *Intern Med* 41 (5): 386-391, 2002.
14. Ichikawa T, Eguchi K (Last author、他 8 名) . Involvement of IL-1 α and IL-10 in IFN- γ -mediated antiviral gene induction in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294 (2): 414-422, 2002.
15. Kawasaki E, Eguchi K (Last author、他 3 名) . Autoantibodies to IA-2 in type 1 diabetes: measurements with a new enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann NY Acad Sci* 958: 241-246, 2002.
16. Kawasaki E, Eguchi K (Last author、他 9 名) . Distinct IA-2 autoantibody epitope recognition between childhood-onset and adult-onset type 1 diabetes. *Ann NY Acad Sci* 958: 235-240, 2002.
17. Eguchi K. Systemic complications in patients with rheumatism and collagen disease and their treatment. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 91 (Suppl:106-110), 2002.
18. Abiru S, Eguchi K (Last author、他 8 名) . Aspirin and NS-398 inhibit hepatocyte growth factor-induced invasiveness of human hepatoma cells. *Hepatology* 35 (5): 1117-1124, 2002.
19. Kambara C, Eguchi K (Last author、他 6 名) . Increased sialyl Lewis(x) antigen-positive cells mediated by HTLV-1 infection in peripheral blood CD4(+) T lymphocytes in patients with HTLV-1-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 125 (1-2): 179-184, 2002.
20. Fujimoto T, Eguchi K (Last author、他 5 名) . Up-regulation of interleukin-12 receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurol Sci* 196 (1-2): 21-26, 2002.
21. Yamasaki S, Eguchi K (Last author、他 7 名) . Effect of filtration leukocytapheresis therapy: modulation of white blood cell enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis. *Artif Organs* 26 (4): 378-384, 2002.
22. Yokoyama N, Eguchi K (Last author、他 3 名) . Role of magnetic resonance imaging in the assessment of disease activity in thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid* 12 (3): 223-227, 2002.
23. Abiru S, Eguchi K (Last author、他 4 名) . Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma associated with elevated levels of interleukin 18. *Am J Gastroenterol* 97 (3): 774-775, 2002.
24. Ueki Y, Eguchi K (Last author、他 9 名) . NOR-1: a nitric oxide releasing agent for calibrating low levels of nitric oxide by the chemiluminescence method. *Blood Coagul Fibrinolysis* 13 (2): 75-80, 2002.
25. Migita K, Eguchi K (Last author、他 7 名) . The role of peroxynitrite in

- cyclooxygenase-2 expression of rheumatoid synovium. Clin Exp Rheumatol 20 (1): 59-62, 2002.
26. Arima T, Eguchi K (Last author, 他 6 名) Transactivation of human α -fetoprotein gene by X-gene product of hepatitis B virus in human hepatoma cells. Int J Mol Med 9 (4): 397-400, 2002.
27. Nagayama Y, Eguchi K (7 番目, 他 6 名), Niwa M. A novel murine model of Graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor. J Immunol 168 (6): 2789-2794, 2002.
28. Kajiya Y, Eguchi K (Last author, 他 9 名) . Full-length sequence and functional analysis of hepatitis B virus genome in a virus carrier: a case report suggesting the impact of pre-S and core promoter mutations on the progression of the disease. J Viral Hepat 9 (2): 149-156, 2002.
29. Kamachi M, Eguchi K (Last author, 他 11 名) . Regulation of apoptotic cell death by cytokines in a human salivary gland cell line: distinct and synergistic mechanisms in apoptosis induced by tumor necrosis factor α and interferon γ . J Lab Clin Med 139 (1): 13-19, 2002.
30. Eguchi K. Systemic lupus erythematosus complicated by cytomegalovirus-induced hemophagocytic syndrome and colitis. Intern Med 41 (2): 77-78, 2002.
31. Yonetsu K, Eguchi K (Last author, 他 3 名) . Sonography as a replacement for sialography for the diagnosis of salivary glands affected by Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 61 (3): 276-277, 2002.
32. 川上 純, 江口勝美 (Last author, 他 4 名). アポトーシス誘導療法. 内科 89: 309-312, 2002.
33. 川上 純, 江口勝美 (Last author) . カスパーゼカスケード. 炎症と免疫 10: 106-107, 2002.
34. 宮下賜一郎, 江口勝美 (Last author, 他 2 名). OPG/OPG リガンド. 臨床免疫 37: 191-196, 2002.
35. 川上 純, 江口勝美 (Last author, 他 13 名). 治療抵抗性関節リウマチに対するシクロスポリンとタクロリムスの有効性. 臨床リウマチ 14: 219-223, 2002.
36. 江口勝美. 慢性関節リウマチの治療. 内科 89, 261-268, 2002.
37. 江口勝美. HTLV-I 感染とリウマチ性疾患. リウマチ科 27: 238-246, 2002.
38. 江口勝美. アポトーシス抑制因子. リウマチ科 28: 184-195, 2002.
39. 江口勝美. Fas と疾患. 日内会誌 91: 59-63, 2002.
40. 江口勝美. 甲状腺疾患. 最新医学 57: 2524-2532, 2002.

2. 学会発表

- 右田清志, 江口勝美 (Last, 他 1 名) : 二次性アミロイドーシスの早期診断と治療. 第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p228, 2002.
- 山崎聡士, 江口勝美 (Last, 他 2 名): 滑膜線維芽細胞における NF- κ B の制御. 第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p303, 2002.
- 川上 純, 江口勝美 (Last, 他 7 名): HTLV-I Tax Tax による抗アポトーシス作用の検討. 第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p305, 2002.
- 川上 純, 江口勝美 (Last, 他 7 名): サイトカインによる唾液腺細胞アポトーシスの制御. 第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p321, 2002.
- 田中史子, 江口勝美 (Last, 他 7 名): IL-18 による血清アミロイド A 蛋白(SAA)の誘導. 第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p323, 2002.
- 右田清志, 江口勝美 (Last, 他 5 名): 免疫抑制剤のミトコンドリアに対する作用— シクロスポリン・タクロリムスの対比—. 第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p360, 2002.○○○
- 折口智樹, 江口勝美 (Last, 他 7 名): Sjögren 症候群の発症における IL-10 遺伝子多型の関与. 第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p396, 2002.

8. 山崎聡士、江口勝美 (Last、他 5 名): PPAR α による滑膜細胞の制御。第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p424、2002.
9. 宮下賜一郎、江口勝美 (Last、他 7 名): 滑膜細胞の TRAIL 誘導性アポトーシスの検討。第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p450、2002.
10. 井田弘明、江口勝美 (Last、他 4 名): Granzyme B leakage induced NK cell death。第 46 回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 p451、2002.
11. 井田弘明、江口勝美 (Last、他 8 名): Granzyme B leakage induced cell death (GLCD):新しいタイプの activation induced cell death (AICD)。第 32 回日本免疫学会総会・学術集会記録 p81、2002.
12. 川上 純、江口勝美 (Last、他 7 名): PDGF による滑膜細胞 TRAIL 誘導性アポトーシスの抑制。第 32 回日本免疫学会総会・学術集会記録 p294、2002.
13. Kawakami A, Eguchi K. (Last、他 9 名): Examination of anti-apoptogenic property of salivary infiltrating T cell: Possible association with HTLV-I infection. Arthritis Rheum 46 (Supple), S362、2002.
14. Kawakami A, Eguchi K. (Last、他 10 名): Immunohistochemical detection of apoptosis-related molecules of the labial salivary glands in patients with Sjögren's syndrome. The VIII th International Symposium on Sjögren's syndrome. p8, 2002.
15. Origuchi T, Eguchi K. (Last、他 3 名): Association between interleukin-10 gene promoter region polymorphisms and Sjögren's syndrome. The VIII th International Symposium on Sjögren's syndrome. p29, 2002.

