

6. 腱摩擦音	あり	なし	不明
「あり」の場合その関節数：_____個			
7. 舌小帯の短縮	あり	なし	不明
8. 皮下石灰化	あり	なし	不明
9. 毛細血管拡張	あり	なし	不明
10. 皮膚色素異常	あり	なし	不明
11. 爪上皮出血点	あり	なし	不明

臓器障害

1. 末梢血管

レイノー症状	あり	なし	不明
Digital pitting scars	あり	なし	不明
Digital gangrene 現在	あり	なし	不明
過去一年間	あり	なし	不明
Digital tip ulceration 現在	あり	なし	不明
過去一年間	あり	なし	不明
X線による手指末節骨の吸収	あり	なし	不明

2. 関節

関節痛／関節炎	あり	なし	不明
「あり」の場合	関節痛のみ	炎症性関節炎（腫脹、熱感を伴う）	
手指屈曲拘縮	あり	なし	不明

3. 肺および肺血管

労作時呼吸困難	あり	なし	不明
慢性の乾性咳嗽	あり	なし	不明
聴診による両側性ラ音	あり	なし	不明
聴診によるⅡp音亢進	あり	なし	不明
心電図による右心負荷所見	あり	なし	不明
心エコーによる肺動脈圧上昇	あり	なし	不明

「あり」の場合、心エコーによる推定収縮期右室圧 _____mmHg

胸部X線による間質性変化	あり	なし	不明
--------------	----	----	----

胸部 CT (HRCT)

間質性変化なし すりガラス様変化を伴う 網状影を伴う 蜂窩影のみ

肺機能検査 施行 施行せず
 FVC _____ml %predicted FVC _____%
 FEV_{1.0}% _____%
 DLco _____ml/min·torr %predicted DLco _____%

気管支肺胞洗浄液 施行 施行せず
 細胞数増多: あり (_____x10⁵/ml) なし
 Mφ増多: あり (_____%) なし
 リンパ球増多: あり (_____%) なし
 好中球増多: あり (_____%) なし
 好酸球増多: あり (_____%) なし

胸腔鏡下肺生検 施行 施行せず
 「施行」の場合、組織所見: _____

酸素吸入 あり なし 不明
 過去1年に導入した場合、導入日時: (西暦) _____年____月
 KL-6 値上昇 あり (_____U/ml) なし 不明
 SP-D 値上昇 あり (_____ng/ml) なし 不明

4. 心臓

動悸 あり なし 不明
 心不全徴候 あり なし 不明
 心電図による不整脈 あり なし 不明
 「あり」の場合 伝導障害 多発性心室性期外収縮 その他
 不整脈に対する治療 あり なし 不明
 ペースメーカー使用 あり なし 不明
 過去1年に導入した場合、導入日時: (西暦) _____年____月
 左心室拡大+右心室拡大 あり なし 不明
 心エコーによる心のう液貯留 あり なし 不明
 心エコーによる心筋運動障害 あり なし 不明
 Left ventricular ejection fraction _____% 不明

5. 腎臓

高血圧症	あり	なし	不明
腎機能障害	あり	なし	不明
腎クリーゼ（過去1年）	あり	なし	不明

過去1年に生じた場合、発症日時：（西暦）____年__月

透析	あり	なし	不明
----	----	----	----

過去1年に導入した場合、導入日時：（西暦）____年__月

6. 上部下部消化管

上部消化管症状（嚥下障害、胸やけなど）

あり	なし	不明
----	----	----

下部消化管症状（繰り返す下痢、腹痛など）

あり	なし	不明
----	----	----

細菌増殖に対して抗生剤投与

あり	なし	不明
----	----	----

食道造影による食道蠕動能低下

あり（高度	軽度）	なし	不明
-------	-----	----	----

偽性腸閉塞（過去1年）

あり	なし	不明
----	----	----

過去1年に生じた場合、発症日時：（西暦）____年__月

吸収不良症候群

あり	なし	不明
----	----	----

中心静脈栄養

あり	なし	不明
----	----	----

過去1年に導入した場合、導入日時：（西暦）____年__月

7. 筋肉

近位筋の筋力低下

高度	中等度	軽度	なし	不明
----	-----	----	----	----

歩行器の必要

あり	なし	不明
----	----	----

CPK 上昇

あり（_____IU/l）	なし	不明
---------------	----	----

筋電図の異常

あり	なし	不明
----	----	----

筋生検の異常

あり	なし	不明
----	----	----

8. 他の膠原病・自己免疫疾患の重複または合併

全身性エリテマトーデス

あり	なし	不明
----	----	----

多発性筋炎／皮膚筋炎

あり	なし	不明
----	----	----

シェーグレン症候群

あり	なし	不明
----	----	----

原発性胆汁性肝硬変

あり	なし	不明
----	----	----

慢性甲状腺炎（橋本病）	あり	なし	不明
抗リン脂質抗体症候群	あり	なし	不明
その他	_____		

検査所見

1. 血算

白血球数 _____ μ l
 ヘモグロビン _____ g/dl
 ヘマトクロット _____ %
 血小板数 _____ $\times 10^3 \mu$ l

2. 赤沈 _____ mm/時

3. IgG _____ mg/ml

4. クレアチニン _____ mg/dl

5. 尿蛋白 3+ 2+ 1+ -

6. 抗核抗体 パターン _____ 抗体価 _____ 倍

7. リウマトイド因子 _____ IU/ml CARF _____ AU/ml

8. 新たな自己抗体の出現 あり なし 不明

「あり」の場合その自己抗体 _____

HAQ

簡単に	何とか	人に手伝って	全く
ひとりで	ひとりで	もらえば	できない
できる	できる	できる	
(0点)	(1点)	(2点)	(3点)

