

成ペプチドを抗原として用いたELISAによって確認された。

(3) 免疫組織化学：肺組織としてホルマリン固定肺組織を用いた。組織切片の抗原性賦活化操作は脱パラフィン後、0.1Mクエン酸ナトリウム水溶液を用いてマイクロウェーブ照射／過熱処理を18分間行った。1次抗体として50倍希釈したポリクローナル抗PGI₂-S抗体を反応させた。それ以降の操作はrabbit ImmunoCruz™ Staining Systemを用いてキットのプロトコールに基づいて行った。陰性コントロールとしてはPGI₂-S合成ペプチド免疫前のウサギ血清を50倍希釈にて用いた。

(4) PGI₂-S発現の評価：肺動脈EC表面上のPGI₂-S陽性発現率は肺動脈の直径サイズにより500 μm以上をlarge、100～500 μmをmedium、100 μm以下をsmallと3分類し、各々のサイズで評価し、下記のごとく算出した。

PGI₂-S陽性発現率(%)=陽性血管数／測定した全血管数×100

C. 研究結果

(1) 組織学的所見：正常肺組織でのPGI₂-S発現を検討した病理組織像をFigure 1に示す。aは抗PGI₂-S抗体を1次抗体として反応させたもので、矢印に示すように中動脈レベルのEC表面上が褐色調に染色された。一方、bに示すのは陰性コントロールとして免疫前ウサギ血清を用いたが、同血管のEC表面上は染色されなかった。Figure 2にMCTD症例のPGI₂-S陽性発現例を示す。正常肺組織と同様に矢印に示すようにEC表面上が褐色調に染色された。

(2) 肺動脈EC表面上のPGI₂-S陽性発現率 (Table 2)：正常例、膠原病症例の両方において動脈径の小さいもの程、PGI₂-S発現率が低い傾向にあった。SLEの2症例で特に発現率が低い傾向を示した。膠原病症例のconcentric lesions、plexiform lesionsに一致する肺動脈では、PGI₂-S発現を認めなかった (Figure 3)。

SLEの1例でPGI₂-S発現の著しい低下を認めたが、膠原病全体としては正常例と比較して有意なPGI₂-S発現低下を認めなかった (Figure 4)。

PGI₂-S発現率は正常例(n=3：small 42.1 ± 8.4%、medium 70.8 ± 26.0%、large 84.7 ± 16.8%)に対してMCTD症例(n=2：small 54.4 ± 6.2%、medium 66.2 ± 4.3%、large 100%)、膠原病全体(n=6：small 47.1

±12.4%、medium 62.1 ± 17.7%、large 88.3 ± 16.2%)であり、特にMCTD症例の小動脈レベルで正常例と比較し、統計学的有意差は認めなかったもののPGI₂-S発現が増強している傾向を認めた (Figure 4)。

D. 考案

膠原病合併PHはPPHと組織学的、病態生理学的に類似していると言われている。近年、PPHの免疫組織化学において小中動脈レベルで正常肺組織と比較し、有意にPGI₂-S発現の低下を認めることが報告され、PPHの発症・進展にEC表面上のPGI₂-S発現の低下、PGI₂-S産生低下が関連している可能性が示唆されている¹⁾。PPHにおいてはプロスタサイクリン持続投与が保険適応となり、QOLや生存率の改善等の効果が確率されている⁵⁾。しかし、膠原病合併PHにおいてはプロスタサイクリン投与の有用性が一定せず、治療効果はPPHに比較し若干劣っている傾向にある⁶⁾。また、膠原病合併PHの場合、ステロイド薬等の免疫抑制療法の有効性が報告されており、発症誘因として免疫学的関与も示唆され^{7,8)}、PPHとは発症・進展の過程が異なる可能性も考えられる。そこで我々は、膠原病合併PHにおけるEC表面上のPGI₂-S発現について検討した。