3.その他
なし。

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

表1. SS口唇小唾液腺組織のTLR2、TLR4、MyD88発現の検討

	SS patients (n=9)		Control subjects (n=3)	
	Acini and Ducts	MNCs	Acini and Ducts	
TLR2	++	++		± ~ +
TLR4	++	++		± ~ +
MyD88	++	++		

— : negative

± : positive less than 10%

+ : 10 - 50% positive

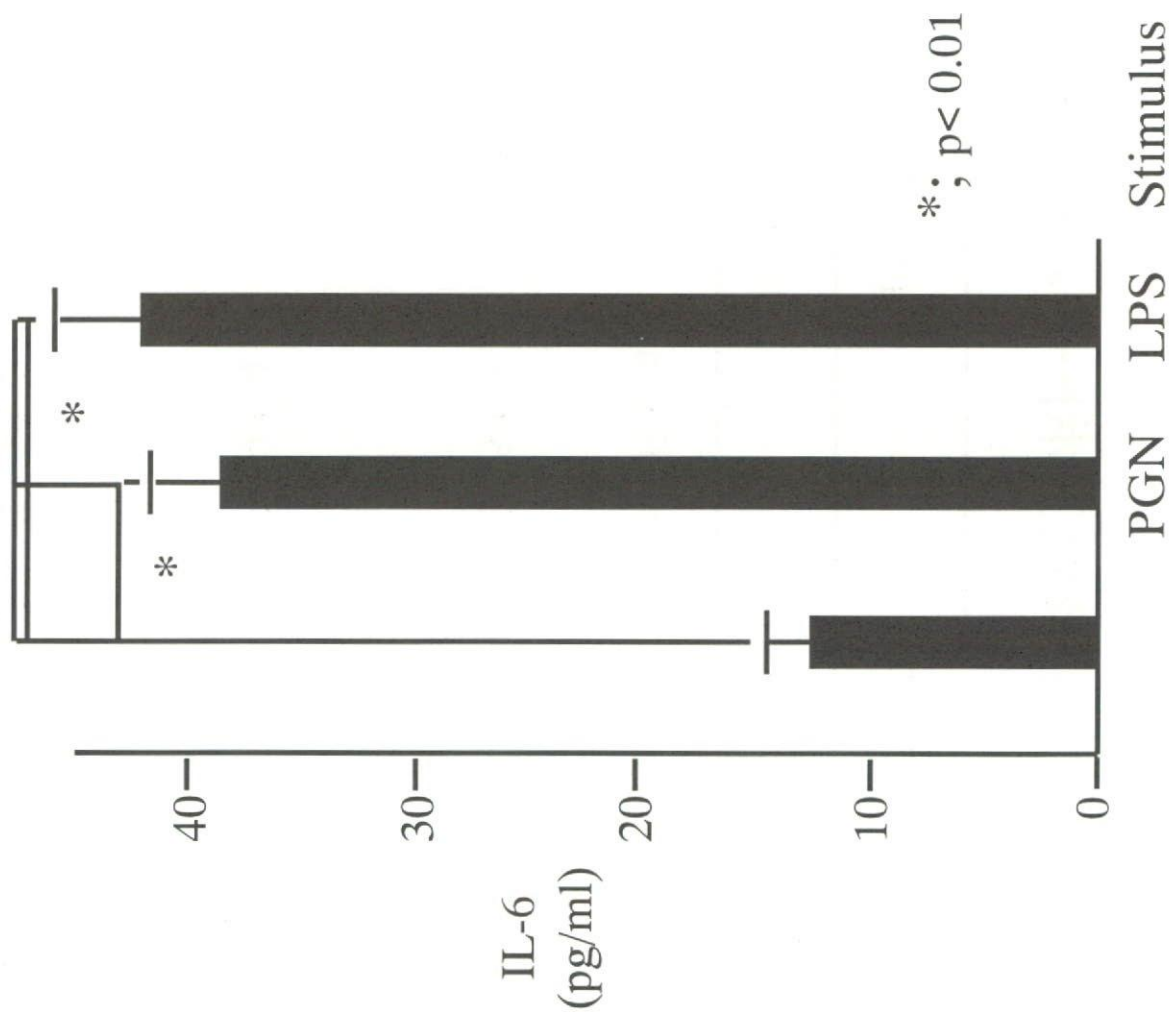
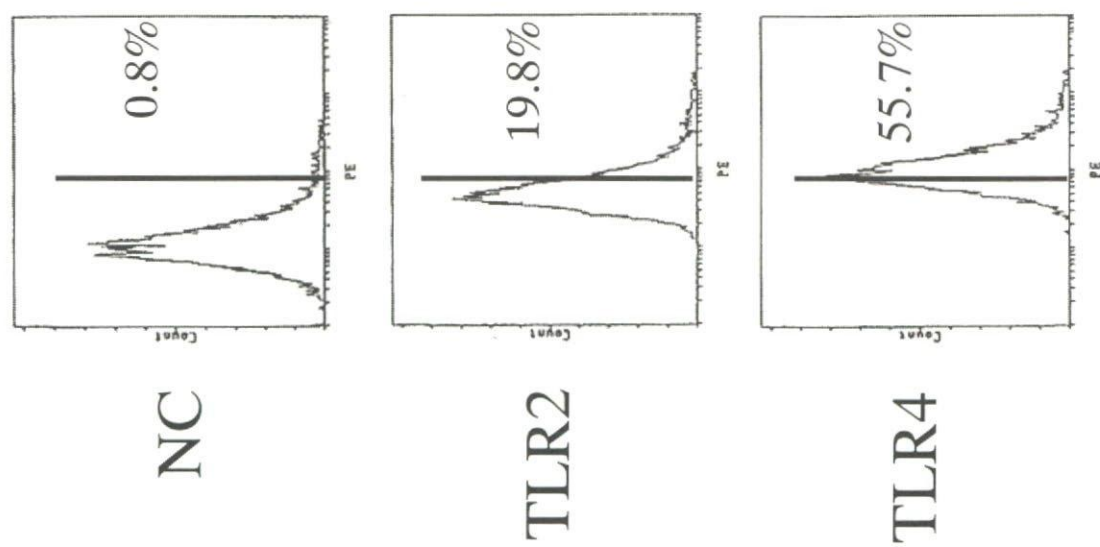
++ : positive more than 50%

表2. HSG細胞のFas依存性およびTRAIL依存性アポトーシスの検討

Expression of death receptor		$\Delta\psi_m$ (%)			
Stimulus	Fas	DR4	DR5	Stimulus	
	(MFI of positive cells)	(% of positive cells)	(% of positive cells)	anti-Fas mAb	rTRAIL
PGN	10.6 ± 0.6	10.4 ± 0.8	37.2 ± 2.1	34.5 ± 3.8	37.7 ± 3.7
	11.2 ± 0.7	11.5 ± 0.9	35.6 ± 1.9	36.9 ± 4.1	39.5 ± 3.9
LPS	11.4 ± 0.7	11.2 ± 0.7	36.4 ± 1.8	32.3 ± 2.9	36.2 ± 4.0

N.S. N.S. N.S. N.S. N.S. N.S.