着衣と身繕い このカテゴリーの最高値 (index) : _____

1. 服を着たり、ボタンをする

2. 髪を洗う

起立 このカテゴリーの最高値 (index) : _____

3. 肘掛けのない椅子から立ち上げる
4. 寝床に入ったり、寝床から起きあがる

食事

このカテゴリーの最高値 (index) : _____

5. 箸で食べ物をつかむ
6. 飲み物のいっぱい入ったコップを
口までもっていく
7. 缶ジュースのふたをあける

歩行

このカテゴリーの最高値 (index) : _____

8. 平地を3分間位、自分のペースで歩く
9. 階段を5段のぼる

衛生

このカテゴリーの最高値 (index) : _____

10. 入浴時に全身を洗い、タオルでふく
11. 浴槽にはいる
12. 洋式便座に座り、立ち上がる

動作

このカテゴリーの最高値 (index) : _____

13. 棚の上の2kg程度の物に手を伸ばして、
降ろす
14. 前かがみになって、床の上の物を
拾いあげる

握力

このカテゴリーの最高値 (index) : _____

15. 自動車のドアをあける
16. ガラスびんのふたを回してあける
17. 水道の蛇口の開け閉め

- その他 このカテゴリーの最高値 (index) : _____
18. 近所の商店街に買い物へ行く
19. 自動車の乗り降り
20. 洗濯や掃除などの家事をする

HAQ-DI: _____ (各カテゴリーの index の平均値)

治療

① 疾患修飾薬

1. D-ペニシラミン 過去1年に開始 それ以前より服用中 服用せず
服用中の場合、現在の投与量 : _____
過去1年に開始した場合、開始日時 : _____年____月 初期量 : _____
2. 副腎皮質ステロイド 過去1年に開始 それ以前より服用中 服用せず
服用中の場合、現在の投与量 : _____
過去1年に開始した場合、開始日時 : _____年____月 初期量 : _____
3. シクロフォスファミド内服 過去1年に開始 それ以前より服用中 服用せず
服用中の場合、現在の投与量 : _____
過去1年に開始した場合、開始日時 : _____年____月 初期量 : _____
4. シクロフォスファミド・パルス 過去1年に開始 それ以前より施行 施行せず
施行中の場合、現在の投与量 : _____
過去1年に開始した場合、開始日時 : _____年____月 初期量 : _____
5. アザチオプリン 過去1年に開始 それ以前より服用中 服用せず
服用中の場合、現在の投与量 : _____
過去1年に開始した場合、開始日時 : _____年____月 初期量 : _____
6. メソトレキサート 過去1年に開始 それ以前より服用中 服用せず
服用中の場合、現在の投与量 : _____
過去1年に開始した場合、開始日時 : _____年____月 初期量 : _____
7. シクロスポリンA 過去1年に開始 それ以前より服用中 服用せず
服用中の場合、現在の投与量 : _____

過去1年に開始した場合、開始日時：____年____月 初期量：_____

8. 他の疾患修飾薬 _____

② 血管拡張薬

- | | | | |
|-----------------|---------|---|------|
| 9. Ca拮抗薬 | 服用中（薬剤名 | ） | 服用せず |
| 10. プロスタグランジン製剤 | 服用中（薬剤名 | ） | 服用せず |
| 11. ビタミンE製剤 | 服用中（薬剤名 | ） | 服用せず |
| 12. ACE阻害薬 | 服用中（薬剤名 | ） | 服用せず |
| 13. 他の血管拡張剤 | 服用中（薬剤名 | ） | 服用せず |

③ その他の治療薬

- | | | | |
|------------------------|---------|---|------|
| 14. NSAID | 服用中（薬剤名 | ） | 服用せず |
| 15. H ₂ 拮抗薬 | 服用中（薬剤名 | ） | 服用せず |
| 16. プロトンポンプ阻害薬 | 服用中（薬剤名 | ） | 服用せず |
| 17. 消化管機能改善薬 | 服用中（薬剤名 | ） | 服用せず |
| 18. 抗不整脈薬 | 服用中（薬剤名 | ） | 服用せず |
| 19. 抗凝固薬・抗血小板薬 | 服用中（薬剤名 | ） | 服用せず |

その他特記事項

注意事項

臨床症状は、特に指示のない場合には現在ある症状について記入して下さい。ただし、検査所見については、例えば1年後の経過報告の場合には、初診時からから数えて丁度1年後に近いものを記入して下さい。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

抗 RNA ポリメラーゼ I / III 抗体 ELISA の有用性の検討

分担研究者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所講師
協力者 田中庸子 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所研究員
協力者 岡野 裕 横浜市立市民病院内科医長

研究要旨

抗 RNA ポリメラーゼ (RNAP) I/III 抗体の検出は強皮症の診断や病型分類に有用である。我々は RNAP III のサブユニット RPC155 上に強皮症患者血清中の抗 RNAP I/III 抗体により認識される主要なエピトープを同定し、同部位のリコンビナント蛋白を用いた酵素免疫測定法 (ELISA) を開発した。本年度は抗 RNAP I/III 抗体 ELISA の有用性を検討するため、抗 RNAP I/III 抗体陽性 103 例を含む強皮症 269 例を対象として ELISA により抗 RNAP I/III 抗体を測定した。その結果、ELISA の特異度は 99%とぎわめて高かったが、感度は 89%にとどまった。その原因として、一部の血清により認識されるエピトープがプラスチックプレート上に固相化されたりコンビナント抗原に表出されない可能性が考えられた。抗 RNAP I/III 抗体 ELISA は現時点で一般臨床検査として十分に実用的と考えられたが、感度を改善するための改良が望まれた。

A. 研究目的

強皮症患者血清中にはトポイソメラーゼ I やセントロメアなど重要な生物活性を持つ核蛋白に対する自己抗体が高頻度に検出される¹⁾。これら自己抗体は強皮症に特異的なことから、その診断に有用である。また、抗トポイソメラーゼ I 抗体は肺線維症を伴う diffuse 型、抗セントロメア抗体は内臓病変が少ない limited 型と関連し、これら自己抗体の検出は病型分類や予後の予測にも用いられている^{1,2)}。

我々は 1993 年に複数の RNA ポリメラーゼ (RNAP) を同時に認識する自己抗体が強皮症患者血清中に特異的に検出されることを報告した³⁾。RNAP は RNA の転写を触媒する酵素で、RNAP I は rRNA、RNAP II は mRNA、RNAP III