膠原病合併PHにおいてはPPH症例で報告されているような、EC表面上の有意なPGI₂-S発現の低下は認めず、むしろ、小動脈レベルの血管ではPGI₂-S発現が亢進している傾向がみられた。この現象については、プロスタサイクリン必要量増加に伴い、PGI₂-S発現が亢進しており、PPHの病態とは異なる可能性が示唆された。

また、SLE 2例においては、比較的若年発症であり、小動脈レベルでのPGI₂-S発現が著明に低下しておりPPHに似た病態である可能性も考えられた。

膠原病各疾患でPGI₂-S発現に若干ばらつきがみられたが、全体としてはEC表面上の有意なPGI₂-S発現の低下は認めなかったため、PH発症誘因として膠原病に起因する免疫学的関与等の更なる検討が必要であると思われる。

文献

1. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, et al: Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1925-32, 1999
2. Humbert M, Sanchez O, Fartoukh M, et al: Short-term and long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in pulmonary hypertension secondary to connective tissue disease: results of a pilot study. *Eur Respir J* 13:1351-56, 1999
3. Sanchez O, Humbert M, Sitbon O, et al: Treatment of pulmonary hypertension secondary to connective tissue diseases. *Thorax* 54:273-7, 1999
4. Dahi M, Chalmers A, Wade J, et al: Ten year survival of a patient with advanced pulmonary hypertension and mixed connective tissue disease treated with immunosuppressive therapy. *J Rheumatol* 19:1807-9, 1992
5. Mc Laughlin VV, Genthner DE, Panella, et al: Reduction in pulmonary vascular resistance with long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 338:273-7, 1998
6. Sitbon O, Humbert M, Sanchez O, et al: Survival in pulmonary hypertension associated with connective tissue disease (PH-CTD) treated long-term epoprostenol (PGI₂): comparison with primary pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Crit Care* 159:A158, 1999
7. Yoshio T, Masuyama J, Sumiya M, et al: Antiendothelial cell antibodies and their relation to pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 21:2058-63, 1994
8. Nishimaki T, Aotsuka S, Kondo H, et al: Immunological analysis of pulmonary hypertension in connective tissue diseases. *J Rheumatol* 26:2357-62, 1999

Patient	Sex/age	Diagnosis	sPAP	Treatment	Procedure
1	F/48	MCTD	84	PSL, Azathioprine, Oxygen	Autopsy
2	F/60	MCTD	NA	PSL, Nifedipine	Autopsy
3	F/29	SLE	114*	PSL, Warfarin, Oxygen, Cyclophosphamide	Autopsy
4	F/29	SLE	68	PSL, Warfarin, Oxygen, PGE ₁	Autopsy
5	M/63	SSc	110*	PSL, Oxygen	Autopsy
6	M/45	PM	75	PSL, Warfarin, Oxygen, Cyclophosphamide	Autopsy

Table 1. Clinical data of patients with PH

F=female ; M=male ; MCTD=mixed connective tissue disease ; SLE=systemic lupus erythematosus ; SSc =systemic sclerosis ; PM= polymyositis ; sPAP =systolic pulmonary artery pressure by echocardiogram pressure estimate. ; NA=not available ; PSL= Prednisolone ; PGE₁=prostaglandin E₁ ; *right heart catheterization

patient	Pulmonary Arteries			Concentric Lesions	Plexiform Lesions
	Small	Medium	Large		
1(MCTD)	7/14(50)	12/19(63)	3/3(100)	0/4	0/0
2(MCTD)	10/17(59)	9/13(69)	6/6(100)	0/1	0/0
3(SLE)	8/29(28)	9/29(31)	6/8(75)	0/10	0/2
4(SLE)	4/11(36)	7/9(78)	0/0	0/3	0/0
5(SSc)	10/19(53)	7/13(54)	2/2(100)	0/1	0/0
6(PM)	12/21(57)	17/22(77)	2/3(67)	0/2	0/0

Table 2. Summary of PGI₂-S expression in plumunary hypertension associated with connective tissue diseases