図1. HSG細胞の機能的TLRs発現の検討



抗リン脂質抗体症候群の診断法：酸化 LDL・ β 2-グリコプロテイン I 複合体 (自己抗原) とそれらの免疫複合体の測定意義

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)
小池隆夫(北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻分子病態制御学・第二内科)

研究要旨

平成 11-13 年度の厚生省特定疾患対策事業「自己免疫疾患の病因・病態解析と新たな治療法の開発」および昨年度より新たにスタートした特定疾患対策事業「自己免疫疾患に関する調査研究」で、酸化 LDL 由来の β 2-GPI に特異的なリガンドが、複数のコレステリルリノレートの酸化体(酸化により短鎖化した脂肪酸の ω 位にカルボキシル基を有する 7-ケトコレステロールのエステル)であることを見いだした。これらのリガンドは、 β 2-GPI および抗 β 2-GPI 自己抗体の標的になっていることが *in vitro* の実験結果より明らかであり、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。本年度の研究事業では、酸化 LDL- β 2-GPI 間での複合体形成の機序についてさらに検討した結果、 β 2-GPI と酸化 LDL が静電的な相互作用で結合した後、Schiff base adduct などによる安定な共有結合が現れることが明らかとなった。患者血中には、この種の安定型 β 2-GPI・酸化 LDL 複合体が存在する。さらに、酸化 LDL・ β 2-GPI 複合体に対する自己抗体の測定法および血中酸化 LDL の測定法を確立し APS における臨床意義について解析を行った。その結果は、APS の臨床症状(動・静脈血栓など)と、血中酸化 LDL および酸化 LDL・ β 2-GPI 複合体に対する自己抗体、もしくは、それらの免疫複合体の出現との間に有意な関連があることを示している。また、ごく最近、急性炎症期に血中に出現するタンパク質(C 反応性タンパク質、CRP)が、 β 2-GPI と同様に酸化 LDL と複合体を形成することが明らかとなり、CRP・ β 2-GPI 複合体の測定法を確立した。

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。さらに、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。昨年度は、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。

自己抗体に起因する易血栓性が基本病態である APS において、血栓症(特に、動脈血栓症)の原因は、抗 β 2-GPI 抗体による過凝固現象のみでは説明しづらく、動脈硬化の進展による機序の関与を提唱し臨床解析を行ってきた。今年度までの我々の検討結果より、遊離の自己抗体より、むしろ、酸化 LDL・ β 2-GPI 複合体との免疫複合体が血栓形成に関与している可能性が示されてきた。この様なことより、自己抗体のみならず、自己抗原(酸化 LDL・ β 2-GPI 複合体)やそれらからなる免疫複合体の測定意義を明確にすることや、基礎医学的にはマクロファージによる抗原提示における自己抗体、酸化 LDL・ β 2-GPI 自己抗原複合体、およびそれらの免疫複合体

関与の機序解明を通じて本疾患の発症機序を明らかにすることが治療法の確立につながることを確信している。

B. 研究方法

1. β 2-GPI および LDL の調製

β 2-GPI は、健常人プール血漿より、ヘパリンセファロースカラムおよび DEAE-セルロースカラムを用いて調製した。新鮮健常人血漿より超遠心分離法で LDL ($d=1.019.1.063$ g/ml) を調製した。5 μ M 硫酸銅とインキュベートすることで適宜 LDL を酸化した。

2. β 2-GPI リガンド (oxLig-1) の合成

7-ketocholesterol、azelaic acid、および brassylic acid を用い、縮合反応により、oxLig-1 (7-ketocholesterol-9-carboxynonanoate; 9-oxo-(7-ketocholesterol-5-en-3 β -yloxy)nonanoic acid (IUPAC)) を化学合成した。

3. 酸化 LDL $\cdot\beta$ 2-GPI 複合体の測定

APS の自然発症モデルである NZW x BXSB F1 マウスより樹立したモノクローナル抗 β 2-GPI 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抗 apoB 抗体を用いる ELISA にて 酸化 LDL $\cdot\beta$ 2-GPI 複合体 (いわゆる抗カルジオリピン抗体の対応抗原) の濃度を測定した。

4. 抗酸化 LDL (oxLig-1) $\cdot\beta$ 2-GPI 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 抗体については、これまでに我々が報告してきた一般的な ELISA 法で測定した。

5. 抗原特異的免疫複合体の測定

ポリスチレンプレートに抗 apoB 抗体もしくは抗 β 2-GPI 抗体 (Cof-23 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 $\cdot\beta$ 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。

6. 酸化 LDL \cdot CRP 複合体の測定

抗 XPII 抗体を固相化したポリスチレンプレートおよび標識抗 apoB 抗体を用いる ELISA にて 酸化 LDL \cdot XPII 複合体 (いわゆる抗カルジオリピン抗体の対応抗原) の濃度を測定した。

C. 研究結果

1. β 2-GPI と酸化 LDL の結合機序

β 2-GPI リガンド (oxLig-1) 含有リポソームあるいは硫酸銅処理 (37°C, 12 時間) によって得られた酸化 LDL と β 2-GPI は、インキュベーション直後より、有意に結合性を示すが、この結合は、Ca²⁺ イオン、Mg²⁺ イオン、ヘパリンなどにより阻害されるイオン結合であった。継続して 37°C でインキュベートすると、イオン結合から次第に共有結合性の複合体に変化した。37°C、16 時間のインキュベーションによって得られた酸化 LDL $\cdot\beta$ 2-GPI 複合体は、pH10 で Mg²⁺ の存在下でのみ乖離するが、中性および酸性下では極めて安定でこの種の複合体は、Shiff base adduct を形成している可能性が高い。

酸化 LDL $\cdot\beta$ 2-GPI 複合体陽性血清についても同様の検討をしたところ、試験管内での 16 時間のインキュベーションの後に認められるような共有結合性の安定した複合体として存在することが明らかになった。

この種の複合体に関してもう1つ特記すべき点は、酸化 LDL の性質として従来考えられていた陰性荷電が複合体の形成によって消失しており、もはや、スカベンジャー受容体によって認識されないことである。

2. 酸化 LDL $\cdot\beta$ 2-GPI 複合体、抗酸化 LDL $\cdot\beta$ 2-GPI 複合体抗体、および、それらからなる免疫複合体の臨床意義

酸化 LDL $\cdot\beta$ 2-GPI 複合体は、健常人血清中の複合体濃度の平均+3SD を Cut off 値とした場合、原発性 APS で 58.7%、SLE 合併 APS (二次性 APS) で 54.1%、SLE (血栓症なし) で 56.8% が陽性であり、APS に特徴的な臨床症状である動・静脈血栓症とは関連が認められなかった。SLE の他に、酸化ストレスが発症に関連していると考えられている糖尿病や慢性腎炎でも一定の頻度で陽性が認められた。

抗酸化 LDL $\cdot\beta$ 2-GPI 複合体抗体は、 β 2-GPI 依存的抗カルジオリピン抗体や抗 β 2-GPI 抗体と概ね良好な相関を示し、動・静脈血栓の既往と

関連が認められた。さらに、今回の臨床検討では、酸化 LDL・ β 2-GPI 複合体(自己抗原)および抗酸化 LDL・ β 2-GPI 複合体抗体(自己抗体)の両者の存在が特に動脈血栓の発症と関連している可能性が示された。現在、この現象については、多施設で検証されている。

さらに、本研究で、酸化 LDL・ β 2-GPI 複合体が IgG 免疫複合体として APS 患者血中に検出された。

3.酸化 LDL・CRP 複合体の測定法の確立

最近、酸化 LDL と CRP が Ca^{2+} 依存的に複合体を形成することが明らかとなった(酸化 LDL・ β 2-GPI 間のイオン結合は Ca^{2+} 依存的である)。この複合体形成の機序をもとに、酸化 LDL・CRP 複合体測定法を確立した。平成15年度以降に詳細な臨床検討を行う予定である。

D. 考察

血中に現れる共有結合性の酸化 LDL・ β 2-GPI 複合体は、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。さらに、APS 患者血中に、この種の酸化 LDL・ β 2-GPI 複合体が IgG 免疫複合体として循環しており、APS がいわゆる抗カルジオリピン抗体の免疫複合体病であると考えられる。