は tRNA などの低分子 RNA をそれぞれ転写する。強皮症患者血清中には RNAP I と RNAP III を同時に認識する抗体 (抗 RNAP I/III 抗体) が検出され、そのうち一部は RNAP II も認識する。抗 RNAP I/III 抗体は強皮症に特異性がきわめて高く、急速に皮膚硬化が進行する diffuse 型に高頻度に検出される。特に同抗体陽性例は強皮症腎を高率に併発する¹⁻³⁾。強皮症腎は適切な治療が早期に開始されないと腎不全、悪性高血圧を併発して予後が悪い。日本人強皮症患者における抗 RNAP I/III 抗体の陽性頻度は 5%程度と少ないが、欧米の白人強皮症患者での頻度は約 20%と高い⁴⁾。したがって、抗 RNAP I/III 抗体は強皮症の診断、病型分類、治療方針の決定に際してきわめて有用な自己抗体である。し

かし、大量のアイソトープと培養細胞を用いる煩雑な免疫沈降法が唯一の検出法であったため、一般検査室での抗 RNAP I/III 抗体の検出は困難であった。

そこで、我々は抗 RNAP I/III 抗体検出のための簡便な酵素免疫測定法 (ELISA) の開発をめざし、患者血清中の抗 RNAP I/III 抗体により高頻度に認識されるエピトープの同定を試みた。抗 RNAP I/III 抗体陽性患者血清を用いたアフィニティーにより RNAP 抗原を精製し、それを抗原とした免疫プロットにより RPC155、RPC62 の 2 つの RNAP III サブユニットが抗 RNAP I/III 抗体により高頻度に認識されることを見出した⁵⁾。さらに、分子生物学的手法を用いて患者血清中の自己抗体の多くは RPC155 のアミノ酸残基 891-1020 番目を認識することを明らかにした。このエピトープ部分を含むリコンビナント蛋白 RPC155C-g を抗原として用いた ELISA は少数例の検討において、感度、特異性ともに 100% と良好な結果を示した⁵⁾。そこで、本研究では様々な民族背景を有する多数の強皮症患者を対象として抗 RNAP I/III 抗体 ELISA が一般臨床検査として有用かどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 対象

アメリカリウマチ学会による分類予備基準⁷⁾を満たす強皮症患者 269 例を対象とした。Medical University of South Carolina の Richard M. Silver の研究グループから提供を受けた 196 例を第 1 群、University of Pittsburgh の Thomas A. Medsger, Jr から提供を受けた 73 例を第 2 群とした。第 1 群は 1996 年から 3 年間に外来受診した強皮症患者 (diffuse 型 85 例、limited 型 106 例、重複型 5 例) で白人 134 例、

黒人 55 例、ヒスパニック系 5 例、アジア系 2 例であった。一方、第 2 群はすでに免疫沈降法により抗 RNAP I/III 抗体陽性が確認された強皮症患者 (diffuse 型 67 例、limited 型 6 例) で、白人 64 例、黒人 9 例であった。患者血液の使用については各施設での倫理委員会で承認を受け、文書による同意を得た上で採取した。

2) 強皮症関連自己抗体の同定

患者血清中の自己抗体の同定のため、HEp2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法、HeLa 細胞の可溶性細胞抽出物を抗原とした蛋白および RNA 免疫沈降法を行った²⁾。蛋白の免疫沈降法により RNAP I の高分子サブユニット (190-kDa 蛋白と 126-kDa 蛋白) と RNAP III の高分子サブユニット (155-kDa 蛋白と 138-kDa 蛋白) のすべてを沈降した血清を抗 RNAP I/III 抗体陽性とした³⁾。

3) 抗 RNAP I/III 抗体 ELISA

ELISA による抗 RNAP I/III 抗体の検出は既報の方法に従った⁶⁾。抗原として RPC155 のアミノ酸残基 891-1020 番のエピトープ部分とマルトース結合蛋白 (MBP) のリコンビナント融合蛋白を用いた。0.05% の 2-メルカプトエタノール (2ME) を添加したリン酸緩衝液で希釈した精製 RPC155C-g を 96 ウェルポリビニールプレート (スミロン H プレート; 住友ベークライト、東京) に固相化した。プレートは 3% ウシ血清アルブミンでブロッキングし、250 倍に希釈した後に MBP の発現を誘導した大腸菌成分と反応させて大腸菌成分、MBP と反応する抗体を除去した患者血清を各ウェルに加えた。さらに、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒト IgG 抗体と反応させ、酵素基質により発色させた。各ウェルの 405 nm での吸光度はプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) によ

り測定した。全ての検体は 2 ウェルで測定し、その平均を求めた。抗 RNAP I/III 抗体高力価陽性血清の希釈系列から標準曲線を作成し、4,000 倍希釈血清中の抗 RNAPI/III 抗体量を 1unit として各検体の吸光度を unit に換算し、4.15 unit をカットオフとした。抗 RNAPI/III 抗体 ELISA の感度、特異度、陽性的中度、陰性的中度は免疫沈降法による結果との対比により求めた。

4) 免疫プロット法

RPC155C-g および RPC62 に対する反応性を免疫プロットを用いて検出した⁶⁾。RPC155C-g および RPC62 のリコンビナント融合蛋白を発現した大腸菌可溶性成分を 10%ポリアクリルアミド-SDS ゲル電気泳動で分画し、ニトロセルロース膜に電気的に転写した。血清は 250 倍に希釈し、MBP の発現を誘導した大腸菌成分と反応させて、あらかじめ大腸菌成分と MBP と反応する抗体を除去した。ニトロセルロース膜は血清、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒト IgG 抗体と順次反応させ、NBT/BCIP を基質とした発色反応により抗体を検出した。