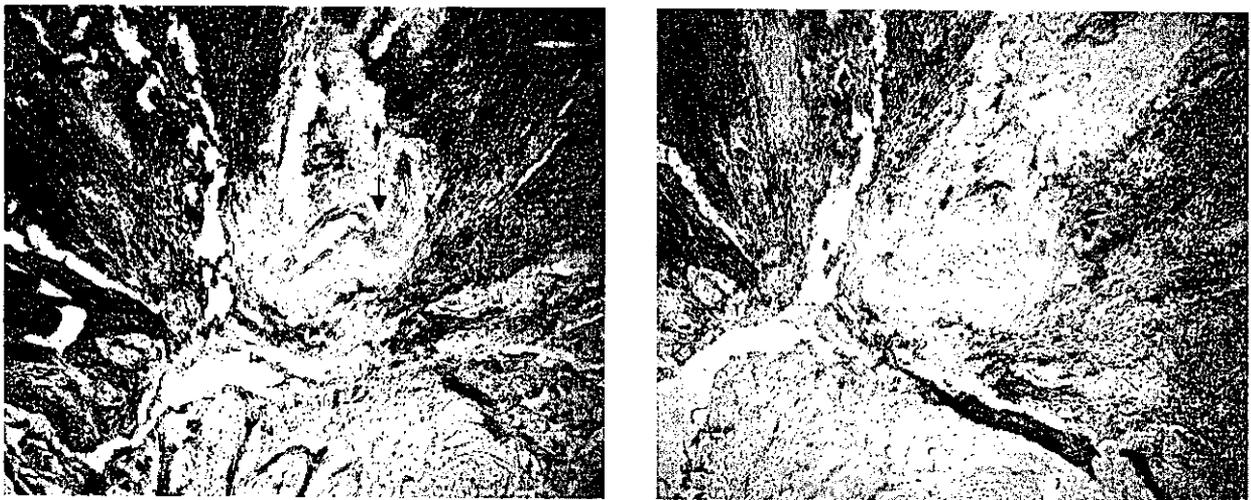


Figure 1. PGI₂-S expression in normal lung vessels

(a)Note expression of PGI₂-S in a medium-sized pulmonary artery (arrow).

(The patient with normal lung tissue; original magnification × 100.)

(b)The normal rabbit serum control of the same lesion shown in (a)

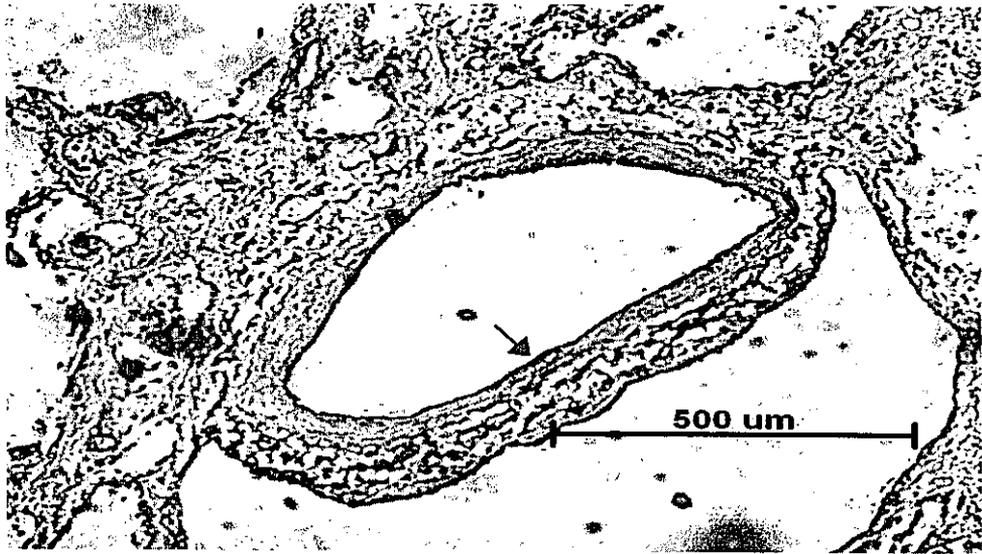


Figure 2. PGI₂-S immunostaining (arrow) of a large-sized pulmonary artery.
(Patient 2: MCTD)