E. 結論

免疫複合体の測定意義についても詳細な検討を行い、よりの確に APS の診断を下すには、自己抗原、自己抗体、および、それらの免疫複合体の中、どれを対象とした測定法を施行すべきか体系的な解析が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. 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. Kobayashi, K., Kishi, M., Atsumi, T., Bertolaccini, M.L., Makino, H., Sakairi, N., Yamamoto, I., Yasuda, T., Khamashta, M.A., Hughes, G.R.V., Koike, T., Voelker, D.R., Matsuura, E. Circulating oxidized low density lipoprotein forms complexes with β 2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. J. Lipid Res. (Jan 16 [epub ahead of print] (in press)
3. Matalon, T.S., Blank, M., Matsuura, E., Inagaki, J., Nomizu, M., Koike, T., Ornoy, A., Shoenfeld Y. Immunization of naïve mice with mouse laminin-1 affected pregnancy outcome in a mouse model. Am. J. Reprod. Immunol. (in press)
4. Inagaki, J., Sugiura-Ogasawara, M., Nomizu, M., Nakatsuka, M., Ikuta, K., Suzuki, N., Kaihara, K., Kobayashi, K., Yasuda, T., Shoenfeld, Y., Aoki, K., Matsuura, E. An association of IgG anti-laminin-1 autoantibodies with endometriosis in infertile patients. Human Reprod. (in press)
5. Matsuura, E., Kobayashi, K., Koike, T., Shoenfeld, Y., Khamashta, M.A., Hughes, G.R.V. Oxidized LDL as a risk factor of thrombosis in antiphospholipid syndrome. Lupus (in press)
6. Matsuura, E., Kobayashi, K., Takao Koike, T., Shoenfeld, Y., Khamashta, M.A., Hughes, G.R.V. Atherogenic autoantigen: Oxidized LDL complexes with β 2-glycoprotein I. Immunobiol. 207: 17-22, 2003.
7. Matsuura, E., Kobayashi, K., Koike, T., Shoenfeld, Y. Autoantibody-mediated atherosclerosis. Autoimmun. Rev. 1: 348-353, 2002.
8. Liu, Q., Kobayashi, K., Furukawa, J., Inagaki, J., Sakairi, N., Iwado, A., Yasuda, T., Koike, T., Voelker, D.R., Matsuura, E. ω -Carboxyl variants of 7-ketocholesteryl esters are ligands for β 2-glycoprotein I and mediate antibody-dependent uptake of oxidized LDL by macrophages. J. Lipid Res. 43: 1486-1495, 2002.

9. Ambrozic, A., Avicin, T., Ichikawa, K., Kveder, T., Matsuura, E., Hojnik, M., Atsumi, T., Rozman, B., Koike T. Anti- β 2-glycoprotein I antibodies in children with atopic dermatitis. *Int. Immunol.* 14: 823-830, 2002.
 10. Iverson, G.M., Matsuura, E., Victoria, E.J., Cockerill, K.A., Linnik, M.D. The orientation of β 2GPI on the plate is important for the binding of anti- β 2GPI autoantibodies by ELISA. *J. Autoimmun.* 18: 289-297, 2002.
 11. 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.* 21: 51-66, 2002.
 12. 稲垣純子、青木耕治、松浦栄次. 子宮内膜症と抗ラミニン-1 抗体. *臨床免疫*(印刷中)
 13. 松浦栄次、小林和子. 酸化 LDL 研究の現状. *アニムス*、東広社(印刷中)
 14. 小林和子、近藤朱音、松浦栄次. 脂質の酸化と生理活性. *血小板と生理活性脂質*、尾崎由基男、池田康夫、島田和幸、高井義美、丸山征朗編、金芳堂、pp147-160、2002.
 15. 松浦栄次. 抗リン脂質抗体症候群. *岡山医学会雑誌* 114: 19-26, 2002.
- 2. 学会発表**
1. 稲垣純子、松浦栄次、中塚幹也、野水基義、杉浦真弓、小林和子、保田立二、青木耕治、Yehuda Shoenfeld. IgG 抗ラミニン-1 自己抗体の関与する周産期異常と不妊症(第2報)岡山免疫懇話会(岡山、2002年2月20日)
 2. Matsuura, E., Liu, Q., Kobayashi, K., Voelker, D.R., Koike, T. A ligand for β 2-glycoprotein I: ω -carboxyl variants of cholesteryl ester. 3rd International Congress on Autoimmunity (Geneva, Switzerland, February 20-24, 2002)
 3. Matsuura, E., Inagaki, J., Tarakover-Matalon, S., Blank, M., Aoki, K., Koike, T., Shoenfeld, Y. An association of IgG laminin-1 autoantibodies with reproductive failure. 3rd International Congress on Autoimmunity (Geneva, Switzerland, February 20-24, 2002)
 4. Iverson, M., Matsuura, E., Victoria, E., Cockerill, M., Linnik, M. Use of mutations in domain 1 and domain 4 of β 2GPI to determine fine antigenic specificity of antiphospholipid antibodies. 3rd International Congress on Autoimmunity (Geneva, Switzerland, February 20-24, 2002)
 5. 小林和子、松浦栄次、劉慶平、笠原順子、稲垣純子、保田立二、小池隆夫. \square 2-グリコプロテイン I に対する自己抗体の動脈血栓症への関与第46回日本リウマチ学会総会・学術集会(神戸、2002年4月22-24日)
 6. 渥美達也、家子正裕、保田晋助、松浦栄次、天崎吉晴、市川健司、小池隆夫. ニック \square 2-グリコプロテイン I の機能と意義. 第46回日本リウマチ学会総会・学術集会(神戸、2002年4月22~24日)
 7. 市川健司、松浦栄次、渥美達也、天崎吉晴、浄土智、小池隆夫. ヒト CAL を持つキメラ抗カルジオリピン抗体を用いた IgA 抗カルジオリピン抗体と抗 \square 2-グリコプロテイン I 抗体の測定. 第46回日本リウマチ学会総会・学術集会(神戸、2002年4月22~24日)
 8. Matsuura, E. Carboxyl variants of cholesteryl-linoleate as a ligand for β 2-GPI and a possible mechanism on autoantibody mediated atherosclerosis. 1st Tutzing Antiphospholipid Conference (Tutzing, Germany, April 22-25, 2002)
 9. Kobayashi, K., Kishi, M., Lopez, D., Liu, Q., Yasuda, T., Koike, T., Lopez, L., Matsuura, E. A novel ELISA for oxidized LDL, utilizing an interaction among oxidized LDL, β 2-glycoprotein I, and β 2-glycoprotein I autoantibody. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Taormina, Sicily, Italy, September 29-October 3, 2002)
 10. Lopez, D., Garcia-Valladares, I., Dier, K., Fink, C., Kobayashi, K., Matsuura, E., Lopez, L. Determination and significance of