C. 研究結果

1) ELISA による抗 RNAPI/III 抗体の検出

まず第 1 群の 196 例の強皮症血清における強皮症関連自己抗体を同定した。最も頻度が高かったのは抗セントロメア抗体で、56 例 (29%) が陽性であった。次いで、抗トポイソメラーゼ I 抗体が 35 例 (18%)、抗 RNAPI/III 抗体が 30 例 (15%) に検出された。その他に、抗 U1RNP 抗体 23 例 (12%)、抗 U3RNP 抗体 12 例 (6%)、抗 Th/To 抗体 8 例 (4%)、抗 PM-Scl 抗体 (2%)、抗 Ku 抗体 3 例 (2%)、抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体 3 例 (2%) が検出された。23 例

(12%) では既知の強皮症関連自己抗体は検出されなかった。これら全例において ELISA により抗 RNAPI/III 抗体を測定し、その結果を免疫沈降法による抗 RNAPI/III 抗体が陽性 30 例と陰性 166 例に層別化して比較した (図 1)。抗 RNAPI/III 抗体陽性 30 例のうち 28 例は ELISA で陽性であったが、2 例は陰性であった。一方、抗 RNAPI/III 抗体が陰性の 166 例のうち ELISA で陽性となったのはわずか 1 例であった。この症例は抗セントロメア抗体陽性の limited 型で、免疫プロットで RPC155C-g と反応しないことから精製抗原に混入した大腸菌成分に対する抗体による偽陽性と考えられた。したがって、第 1 群における ELISA の感度は 93%、特異度は 99%、陽性適中度は 97%、陰性適中度は 99%であった。

第 1 群の結果から少数ながら偽陰性血清の存在が示されたことから、さらに多数の抗 RNAPI/III 抗体陽性例 (第 2 群) における解析を行った (図 1)。抗 RNAPI/III 抗体陽性 73 例のうち ELISA で陽性となったのは 64 例 (88%) にとどまり、9 例が偽陰性であった。そのため感度は 88%であった。

これら 2 群における免疫沈降法と ELISA による抗 RNAPI/III 抗体の測定結果を総計した (図 2)。ほとんどの血清において ELISA と免疫沈降法による抗 RNAPI/III 抗体の測定結果は一致したが、12 例で不一致結果 (偽陰性 11 例、偽陽性 1 例) が得られた。したがって、ELISA の感度は 89%、特異度は 99%、陽性的中度は 99%、陰性的中度は 94%であった。

2) 偽陰性血清を用いた免疫プロット

ELISA で偽陰性を示した 11 例について RPC155C-g に対する反応性を免疫プロットにより確認したところ、9 例 (82%) が RPC155C-g と反応した。さらに別の RNAPIII サブユニット

RPC62 に対する反応性を検討すると、偽陰性 11 例のうち 7 例 (64%) が結合した。特に、免疫プロットで RPC155C-g と反応しなかった 2 例はいずれも RPC62 を認識した。

D. 考案

RPC155 上の主要なエピトープを発現するリコンビナント蛋白を用いた抗 RNAP I/III 抗体検出のための ELISA の有用性を様々な民族背景を有する多数の強皮症患者を用いて検討した。この ELISA の感度は 89%、特異度は 99% と良好で、煩雑な免疫沈降法に代わる抗 RNAPI/III 抗体の簡便な検出法として一般臨床検査に有用なことが確認された。特に特異度、陽性的中度ともに 99% 以上ときわめて高く、ELISA で陽性と判定されればほぼ間違いなく抗 RNAPI/III 抗体陽性であることが示された。一方、11 例 (11%) の偽陰性血清があり、検出感度には改善の余地が残された。元来 RNAPIII は 13 以上のサブユニットにより構成されるが、その中のひとつのサブユニットのエピトープ部分のみを用いたことから、ある程度の感度の低さは想定していた。ただし、予想に反して偽陰性血清の多くは免疫プロットで RPC155C-g と反応したことから、RPC155C-g に含まれるエピトープは抗 RNAPI/III 抗体陽性 103 例中 101 例 (98%) により認識される universal なエピトープであることが明らかとなった。他の強皮症関連自己抗体である抗トポイソメラーゼ I 抗体や抗セントロメア抗体も同様にほぼ 100% に近い患者血清により認識されるエピトープが同定されている^{8,9)}。したがって、これら自己免疫応答は自己抗原全体に対して誘導されているとは考えずらい。その点で、これら強皮症関連自己抗体の産生が細菌やウイルスなどの外来抗原などに対す

る免疫応答との交差反応である可能性も否定できない。

精製 RPC155C-g はそのままプラスチックプレートに固相化すると抗原性が低いため、ELISA では 0.05% の 2-ME 存在下で還元した RPC155C-g を用いた⁶⁾。偽陰性血清により認識されるエピトープは SDS、2ME 存在下での変性により発現されるが、ELISA で用いた低濃度の 2ME のみによる還元条件では表出しない。一方、130 個のアミノ酸を含む RPC155C-g を N および C 末端からさらに短くすると免疫プロットによる患者血清に対する反応性が消失することから、抗 RNAPI/III 抗体により認識されるエピトープはこの領域の非連続アミノ酸により構成されることが示されている⁶⁾。この点は RPC155C-g の変性によりエピトープが表出されることと矛盾するが、患者血清中の抗 RNAPI/III 抗体により認識される RPC155C-g 上のエピトープの認識にはある程度の高次構造が重要と考えられる。したがって、リコンビナント RPC155C-g の様々な変性処理あるいは異なった発現系によるリコンビナント蛋白の発現 (別のタグをもつ蛋白としての大腸菌での発現やバキュロウイルスを用いた昆虫細胞での発現など) により抗原性を向上できる可能性がある。また、偽陰性血清の多くは RPC62 を認識したことから、ELISA に抗原として RPC155C-g に RPC62 のリコンビナント蛋白を加えることによる検出感度の向上も期待できる。

抗 RNAPI/III 抗体 ELISA がキット化されれば、大量の検体を簡便にスクリーニングでき、一般診療における強皮症の診断にきわめて有用である。抗 RNAP I/III 抗体陽性の強皮症患者では、強皮症腎を早期に発見するための血圧自己測定を徹底させることで、強皮症腎の併発時

には早期の ACE 阻害薬開始が可能となる。したがって、本検出法が普及すれば、強皮症腎の早期発見、早期治療が可能となり、強皮症患者の予後の改善にも貢献すると思われる。

E. 結論

多数例の解析により、RPC155 上の主要なエピトープを含むリコンビナント蛋白を用いた ELISA の抗 RNAP I/III 抗体検出における有用性が確認された。ただし、偽陰性血清が少数ながら存在するため、今後の感度の向上をめざした改良が望まれた。

F. 文献

1. Okano Y: Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22:709-735.
2. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M: Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;37:75-83.
3. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M: Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1993;91: 1399-1404.
4. Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Tojo T, Medsger TA Jr: Racial differences in the distribution of systemic sclerosis-related serum antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1994;37: 902-906.
5. Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Medsger TA Jr, Wright TM: Autoantibodies to RNA polymerases recognize multiple subunits and

demonstrate cross-reactivity with RNA polymerase complexes. *Arthritis Rheum* 1999;42:275-284.