Figure 3. The concentric lesion (arrow) exhibits no PGI₂-S immunoreactivity.
(Patient 3: SLE)

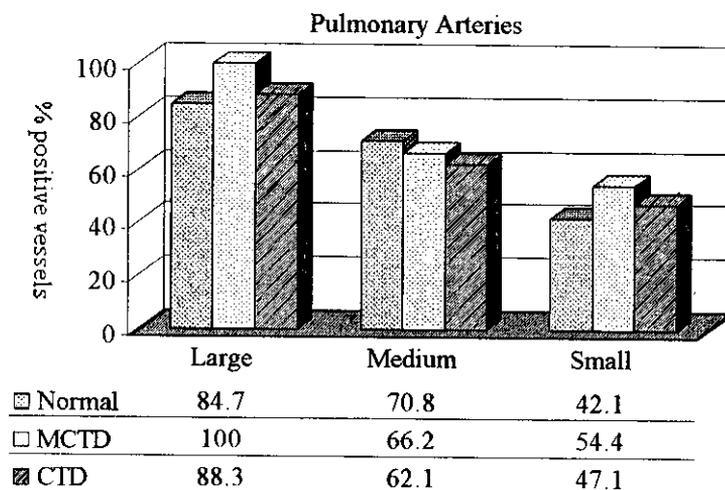


Figure 4. 正常肺 3 例の PGI₂-S 発現率平均値と膠原病関連(CTD)PH 6 例、MCTD 2 例のみの PGI₂-S 発現率平均値。

EXPRESSION OF PROSTACYCLIN SYNTHASE IN LUNGS OF PATIENTS WITH COLLAGEN-DISEASE-RELATED PULMONARY HYPERTENSION

Taku Yoshio¹⁾, Hiroyuki Nara¹⁾, Seiji Minota¹⁾, Yuji Sakuma²⁾, and Saito Ken²⁾

Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Department of Medicine¹⁾,
And Department of Pathology²⁾, Jichi Medical School

We examined expression of prostacyclin synthase (PGI₂-S) in the lungs of patients with collagen-disease-related pulmonary hypertension (CPH) using immunohistochemistry. Paraffin-embedded lung tissue samples were obtained from autopsy of 6 patients with CPH (2 MCTD, 2 SLE, 1 SSc and 1 PM) and 3 patients with primary lung cancer without PH as normal controls. PGI₂-S immunolocalization was detected by a polyclonal rabbit anti-PGI₂-S antibody. In normal lungs, larger (more proximal) pulmonary arteries expressed PGI₂-S than did smaller arteries (PGI₂-S expression in 42.1% of small, 70.8% of medium and 84.7% of large pulmonary arteries). The number of pulmonary arteries expressing PGI₂-S in the lungs of 6 patients was not significantly different from that in normal lungs, although the lung of 1 SLE exhibited a marked reduction in PGI₂-S expression. On the contrary the lungs of 2 MCTD exhibited an increased number of small-sized pulmonary arteries expressing PGI₂-S. Vessels with concentric and plexiform lesions showed complete lack of PGI₂-S expression. These results differed from those in primary PH except for concentric and plexiform lesions. The loss of PGI₂-S expression may not largely related to the pathogenesis and development of CPH.