- Autoantibodies to oxLig-1/ β 2GPI complex in patients with APS. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Taormina, Sicily, Italy, September 29-October 3, 2002)
11. Matsuura, E. Oxidized LDL as a risk of thrombosis in APS. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Taormina, Sicily, Italy, September 29-October 3, 2002)
 12. Lopez, D., Dier, K., Fink, C., Kobayashi, K., Matsuura, E., Lopez, L. Increased levels of oxidized-LDL in SLE: detection by ELISA using an anti- β 2GPI monoclonal antibody. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Taormina, Sicily, Italy, September 29-October 3, 2002)
 13. Kasahara, J., Kobayashi, K., Yamasaki, Y., Yasuda, T., Koike, T., Makino, H., Matsuura, E. Clinical significance of serum oxidized LDL in patients with chronic renal disease. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Taormina, Sicily, Italy, September 29-October 3, 2002)
 14. Kobayashi, K., Liu, Q., Yasuda, T., Voelker, D.R., Koike, T., Matsuura, E. ω -carboxyl variants of 7-ketocholesteryl esters are ligands for β 2-GPI. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Taormina, Sicily, Italy, September 29-October 3, 2002)
 15. Iverson, G.M., Matsuura, E., Victoria, E.J., Cockerill, K.A., Linnik, M.D. The orientation of β 2GPI on the plate is important for the binding of α - β 2GPI Autoantibodies by ELISA. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Taormina, Sicily, Italy, September 29-October 3, 2002)
 16. Inagaki, J., Aoki, K., Koike, T., Shoenfeld, Y., Matsuura, E. Clinical association of IgG anti-laminin-1 autoantibodies with reproductive failure. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Taormina, Sicily, Italy, September 29-October 3, 2002)
 17. Kondo, A., Tartakover-Matalon, S., Blank, M., Inagaki, J., Kobayashi, K., Yasuda, T., Aoki, K., Koike, T., Makino, T., Shoenfeld, Y., Matsuura, E. Pregnancy outcome: Association with anti-laminin-1 antibodies in human and in immunized mice. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Taormina, Sicily, Italy, September 29-October 3, 2002)
 18. Matalon, S.T., Blank, M., Matsuura, E., Inagaki, J., Nomizu, M., Koike, T., Sherer, Y., Ornoy, A., Shoenfeld, Y. Induction of reproductive failure by active immunization with laminin-1. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Taormina, Sicily, Italy, September 29-October 3, 2002)
 19. 青木耕治、稲垣純子、飯沼由朗、尾崎康彦、杉浦真弓、鈴木 薫、鈴木由佳、片野衣江、高木 孝、松浦栄次. 極初期反復流産とIgG抗ラミニン-1自己抗体の関係. 第17回日本生殖免疫学会学術集会(大阪、2002年11月29、30日)
 20. 近藤朱音、稲垣純子、野水基義、中塚幹也、保田立二、Yehuda Shoenfeld、牧野恒久、松浦栄次. マウスモデルを用いた妊娠における抗ラミニン-1自己抗体の意義に関する検討. 第17回日本生殖免疫学会学術集会(大阪、2002年11月29、30日)
 21. 小林和子、貴志 周、稲垣純子、山本 格、保田立二、小池隆夫、松浦栄次. 血中酸化LDL- β 2-グリコプロテインI複合体の測定法の確立とその検出. 第32回日本免疫学会総会・学術集会(東京、2002年12月4.6日)
 22. 松浦栄次、小林和子、貴志 周、渥美達也、稲垣純子、山本 格、保田立二、小池隆夫. 抗リン脂質抗体症候群における血栓形成機序: 酸化LDL- β 2-グリコプロテインI複合体の自己抗原としての意義. 第32回日本免疫学会総会・学術集会(東京、2002年12月4~6日)
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
特になし

抗リン脂質抗体産生を誘導する β_2 -グリコプロテイン I 分子修飾に関する研究

桑名 正隆(慶應義塾大学医学部・先端医科学研究所)

研究要旨

抗リン脂質抗体症候群(APS)における抗 β_2 GPI 抗体産生は正常の T 細胞レパトワに存在する β_2 GPI 反応性 CD4⁺T 細胞の活性化による。 β_2 GPI 反応性 T 細胞は DRB4*0103 拘束性にリン脂質結合ドメインを含むエピトープ(p276-290)を認識する。ただし、p276-290 は抗原提示細胞(APC)における native な β_2 GPI からのプロセッシングでは作られないことから、何らかの要因による APC での p276-290 の提示が β_2 GPI 反応性 T 細胞の活性化を介して抗リン脂質抗体産生を誘導している可能性がある。本年度は APS 患者由来の β_2 GPI 反応性 CD4⁺T 細胞クローン株を用いて APC における p276-290 の発現機構を追究した。まず、各種 APC を用いて p276-290 反応性 T 細胞株の活性化能を調べたが、いずれの APC も native β_2 GPI 存在下で T 細胞増殖を誘導できなかった。次に、各種 β_2 GPI 抗原を用いて p276-290 反応性 T 細胞株の活性化能を検討すると、T 細胞増殖は native および nicked β_2 GPI により誘導されず、reduced β_2 GPI と大腸菌で発現させた β_2 GPI 融合蛋白により誘導された。さらに、native β_2 GPI とフォスファチジルセリン・リポソームの複合体を取り込ませた樹状細胞は p276-290 反応性 T 細胞株の増殖を誘導した。以上の成績から β_2 GPI のリン脂質結合ドメインがリン脂質などとの結合により覆われると APC における p276-290 の発現が誘導されることが示され、APS 発症のメカニズム解明に有用な知見と考えられた。

A.研究目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)は動静脈血栓症、習慣性流産をきたす自己免疫疾患で、血清中には様々なリン脂質結合蛋白に対する自己抗体が検出される。抗リン脂質抗体の対応抗原として最も頻度が高いのは β_2 -グリコプロテイン I(β_2 GPI)で、動物モデルでは抗 β_2 GPI 抗体の血栓症を誘導する“病原性”が示されている。我々はこれまで β_2 GPI を認識する CD4⁺T 細胞について検討し、APS 患者における抗 β_2 GPI 抗体産生は正常の T 細胞レパトワに存在する β_2 GPI 反応性 CD4⁺T 細胞の活性化によることを見出した。APS 患者由来の β_2 GPI 反応性 CD4⁺T 細胞クローン株の解析から、 β_2 GPI 反応性 T 細胞の多くは DRB4*0103 に拘束されたリン脂質結合ドメインを含むエピトープ(p276-290)を認識する。ただし、このエピトープペプチドは抗原提示細胞(APC)における native な β_2 GPI 分子からの

プロセッシングでは作られず、その発現には β_2 GPI の人為的な分子修飾が必要であった。このことから、APS 患者では APC により p276-290 が提示され、 β_2 GPI 反応性 T 細胞の活性化を介して抗 β_2 GPI 抗体産生を誘導している可能性が考えられる。そこで、本年度は APS 患者由来の p276-290 反応性 CD4⁺T 細胞クローン株を用いて APC による p276-290 の発現機構を追究した。

B.研究方法

1. 対象

APSの診断基準(Sapporo criteria)を満たす患者のうち、p276-290に対するCD4⁺T細胞クローン株の樹立に成功した3例を対象とした。

2. β_2 GPI反応性T細胞クローン株の樹立

β_2 GPIとマルトース結合蛋白(MBP)とのリコンビ

ナント融合蛋白(GP-F)で患者末梢血T細胞を繰り返し刺激し、限界希釈法により β_2 GPI反応性T細胞クローン株を樹立した。APCとしてEBウイルスでトランスフォームした自己B細胞株(EBV-LBL)を用いた。得られたT細胞クローン株の中からp276-290を認識する株を選んだ。

3. β_2 GPI 反応性T細胞株に認識されるエピトープ発現機構の解析

β_2 GPI反応性T細胞株の反応性は可溶抗原をパルスしたDR53⁺APCを用いた3日間の培養後の細胞増殖試験により評価した。抗原としてヒトnative β_2 GPI, nicked β_2 GPI, DTTで還元後にrefoldさせたreduced β_2 GPI, GP-F(β_2 GPI全長とMBPの融合蛋白), GP3(β_2 GPIのドメインIV/VとMBPの融合蛋白), GP-F/MBP(-)(GP-FからMBPを取り除いた蛋白), GP3/MBP(-)(GP3からMBPを取り除いた蛋白), 昆虫細胞で発現させたリコンビナントのドメインV, p276-290を用いた。一方、APCとしては自己のEBV-LBL、末梢血単球、末梢血B細胞、単球由来成熟樹状細胞、TNF α で活性化した末梢血単球、および同種のCD53⁺脾細胞を用いた。リポソームを抗原に用いる場合はAPCとして樹状細胞を用いた。すなわち、末梢血単球をGM-CSF、IL-4存在下で1週間培養して未熟樹状細胞とし、フォスファチジルセリン(PS)を含むリポソームを取り込ませた後にTNF \cdot を添加して成熟樹状細胞とした。