6. Kuwana M, Kimura K, Kawakami Y: Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera: application to enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum* 2002;46:2742-2747.
7. Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA Jr, Altman RD, D'Angelo WA, Fries JF, et al: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581-590.
8. Kuwana M, Kaburaki J, Medsger TA Jr, Wright TM: An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera. *Arthritis Rheum* 1999;42: 1179-1188.
9. Earnshaw WC, Machlin PS, Bordwell BL, Rothfield NF: Analysis of anticentromere autoantibodies using clones autoantigen CENP-B. *Immunology* 1987;84:4979-4983.

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuwana M, Kimura K, and Kawakami Y. Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera: application to enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum* 2002;46:2742-2747.

2. 学会発表

Kuwana M, Kimura K, Kawakami Y: Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase

III recognized by systemic sclerosis sera: Application to enzyme-linked immunosorbent assay. The 66th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (New Orleans). 2002. 10.

H. 知的所有権の出願・登録状況

桑名正隆：強皮症の診断薬（出願中、出願番号：特願 2001-397811）

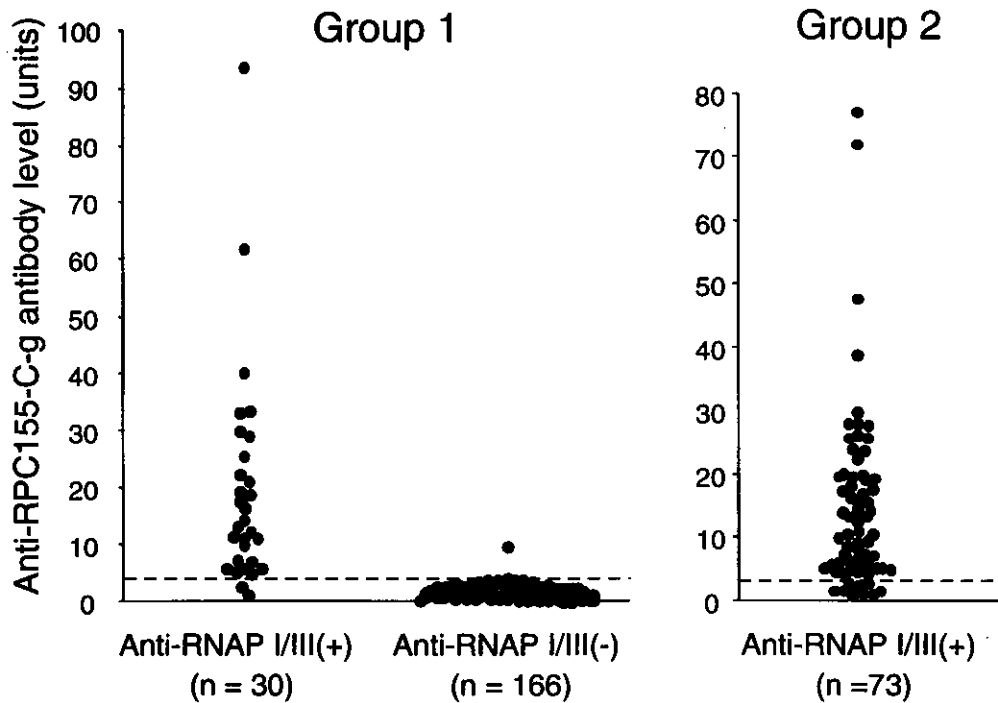


図 1：ELISA による抗 RNAPI/III 抗体の測定。第 1 群では免疫沈降法による抗 RNAPI/III 抗体の有無により強皮症患者を層別化した。点線はカットオフ値（4.15 unit）を示す。

		Immunoprecipitation		
		Positive	Negative	Total
ELISA	Positive	92	1	93
	Negative	11	165	176
	Total	103	166	269

Sensitivity 92/103 (89%)
 Specificity 165/166 (99%)
 PPV 92/93 (99%)
 NPV 165/176 (94%)

図 2：強皮症患者 269 例を対象とした免疫沈降法と ELISA による抗 RNAPI/III 抗体の測定結果の比較。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

強皮症患者における抗トポイソメラーゼ I 抗体抗体価の臨床的意義

分担研究者 石川 治 群馬大学医学部皮膚科学教授
協力者 遠藤雪恵 群馬大学医学部皮膚科学大学院生
協力者 橋本姿恵 群馬大学医学部皮膚科学大学院生
協力者 根岸 泉 群馬大学医学部皮膚科学講師