14. 肺高血圧症におけるプロスタグランジン (PG) の役割

分担研究者：北里英郎

所属施設：北里大学医学部・微生物

研究要旨

既に当研究室においてレトロウイルスベクターを用いて作成したヒトプロスタグランジンD合成酵素 (PGDS) 発現マウス線維芽細胞株 (C57-PGDS) をモノクロタリン誘発肺高血圧症ラットに、尾静脈から導入し、その効果を検討した。コントロールとしては、insert gene を含まないレトロウイルスを感染させたマウス線維芽細胞 (C57-EV) を用い、同様に導入した。モノクロタリン投与後、19日目にラットから肺を摘出し、RT-PCR法によりPGDSの発現を確認した結果PGDS-C57導入ラットにおいて顕著な発現を認めた。また、モノクロタリン誘発群では対照である生理食塩水投与群と比較してやや体重の減傾向が見られた。右心室圧および右心室の湿重量は、モノクロタリン投与群のEV-C57導入群で顕著に増加したが、PGDS-C57導入群でその増加は、生理食塩水投与群のレベルまで減少した。

これら *in vivo* での結果から、その作用機序を明らかにするために、ヒト肺動脈由来血管内皮細胞 (HPAEC) に PGD₂ の産生物 PGD₂ の非酵素的代謝物、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ を添加し、血管の収縮に関与しているエンドセリン受容体 A の発現への影響を検討したところ、濃度依存的に抑制することが分かった。

以上のことから、モノクロタリン誘発肺高血圧症ラットにおける PGDS 導入による抑制効果は、エンドセリン受容体 A の発現抑制が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

混合性組織結合病 (MCTD) における重篤な疾患である肺高血圧症に関するプロスタグランジン (PG) の役割を動物モデルにより明らかにする。

B. 研究方法

プロスタグランジンD合成酵素 (PGDS) 産生マウス線維芽細胞、C57-PGDS は、以下のように作成した。レトロウイルスベクター、pLXSN (クローンテック社) にヒト PGDS cDNA をクローンし、パッケージング細胞、PT67 にトランスフェクションし、一度限りの感染性を有する、組み換えレトロウイルス、pLXSN-PGDS を得た。このウイルスをマウス線維芽細胞、C57 に感染させ、PGDS を産生する細胞、C57-PGDS を作成した。その代謝物である PGD₂ の恒常的な産生

量は、エライザ法により確認し、334 pg/ml であった。また、コントロールとしては、レトロウイルスベクター、pLXSN を導入した細胞、C57-EV を作成した。我々は、既に、ブレオマイシン誘発マウス肺線維症に同様な cell therapy を行い、b-FGF を抑制することにより、肺線維症を改善した (1)。また、同様に作成した、C57-IL10 をマウス尿酸結晶誘発性炎症モデルに応用した結果、ケモカイン KC の発現を抑制することにより、抗炎症効果を確認した (2)。

モノクロタリン誘発ラット肺高血圧モデルは、文献 (3) に従い以下のように作成した。SD 系 6 週齢雄性ラットの頸部に、モノクロタリン 60 mg/kg を単回皮下注射し、実験的に肺高血圧症を惹起した。同日に、上記の C57-PGDS、 2.5×10^6 個を尾静脈より投与した。対照としては、C57-EV を同数個、尾静脈より投与した。モノクロタリン投与後、3 週間後に、バンドバルビター

ル麻酔・人工呼吸器装置化で、全身動脈圧および右心室圧をパワーラプシステムにより測定した。また、肺を摘出し、PGDS の発現をRT-PCR法により確認した。

動物モデルでの結果を反映するために、ヒト肺動脈由来細胞、HPAECにPGD₂の非酵素的代謝物である、15-deoxy- Δ^{12} , 14-PGJ₂を添加し、エンドセリン受容体の発現の変化をRT-PCR法にて確認した。

C. 研究結果

C57-PGDS 導入ラットの肺における PGDS の発現

モノクロタリン投与後、19日目の肺を摘出し、PGDS mRNA量をRT-PCR法にて確認した。その結果、Fig.1に示すよう、C57-PGDS 導入ラットの肺では、顕著なPGDS mRNAが確認されたが、C57-EV 導入ラットにおいては確認されなかった。