(倫理面への配慮)

すべての患者検体は学内の倫理委員会で承認された文書による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

APS患者から樹立した5つのp276-290反応性CD4⁺T細胞株はいずれもGP-F、GP3、reduced β_2 GPI、p276-290を認識したが、native β_2 GPIに対して反応を示さなかった。そこで、これらT細胞クローン株を用いてp276-290がAPC上に提示されるメカニズムをAPCと抗原の両面から検討したところ、すべてのクローン株で同様の結果が得られた。

まず、native β_2 GPIをパルスした自己EBV-LBL、末梢血単球、B細胞、成熟樹状細胞、活性化単球、同種脾細胞を用いて β_2 GPI反応性T細胞株の増殖を誘導し得るかを調べたが、いずれのAPCもT細胞株の抗原特異的な増殖を誘導できなかった。

次に、各種 β_2 GPI蛋白を自己EBV-LBLにパルスし、p276-290反応性T細胞クローン株の増殖を誘導しえるかを検討した(図1)。native および nicked β_2 GPI、リコンビナントのドメインVはT細胞の増殖を誘導しなかったが、reduced β_2 GPI、大腸菌で発現させたGP-FおよびGP3はT細胞の増殖を誘導した。GP-F、GP3からMBPを取り除くとT細胞の反応性は低下した。T細胞の増殖を誘導しなかった β_2 GPI蛋白はいずれもリン脂質結合ドメインが分子表面に露出していた。一方、T細胞の増殖を誘導したものはいずれも分子修飾によりコンフォメーションが変化し、リン脂質結合ドメインが表面に露出していない可能性が考えられた。

β_2 GPIはリン脂質結合ドメインを介してリン脂質と結合することから、その抗原性を調べた(図2)。 β_2 GPIと結合したPSリポソームを取り込んだ樹状細胞はp276-290反応性T細胞の増殖を誘導した。

D. 考察

自己反応性T細胞の胸腺における除去は完全でなく、正常のT細胞レパトワフには多くの自己反応性T細胞が残存する。これら自己反応性T細胞は調節性細胞などを介して抑制されているが、何らかの要因により活性化されれば自己免疫疾患を発症しうる。したがって、自己免疫疾患の病因解明には自己反応性T細胞の活性化メカニズムの追究が不可欠である。

APSにおいては、抗リン脂質抗体産生を誘導する β_2 GPI反応性CD4⁺T細胞が病態と密接に関連している。その選択的な活性化のためにはエピトープペプチドが末梢APCにより提示される必要がある。APCにおけるプロセッシングでは、取り込んだ抗原がエンドゾームで各種プロテアーゼの作用を受けてペプチド断片となり、そのうち自己HLAクラスIIと親和性のあるものだけが膜表面に発現され

る。したがって、 β_2 GPI 反応性 CD4⁺T 細胞により認識される p276-290 が APC により発現されるためにはプロセッシング過程における何らかの変化が必要である。そのような要因として APC の種類、活性化状態や抗原分子の構造修飾などが報告されている。今回の β_2 GPI 反応性 T 細胞クローン株を用いた検討により、本来は分子表面に露出している β_2 GPI のリン脂質結合ドメインが覆われることでエピトープペプチドが提示されることが示された。また、 β_2 GPI はリン脂質と複合体を形成することで β_2 GPI 反応性 T 細胞の活性化を誘導できることも明らかとなった。したがって、DR53 保有者がアポトーシスに陥った細胞やリン脂質を豊富に含む外来微生物に大量に暴露されると、 β_2 GPI が結合したこれら抗原を取り込んだ APC がエピトープペプチドが発現し、 β_2 GPI 反応性 T 細胞の活性化を介して抗 β_2 GPI 抗体産生を誘導するかもしれない。今後、抗リン脂質抗体産生を誘導する β_2 GPI の抗原修飾をさらに追究することが APS 発症のメカニズム解明につながる可能性がある。

E. 結論

β_2 GPI がリン脂質と結合することで自己反応性 T 細胞の活性化を誘導する抗原エピトープが発現されることから、このようなイベントが APS の病因とな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) Yoshida K, Arai T, Kaburaki J, Ikeda Y, Kawakami Y, Kuwana M. Restricted T cell receptor β -chain usage by T cells autoreactive to β_2 -glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. Blood 2002; 99(7): 2499-2504.
- 2) Kuwana M, Kawakami Y, Ikeda Y. Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune

thrombocytopenic purpura. Blood 2003;101(2): 621-623.

2. 学会発表

- 1) 桑名正隆、楠木淳一: β_2 -グリコプロテイン I (β_2 GPI) 反応性 T 細胞を標的とした抗リン脂質抗体症候群 (APS) に対する選択的免疫療法の可能性. 第 46 回日本リウマチ学会総会. 2002. 4.
- 2) Kuwana M, Yoshida K, Arai T, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y: Restricted T cell receptor β -chain usage by T cells autoreactive to β_2 -glycoprotein I in patients with APS. 10th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. 2002. 9.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