研究要旨

抗トポイソメラーゼ I 抗体は重症型の強皮症のマーカーとして知られているが、近年その抗体価と皮膚および内臓病変の重症度に相関が見られることが報告された。今回、当科で経験した症例において抗トポイソメラーゼ I 抗体の抗体価の臨床的意義を検討する目的で、1991年から2001年の11年間に当教室を初診し、1年以上観察し得た抗トポイソメラーゼ抗体陽性患者21名について、ELISA法を用いて測定した抗体価と臨床像を検討した。その結果、皮膚硬化において両者に有意な相関が見られた。このことから本抗体価が皮膚硬化の指標となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症（SSc）の特徴として、末梢血管障害や病的線維性硬化と並んで自己抗体の産生が挙げられる。SSc患者の90%以上に抗核抗体が検出されること、また、疾患に特異的な抗体が臨床像や予後に関与すること^{1,3}から、SScの病態と自己抗体の間に何らかの関連があることが示唆される。SScの自己抗体の核内抗原として、DNAトポイソメラーゼ（topo I）、セントロメア、RNAポリメラーゼ、核小体蛋白が挙げられるが、なかでもtopo Iに対する抗体は皮膚硬化の広汎な症例や肺線維症、微小血管障害の重篤な症例で高頻度に認められ^{1,3}、重症型のSScのマーカーと考えられている。このようにSScの予後を予測する上で本抗体の有無が重要であるが、抗体価の意義については未だ統一された見解はない。最近、抗topo I抗体の抗体価が疾患の重症度

や予後に関与すると報告されていることから^{4,6}、当科で経験した症例においてその臨床的意義を検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

1991年から2001年12月までの11年間に群馬大学医学部附属病院皮膚科を受診したSSc患者のうち、アメリカリウマチ協会の強皮症診断予備基準を満たし、1年以上定期的に通院し、抗topo I抗体陽性で6ヶ月以上の間隔をあけて3回以上抗体価を測定した21名についてretrospectiveに検討した。表1に対象患者の臨床像と治療で用いた疾患修飾薬の内容を示す。21例中19例が発症3年以内の早期例であった。

2) ELISA

抗体価の測定は本院の中央検査部にてMBL

社製の ELISA 法による抗 topo I 抗体測定用のキットを用いて測定した。24.0 index 以上を陽性とした。

3) 臨床所見

疾患重症度及び臓器病変について、以下の指標を用いて評価した; modified Rodnan skin thickness score (mRodnan TSS)、軀幹の硬化・指尖癩痕および指尖潰瘍の有無、胸部単純レントゲンまたは胸部 CT、呼吸機能検査、上部消化管内視鏡または食道内圧検査。

C. 研究結果

1) 臨床像と抗 topo I 抗体価

初診時または初回入院時の軀幹の硬化、指尖癩痕、指尖潰瘍、食道機能不全および肺線維症の有無と抗 topo I 抗体価を検討した (表 2)。有意差は認めないものの軀幹に硬化のある症例で抗体価が高い傾向にあった。また、抗体価の低い症例で有意に胸部単純レントゲンまたは胸部 CT 上で肺線維症を認める割合が高かった。これは、抗体価の低い症例で発症から初診までの期間が長い傾向にあり、そのために肺線維症が明らかとなった症例が多いことによる可能性があると思われた。

2) mRodnan TSS と抗 topo I 抗体価

皮膚硬化の国際的な指標である mRodnan TSS と抗 topo I 抗体価を検討した。症例の経過観察中に初めて測定した mRodnan TSS と mRodnan TSS 計測時より 6 ヶ月以内で計測時に最も近い抗 topo I 抗体価の間に有意な正の相関を認めた (図 1a)。また、同様に観察期間中の mRodnan TSS の最高値と抗 topo I 抗体価の最高値の間にも有意な正の相関を認めた (図 1b)。このことから、抗 topo I 抗体の抗体価は皮膚硬化の程度と相関があることがわかった。

続いて、観察期間中の抗 topo I 抗体の抗体価の最高値を一定の値以上と以下で分けて比較した場合、mRodnan TSS の値に有意差が生じるかを検討した。抗体価の最高値を 60 以上の症例と 60 未満の症例に分けたところ、抗体価の最高値が 60 以上の症例で mRodnan TSS の最高値の平均は 31.1 であり、抗体価が 60 以下の症例の 14.3 と比較して有意に高値だった (表 3)。また mRodnan TSS の最高値が 30 を越える症例の割合も有意に高かった (表 3)。このことから抗 topo I 抗体価と皮膚硬化の程度に相関があり、加えて抗 topo I 抗体価が 60 を越えた症例では皮膚硬化の程度や範囲がより重症になりやすい可能性があると思われた。

3) 肺機能と抗 topo I 抗体価

抗 topo I 抗体価と肺機能の関連を調べる目的で、% Vital Capacity (以下%VC) および% diffusing capacity for carbon monoxide (以下%DLco) の観察期間中の 1 年あたりの減少率を 5%以上、5%未満の症例に分けて観察期間中の抗体価の最高値を比較した。両者に明らかな差は認めなかった。

4) 抗 topo I 抗体価の変動と皮膚硬化および肺線維症

抗 topo I 抗体価の変動が、SSc の予後に関与するか検討する目的で、観察期間中に抗体価が 30%以上減少した症例とそうでない症例に分けて mRodnan TSS の最高値および%VC が 1 年あたり 5%以上減少した症例の頻度を比較した (表 4)。mRodnan TSS は、抗体価が 30%以上減少した症例で高い傾向にあった。これは、抗体価の減少例では抗体価の絶対値が高い傾向にあったためと考えられた。一方、抗体価の減少率が 30%以上の症例で%VC が 1

年あたり 5%以上減少した症例の頻度が高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。

D. 考案

抗 topo I 抗体は、SSc に認められる代表的な自己抗体の一つで疾患特異性が高く、診断的価値を有する。皮膚硬化の広汎な重症型の SSc 患者の一群に高頻度に認められ、本抗体陽性患者では、肺線維症や微少血管障害の発現も高頻度でかつ重症化しやすい^{1,3}。また、本抗体陽性患者では肺線維症による呼吸不全がしばしば死因となる。本抗体は SSc の予後を予測する上で重要な指標であるといえる。一方、本抗体は SSc の発症に先立って陽性となることから強皮症発症を予測する上で重要である。レイノー病の患者においても、抗 topo I 抗体を有する患者群で将来的に SSc を発症する割合が高いと報告されており⁷、本抗体が陽性であった場合、その時点で SSc の症状が明らかで無くとも皮膚硬化や SSc の内臓病変の出現に注意しながら、経過を追う必要がある。