モノクロタリン誘導肺高血圧ラットにおける体重変化

モノクロタリン投与後、19日目の体重変化を、Fig.2に示した。その結果、モノクロタリン投与ラット群(C57-PGDS, C57-EV 導入群)は、非投与群(生理食塩水投与群)に比べ、やや体重が減少したが、有意差は見られなかった。また、モノクロタリン投与群内でも、有意差は見られなかった。

モノクロタリン誘導肺高血圧ラットにおける血液検査所見

モノクロタリン投与後、19日目のラットの赤血球、白血球、ヘマトクリット、ヘモグロビン濃度、血漿中蛋白量を測定し、Table 1に示した。対照として、生理食塩水を投与したラットを用いた。その結果、モノクロタリンを投与し、C57-PGDS あるいは C57-EV を導入したラットにおける血液検査所見は、対照である生理食塩水投与ラットと比較して差は認められず、細胞導入による影響は少ないと考えられた。

モノクロタリン誘導肺高血圧ラットにおける全身血圧および心拍数の測定

モノクロタリン投与後、19日目の全身血圧および心拍数をモノクロタリン誘導肺高血圧ラット群と対照である生理食塩水投与ラット群で比較し、Fig.3に示した。その結果、モノクロタリン投与群で対照と比較して、やや全身血圧が低い傾向が見られたが、有意差は認められなかった。また、モノクロタリン投与群において、C57-PGDS, C57-EV 導入群の間に、全身血圧、心拍

数ともに有意差は、見られなかった。

モノクロタリン誘導肺高血圧ラットにおける右心室圧の測定

モノクロタリン投与ラット群および対照である生理食塩水投与群において、Fig. 4に示すように右心室圧を測定した。その結果、生理食塩水投与群における、右心室圧は、約20mmHgで、モノクロタリン投与、C57-EV 導入ラット群では、約35mmHgに上昇し、肺高血圧症を誘発していることを確認した。一方、モノクロタリン投与C57-PGDS 導入ラットでは、上昇した血圧は、対照のレベルまで、有意に低下した。

モノクロタリン誘導肺高血圧ラットにおける右心室の湿重量の測定

Fig.5に示すよう、モノクロタリン投与後、19日目の肺、心臓、右心室の湿重量を生理食塩水投与群、モノクロタリン投与群で測定した。

肺においては、モノクロタリン投与群で、生理食塩水投与群と比較して、湿重量が有意に増加した。その中で、C57-PGDS 導入群が、C57-EV 投与群と比較して、湿重量がやや低下する傾向が見られたが、有意差は見られなかった。

心臓においても、モノクロタリン投与群のC57-EV 導入群で湿重量がやや上昇し、C57-PGDS 群でその増加が軽減する傾向が見られたが有意差はみられなかった。しかしながら、右心室の湿重量のみを測定すると、C57-PGDS 導入により、有意に軽減された。

ヒト肺動脈由来血管内皮細胞 (HPAEC) における 15-deoxy- Δ^{12} , 14-PGJ₂ 刺激に伴うエンドセリン受容体の発現量の変化

モノクロタリン誘導肺高血圧症ラットにおける結果を解析するために、in vitroにおいて、実験を行った。その結果、Fig.6に示すように15-deoxy- Δ^{12} , 14-PGJ₂は、用量依存的にエンドセリンA 受容体のmRNAを抑制することが分かった。

D. 考察

PGDSをレトロウイルスにより強制発現させたマウス線維芽細胞をモノクロタリン誘導肺高血圧症ラットの尾静脈から投与するいわゆる、cell therapyを行った結果、有意に肺高血圧症を改善した。In vitroのデータからその作用機序は、血管収縮に大きく関与している、エンドセリン受容体 A (4) の発現がPGDSの産物であるPGD₂の非酵素的代謝物である15-deoxy- Δ^{12} , 14-