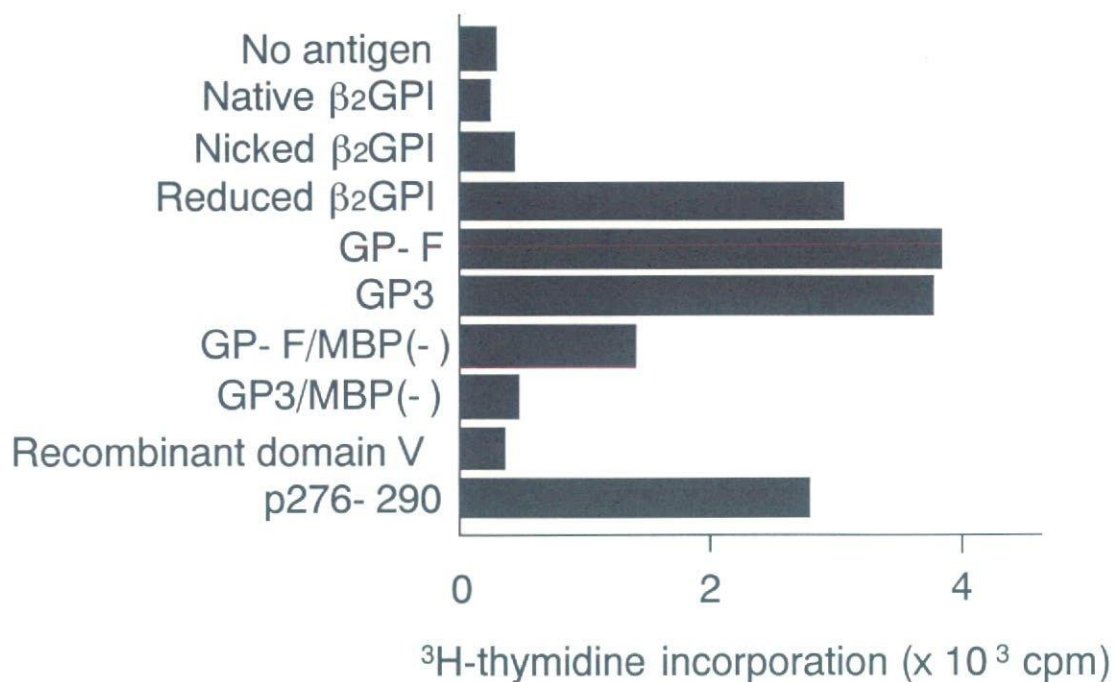


図1. 様々なβ₂GPI抗原に対する p276-290 反応性 T 細胞の増殖反応

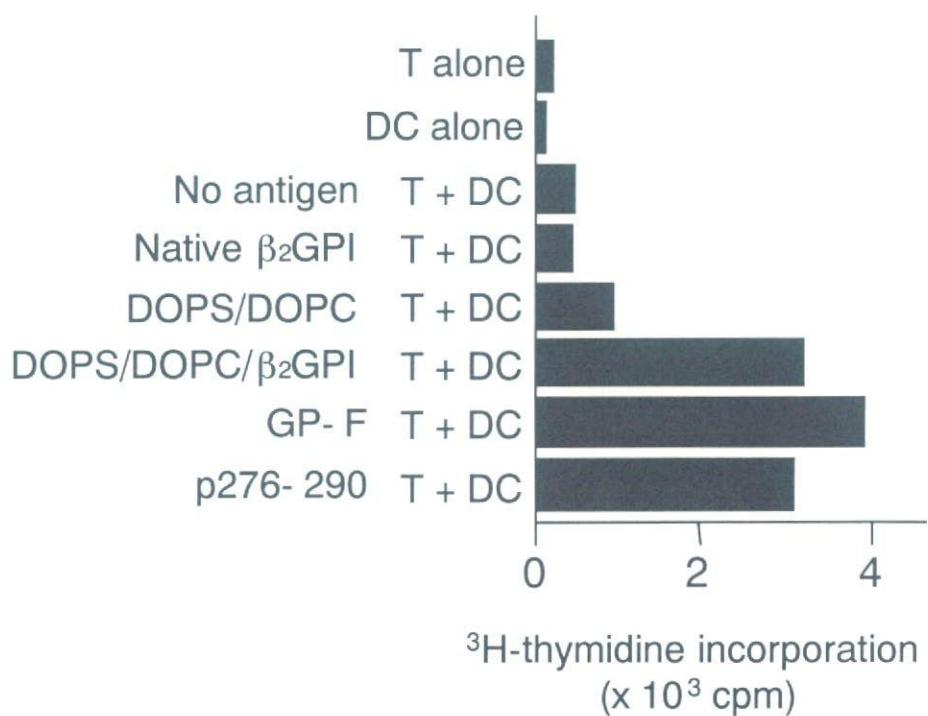


図2. PS リポソームβ₂GPI 複合体に対する p276-290 反応性 T 細胞の増殖反応

抗リン脂質抗体症候群に対する rituximab(リツキサンの有用性 に関する研究

山崎 雅英 (金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学・血液内科)

研究要旨

非ホジキンリンパ腫および治療抵抗性特発性血小板減少性紫斑病に合併した抗リン脂質抗体症候群3症例に対しCD20に対するモノクローナルキメラ抗体である rituximab を投与し、その有用性を検討した。全症例で投与1ヵ月後には抗カルジオリピン抗体は陰性となり、上昇していたプロトンビンドフラグメント(F_{1+2})も正常値となった。重篤な副作用は認められず、本症候群に対する新規治療法となりうる可能性が示唆された。

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(anticardiolipin antibody, aCL)またはループスアンチコアグulant (lupus anticoagulant, LA)などの抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibodies, aPL)を有し、反復性血栓症または不育症をきたす自己免疫疾患の1つと考えられている。しかし他の自己免疫疾患と異なり、プレドニゾロンなどの免疫抑制剤の有用性が否定的であるため抗血小板薬や抗凝固薬などの抗血栓薬による二次予防が本症候群の治療の主体となっている。

Rituximab(リツキサン)はB細胞性非ホジキンリンパ腫に対し開発されたCD20に対するモノクローナルキメラ抗体であるが自己免疫性溶血性貧血や関節リウマチに対する有用性が報告されている。

今回、B細胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)2症例および難治性重症特発性血小板減少性紫斑病(ITP)に合併した抗リン脂質抗体症候群に対し rituximab を投与し現疾患および抗リン脂質抗体に対する効果を検討した。

B. 研究方法

(1) 対象

症例1.50歳、男性

2001年発症のFollicular lymphoma. fludarabine+ cyclophosphamideによる化学療法4クールにて部分寛解(partial response, PR)となり退院。3コース後より血小板回復不良となった。2002年2月再入院。このとき血小板数 $60 \times 10^3/\mu\text{L}$ と血小板減少が遷延しておりAPTT 65.0秒と延長していたためLA検査施行しLA陽性、IgM-aCL 92 MPLと上昇していた(第一回入院時は両者とも陰性)。NHLに対し2002年2月12日より rituximab(以下R)($375 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{day}$, 週1回、計4回)投与され退院となる。

症例2. 78歳、女性

1997年7月より慢性甲状腺炎、APS(LA, IgG-aCL 陽性, 右下肢深部静脈血栓症、脳梗塞)に対しアスピリン+ワーファリンにて加療開始。2001年11月NHL, diffuse large cell, CS IIIBを発症しCHOP療法施行、完全寛解となるも4ヵ月後再発。2002年7月当科再入院の上、rituximab 4回投与、リンパ節はR 2回投与後より縮小、Good PR stateにて退院となるもNHLは2002年10月第2回再発、外来にて経過観察中。

症例3.45歳、女性

1987年発症のITP(発症時血小板数

10×10³/μL)。2002年5月避妊リング除去を契機に両側下肢深部静脈血栓症、右網膜中心動脈閉塞症を発症、点状出血も著明であり当科紹介(血小板数 8×10³/μL)。各種治療無効のITPでAPSを併発しておりインフォームドコンセント、IRB審査の上、R投与(週1回、計4回投与)した。

(2)測定項目

投与前、投与1, 2, 3, 4週後(4回投与終了直後)、投与終了1ヶ月後より月1回、血算、PT, APTT, LA, IgG-, IgM-aCL, aCL/β₂GPI, F1+2, IgG, A, M, 末梢血Bリンパ球分画の測定を施行した。血栓症・出血傾向・感染症発症の有無、原疾患の状態につき臨床的に経過観察した。

C.研究結果

1)rituximab の凝血的・免疫学的効果 (表1)

3症例ともR第1回投与開始2週間後よりaCLの低下を認め、4回投与終了1ヵ月後にはIgG-, IgM-aCLとも正常域まで低下した。1nM以上であったF₁₊₂は投与終了1ヶ月後までに全例1nM以下に低下した。APTTの延長は軽快したものの、LAの陰性化は見られなかった。

2)rituximab の血小板数に及ぼす影響 (表1)

血小板の減少を伴っていた症例1,3のうち、症例1ではR第2回投与後より100×10³/μLに上昇した。経過中、R投与終了1ヵ月後に50×10³/μLまで低下したもののその後再上昇し、現在100×10³/μL前後で安定している。症例3ではR投与後6ヶ月を経過したものの血小板数は不安定で10~90×10³/μLを変動している。

3)rituximab の原疾患に対する効果

症例1ではR投与によりNHLはCRにはいたらなかったもののgood PRとなり、治療12ヶ月後の現在もgood PRを維持している。

R投与により第二期CRとなった症例2

では2ヵ月後に再発した。高齢でもあり現在NHLについては無治療で経過観察中である。

症例3では前述の通り、R投与によっても血小板数の有意の増加は認めていない。

4)血栓症発症の有無

R投与後の観察期間が6~12ヶ月と短期間であるものの3症例とも血栓症の再燃は認めていない。

5)rituximab 投与の副作用

R投与中のinfusion reactionは3症例とも認めなかった。末梢血中のB細胞はR投与6ヵ月後まで認められなかった。また、症例1,2では免疫グロブリン(IgG, IgA, IgM)の有意な低下を伴っており(症例1: IgG/IgA/IgM= 578/19/636, 症例2: 467/87/42)回復は見られていないものの、重篤な感染症の併発は認められていない。