抗 topo I 抗体の存在が強皮症の発症および強皮症患者の臓器障害出現や重症化の予測に有用であることに異論の余地はない。今回の私たちの検討において、皮膚硬化の重症度と本抗体の抗体価が相関関係を認めたこと、また、他施設においても本抗体の抗体価が疾患の重症度や活動性と並行したとの報告があり^{3,5}、抗体産生が SSc の病態に何らかの役割を演じているという仮説を支持するものと思われる。topo I は、2 本鎖 DNA の一方の鎖を切断し螺旋構造を弛緩させる酵素であり、DNA 複製や修復、転写の過程で重要な役割を果たしている。topo I と病的線維化の因果関係について、膠原線維の遺伝子に topo I が認識して切断する DNA の特定の塩基配列が多く含ま

れることから、本抗体の存在により膠原線維の遺伝子の転写活性が増強する可能性が考えられている⁸。しかし、SSc 血清中の抗 topo I 抗体の多くは、topo I の活性部位に結合して酵素活性を高めるのではなくその活性を阻害する。また、抗体は細胞膜を通過できないことから、抗体の産生が SSc 発症のトリガーとなるとは考えにくい。抗 topo I 抗体が実際に SSc の発症や病態にどのように関与するについては明確なことは分かっていないのが現状である。

抗 topo I 抗体価の変動が、SSc のその後の臨床症状に関与するとの報告があるが^{4,6}、私たちの検討においても、有意差は認めなかったもの抗体価の減少率の高い症例で%VCが1年あたり 5%以上減少した症例の頻度が高い傾向にあった。このことは、本抗体の抗体価の変動が、疾患活動性予後を左右する肺病変の活動性を判断する有用な指標となり得る可能性を示す。また、抗 topo I 抗体は重症型の SSc に高率に認められる反面、抗 topo I 抗体陽性であっても皮膚硬化が軽微な症例をときに経験する。今回の私たちの検討において皮膚硬化の比較的軽度な症例では本抗体の抗体価も低値であった。抗 topo I 抗体陽性患者の中でも、比較的軽症で予後良好であるか、それとも重症化するかを予測する手段として抗体価の測定が有用である可能性が示唆された。以上により抗 topo I 抗体の抗体価は、疾患活動性の判定や予後の予測において臨床的意義があると考えた。

E. 結論

ELISA 法を用いて測定した抗 topo I 抗体の抗体価と mRodnan TSS に有意な相関が見られた。本抗体価が SSc 患者の皮膚硬化の指標と

なる可能性が示唆された。

F. 文献

1. 秋元幸子, 安部正敏, 田村敦志, 大西一徳, 石川 治. 日本皮膚科学会雑誌. 2001, 111: 827-836.
2. Steen VD, Powell DL, Medsger TA Jr: Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1988, 31: 196-203.
3. Weiner ES, Earnshaw WC, Senecal JL, Bordwell B, Johnson P, Rothfield NF: Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients. *Arthritis Rheum.* 1988, 31: 378-85.
4. Hildebrandt S, Jackh G, Weber S, Peter HH: A long-term longitudinal isotypic study of anti-topoisomerase I autoantibodies. *Rheumatol Int.* 1993, 12: 231-4.
5. Sato S, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K: Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels determined by ELISA in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2001, 40: 1135-40.
6. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T: Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000, 43: 1074-84.
7. Weiner ES, Hildebrandt S, Senecal JL, Daniels L, Noell S, Joyal F, Roussin A, Earnshaw W, Rothfield NF: Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's

disease. A prospective study. *Arthritis Rheum* 1991, 34: 68-77.

8. Douvas A. Does Scl-70 modulate collagen production in scleroderma? *Lancet* 1988, ii: 475-477.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
第 102 回日本皮膚科学会総会で発表予定

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表1. 臨床像と疾患修飾薬の使用

性別	: 男性3例、女性18例 計21例	
年齢		
初診時(平均±SD)	: 23.9~72.6歳	(49.9 ± 14.5)
発症時(平均±SD)	: 21.3~68.2歳	(48.0 ± 14.1)
発症から初診までの期間		
	: 1.4~184.4ヶ月	(30.0 ± 41.8)
疾患修飾薬	: 21例中16例	
プレドニゾン単独		3/21例
ベタメタゾン単独		1/21例
プレドニゾン + シクロフォスファミド		4/21例
プレドニゾン + ブシラミン		4/21例
プレドニゾン + サラソスルファピリジン		1/21例
プレドニゾン + メトトレキサート		1/21例
プレドニゾン + シクロホスファミド + ブシラミン		2/21例

表2. 臨床像と抗topo I 抗体抗体価

	所見あり (%)	抗topo I 抗体抗体価(平均±SD)		p
		所見あり	所見なし	
躯幹の硬化	8/21 (38)	89.8 ± 31.0	65.0 ± 27.0	0.09
指尖癬痕	9/21 (43)	84.8 ± 36.2	74.7 ± 38.7	0.62
指尖潰瘍	3/21 (14)	81.0 ± 35.0	79.1 ± 33.7	0.93
食道機能不全	12/21 (57)	82.1 ± 35.4	74.7 ± 30.3	0.48
肺線維症	15/21 (72)	73.6 ± 34.4	101.0 ± 13.0	0.026

表3. mRodnan TSS と抗topo I 抗体抗体価

	抗topo I ≥ 60 (n=11)	抗topo I < 60 (n=5)	P
年齢(初診)(平均±SD)	46.7 ± 15.5	53.4 ± 13.8	0.43
年齢(TSS測定時)(平均±SD)	48.9 ± 15.6	55.8 ± 12.9	0.40
発病から初回TSS測定までの 期間(月)(平均±SD)	28.8 ± 41.5	25.7 ± 15.7	0.33
TSS	27.3 ± 12.7	14.0 ± 12.4	0.06
	抗topo I MAX ≥ 60 (n=13)	抗topo I MAX < 60 (n=7)	P
年齢(初診)(平均±SD)	47.5 ± 14.5	52.5 ± 11.5	0.45
年齢(TSS測定時)(平均±SD)	51.1 ± 15.0	56.2 ± 9.2	0.71
発病からTSS測定までの 期間(月)(平均±SD)	40.2 ± 36.9	51.0 ± 26.7	0.26
TSS MAX	31.1 ± 12.8	14.3 ± 11.0	0.02
TSS MAX > 30 (%)	9 (69)	1 (14)	0.006