D.考案

抗リン脂質抗体症候群は自己免疫疾患の1つと考えられているがプレドニゾンなどの免疫抑制療法の有用性が確立していない点、全身性エリテマトーデスなど他の自己免疫疾患と大きく異なる点である。Rituximabは免疫担当細胞であるB細胞傷害性を有することからいくつかの自己免疫疾患に対する効果が期待され、治療抵抗性特発性血小板減少性紫斑病(ITP)や自己免疫性溶血性貧血(AIHA)、関節リウマチ(RA)などに有用である、とする報告も散見される。

rituximab投与1ヶ月で全3症例において抗リン脂質抗体がIgG型、IgM型aCL, aPT/PSともに低下、正常化した。これに伴い、凝固亢進状態の指標と考えられるF₁₊₂も正常化し、臨床的にも血栓症の再燃は見られなかった。以上の結果より、rituximabは抗リン脂質抗体産生B細胞を傷害することにより抗体価を低下させるとともに血栓傾向を是正する可能性が示

唆される。観察期間は短いものの今後の F_{1+2} や抗リン脂質抗体力価の推移とともに血栓症発症の有無を慎重に経過観察する必要がある。

抗リン脂質抗体の軽快の一因として rituximab による原疾患の改善も考慮する必要がある。しかし症例1は rituximab 投与によっても NHL は完全寛解にはいたっておらず、症例2では NHL 発症の前に APS が存在したこと、また rituximab 治療後 NHL が再発しているにもかかわらず抗リン脂質抗体価の再上昇がないことから、今回の抗リン脂質抗体価の改善は必ずしも原疾患の改善にその理由を求めることはできず、rituximab の抗リン脂質抗体症候群そのものに対する有用性を示す所見かもしれない。

rituximab 投与により症例1では血小板数が改善したものの、症例3(難治性 ITP 症例)では抗リン脂質抗体価の改善にもかかわらず血小板数の改善が見られなかったことは興味深い。その一因としては症例3では脾腫があり、これに伴う脾機能亢進症を伴っている可能性や、症例1と3における血小板抗体に何らかの相違がある可能性もあり、更なる検討が必要である。

rituximab 投与に際しては infusion reaction や腫瘍崩壊症候群などの副作用の報告があるが、今回検討した3症例についてはこのような副作用は見られなかった。しかし、症例1,2では治療6-12ヶ月経過しているにもかかわらず、末梢血B細胞の出現は見られず、免疫グロブリン値の低下も持続している。末梢B細胞の消失は抗リン脂質抗体産生抑制という意味では良い所見とも考えられるが、一方で免疫グロブリン値の低値が持続していることを勘案すると、今後日和見感染症の発症や感染症の重症化が見られないか、慎重に経過観察する必要がある。

E. 結論

非ホジキンリンパ腫および難治性血小

板減少性紫斑病に合併した抗リン脂質抗体症候群に対し、CD20 に対するマウスーヒトキメラモノクローナル抗体である rituximab を単独投与することにより、重篤な合併症なく抗リン脂質抗体の低下と臨床症状、凝固亢進状態の改善をみた。Rituximab 投与は難治性重症抗リン脂質抗体症候群に対する新規治療法となりうる可能性があり、今後慎重な経過観察を行うとともに、前向き大規模研究を行う意義がある可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

書籍

- 1) 山崎雅英: 後天性血栓傾向. 編集: 中村忍、中尾眞二. 血液疾患臨床ハンドブック、中外医学社、東京、2002、251-265.
- 2) 山崎雅英: 抗リン脂質抗体症候群. 編集: 竹原和彦、近藤敬文. インフォームドコンセントのための図説シリーズ 膠原病. 3. その他の膠原病. 医薬ジャーナル社、大阪(印刷中).

雑誌

1. Asakura H, Okudaira M, Yoshida T, Ontachi Y, Yamazaki M, Morishita E, Miyamoto KI, Nakao S: Induction of vasoactive substances differs in LPS-induced and TF-induced DIC models in rats. *Thromb Haemost* 88(4): 663-667, 2002.
2. Ontachi Y, ASakura H, Takami A, Mizutani T, Kato M, Ito T, Saito M, Morishita E, Yamazaki M, Hayashi S, Minami S, Nakao S: A case of cardiac B cell lymphoma complicated by hemophagocytic syndrome. *Haematologica* 87(8): ECR27, 2002.
3. Asakura H, Ichino T, Yoshida T, Suga Y, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M,

- Ito T, Yamazaki M, Aoshima K, Morishita E, Saito M, Miyamoto KI, Nakao S: Beneficial effect of JTV-803, a new synthetic inhibitor of activated factor X, against both lipopolysaccharide-induced and tissue factor-induced disseminated intravascular coagulation in rat models. *Blood Coagul Fibrinolysis* 13(3): 233-239, 2002.
4. Asakura H, Suga Y, Aoshima K, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Saito M, Morishita E, Yamazaki M, Takami A, Yoshida T, Miyamoto KI, Nakao S: Marked difference in pathophysiology between tissue factor- and lipopolysaccharide- induced disseminated intravascular coagulation models in rats. *Crit Care Med* 30(1): 161-164, 2002.
5. 菅幸生、朝倉英策、吉田知孝、森下英理子、山崎雅英、青島敬二、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、伊藤貴子、宮本謙一、中尾眞二。組織因子および LPS 誘発ラット DIC モデルの経時的病態比較。日本血栓止血学会雑誌。13(1): 41-46, 2002.
6. 御館靖雄、朝倉英策、水谷朋恵、加藤みのり、伊藤貴子、山崎雅英、森下英理子、吉田知孝、齊藤正典、青島敬二、南真司、中尾眞二。摘脾後に肺梗塞を発症した抗リン脂質抗体症候群合併 ITP の 1 例。日本血栓止血学会雑誌。13(1): 47-54, 2002.
7. 菅幸生、朝倉英策、吉田知孝、森下英理子、山崎雅英、青島敬二、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、伊藤貴子、宮本謙一、中尾眞二。LPS 誘発ラット DIC モデルにおけるエンドセリンの役割。日本血栓止血学会雑誌。13(2): 169-174, 2002.
8. 吉田知孝、朝倉英策、表美香、山崎雅英、森下英理子、中尾眞二: ループスアンチコアグラント検査におけるカオリン凝固時間混合試験のコントロール血漿の重要性について。日本血栓止血学会雑誌。13(2): 187-190, 2002.
9. 佐野陽子、朝倉英策、吉田知孝、浅村梨沙、山崎雅英、森下英理子、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、伊藤貴子、宮本謙一、中尾眞二。組織因子誘発ラット DIC モデルにおける出血症状・臓器症状の発現機序—抗線溶剤投与に伴う影響—日本血栓止血学会雑誌。13(4): 319-325, 2002.
10. 佐野陽子、朝倉英策、吉田知孝、浅村梨沙、山崎雅英、森下英理子、御館靖雄、水谷朋恵、加藤みのり、伊藤貴子、宮本謙一、中尾眞二。ラット DIC モデルにおける血管作動性物質の変動—抗凝固薬投与に伴う影響—。日本血栓止血学会雑誌。13(6): 485-492, 2002.

2.学会発表

1. Yamazaki M, Kaneda M, Asakura H, Nakao S, Triplett DA: Heterogeneities of lupus anticoagulant antibodies (LA): Different ligand-specificities determine clinical features of antiphospholipid syndrome (APS); Each LA demonstrates different hemostatic effect in vitro. *Immunobiology* 205(2): 182-183, 2002.(1st Tutzing Antiphospholipid Conference, 22nd-22th, Apr, 2002, Tutzing, Germany)
2. Yamazaki M, Kaneda M, Yoshida T, Ontachi Y, Mizutani T, Ito T, Asakura H, Nakao S: Heterogeneity of lupus anticoagulant antibodies (LA): Different ligand-specificities determine a clinical features of APS. *Lupus* 11(9): 606, 2002.(10th International Congress on antiphospholipid antibodies. 29th Sept-3rd Oct., 2002, Sicily, Italy)
3. Yamazaki M, Yoshida T,