表4. mRodnan TSS と抗topo I 抗体抗体価の変動

抗 topo I 抗体 抗体価	減少率 \geq 30% (n=6)	減少率<30% (n=15)	P
発病から初診までの 期間(月)(平均 \pm SD)	10.4 \pm 11.6	15.2 \pm 22.2	0.62
抗topo I 観察期間	59.6 \pm 25.7	47.8 \pm 25.7	0.37
抗topo I 初診時(平均 \pm SD)	71.1 \pm 38.1	77.2 \pm 37.3	0.72
抗topo I MAX (平均 \pm SD)	69.1 \pm 42.4	111.8 \pm 50.4	0.087
TSS MAX (U/ml)	21.4 \pm 13.9	29.1 \pm 13.7	0.18
%VC 5%以上の減少あり(%)	33.3	57.1	0.31

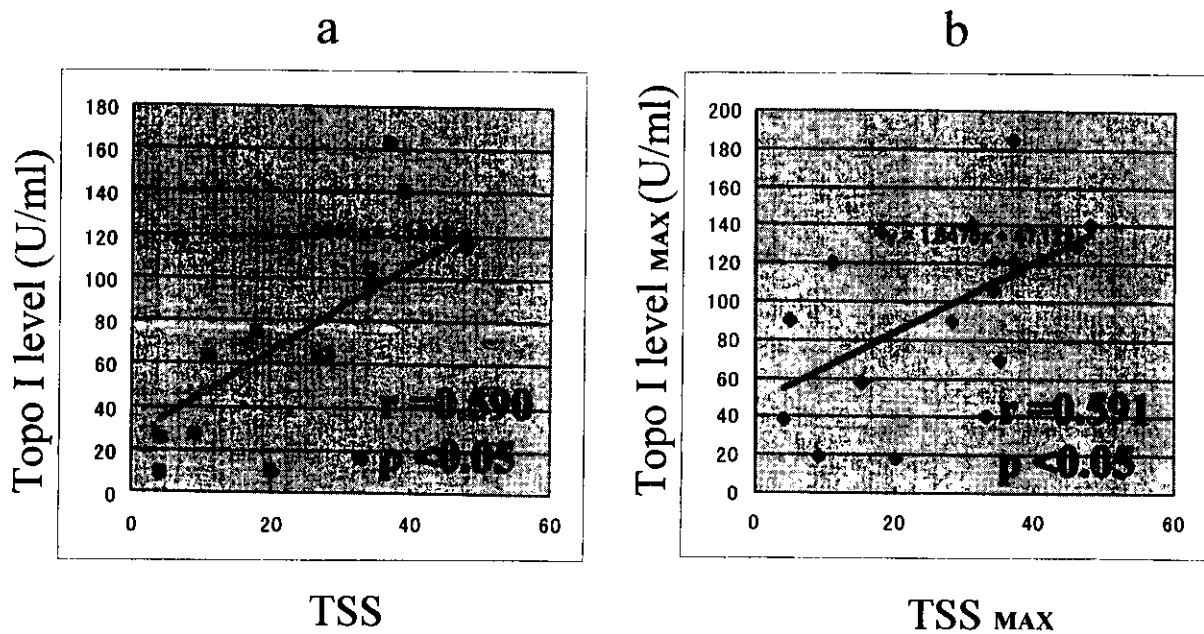


図1 mRodnan TSS と抗 topo I 抗体抗体価 (a) および mRodnan TSS の最高値と抗 topo I 抗体抗体価の最高値 (b) の相関関係。

全身性強皮症における抗トポイソメラーゼ II α抗体

分担研究者 佐藤伸一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
協力者 早川郁子 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

全身性強皮症患者の血清中の抗トポイソメラーゼ II α抗体を ELISA にて測定した。強皮症患者において IgG 型抗トポイソメラーゼ II α抗体価は健常人に比べて有意に上昇し、IgG 型抗トポイソメラーゼ II α抗体は 13%に陽性であった。抗トポイソメラーゼ II α抗体陽性患者では肺活量や肺拡散能が有意に低下し、血清中の IL-12 や赤沈、CRP は有意に上昇していた。抗トポイソメラーゼ II α抗体は肺病変の有無に関連している可能性が考えられた。

A. 研究目的

トポイソメラーゼは転写や複製の際に障害となる DNA の捻れや絡まりを、DNA 鎖の切断と再結合によって修正する酵素で、切断される DNA 鎖が 1 本鎖のみであるか、2 本鎖であるかによってそれぞれ I 型、II 型のトポイソメラーゼに分類される¹。さらにトポイソメラーゼ II には 2 つの形態が存在し、170 kD α isoform と、180 kD β isoform に分けられる。抗トポイソメラーゼ I 抗体（抗トポ I 抗体）が全身性強皮症（SSc）で特異的に認められるのに対し、抗トポイソメラーゼ II α 抗体（抗トポ II α 抗体）は特発性肺線維症²、SSc³、インスリン依存性糖尿病⁴、若年性関節リウマチ⁵、全身性エリテマトーデス^{6,7} など様々な自己免疫性疾患で検出されている。これまでに、特発性肺線維症患者では約 1/3 に抗ト

ポ II α 抗体が検出され²、SSc 患者においては 21%に認められた³と報告されている。そこで日本人 SSc における抗トポ II α 抗体の有無、臨床症状および検査所見との相関が見られるかどうかについて検討した。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象患者は SSc 103 例（女性 92 例、男性 11 例）であり、年齢は 51±16 歳（10-77 歳）であった。病型別では limited cutaneous SSc（ISSc）が 65 例、diffuse cutaneous SSc（dSSc）が 38 例であった。

2) ELISA

トポ II α に対する自己抗体は ELISA 法にて検出した。96 穴のマイクロタイタープレートに 1 μg/ml の精製ヒトトポ II α（TopoGen,