PGI₂により抑制されたことが考えられた。従来では、エンドセリンレセプターA拮抗剤(5)やプロスタグランジンI₂(6)が肺高血圧症に対する治療に使用されてきたが、非常に高価であることや、不安定であることが大きな問題とされてきた。今回の、PGDSによるラット肺高血圧モデルにおけるcell therapyの結果は、肺高血圧症での遺伝子治療の可能性を示すものであり、今後、その詳細を検討してゆきたい。

文献

1. Retrovirally introduced prostaglandin D₂ synthase suppress lung injury induced by bleomycin. Ando, M, Murakami, Y, Kojima, F, Endo, H, Kitasato, H, Hashimoto, A, Kobayashi, H, Majima, M, Inoue, M, Kondo, H, Kawai, S, Hayashi, I. In press in Am J Respiratory Cell and Molecular Biology

2. Antiinflammatory effect of retrovirally transfected interleukin-10 on mono-sodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation in murine air pouches. Murakami Y, Akahoshi T, Kawai S, Inoue M, Kitasato, H. Arthritis & Rheum., 46(9), 2504-13, 2002.

3. 肺高血圧症に及ぼすステロイド剤の影響に関する組織化学的検討. 吉田俊治, 厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 混合性結合組織病に関する研究班. 平成12年度 研究報告書 23-27, 2001.

4. エンドセリン研究の新しい展開—受容体拮抗薬の臨床応用への展望. 後藤勝年, 宮内 卓, 日薬理誌, 121, 91-101, 2002.

5. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. Rubin, L.J., Badesch, DB, Barst, RJ. et al. N Engl J Med., 346, 896-903, 2002.

6. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Circulation, 106(12), 1477-82, 2002.

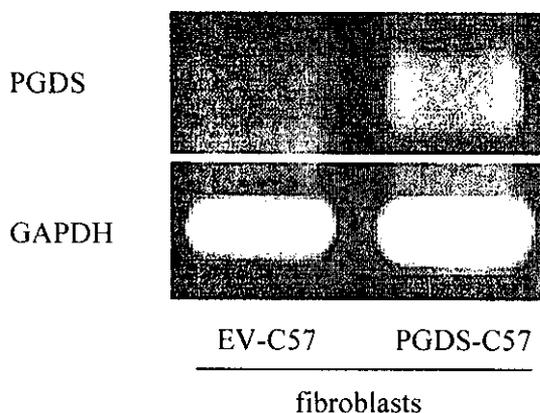


Fig.1 Expression of PGDS mRNA in lung of rat administered retrovirally transfected fibroblasts

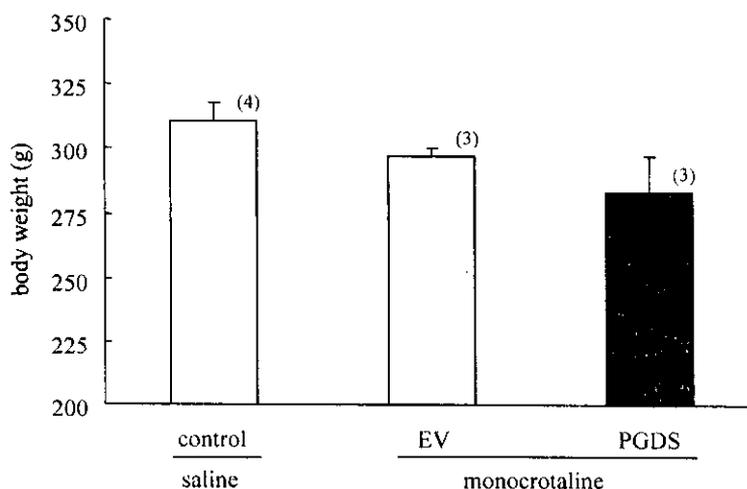


Fig.2 Change in body weight after transfusion of PGDS cDNA-expressing fibroblasts

	RBC (x 10 ⁴ μl)	WBC (x 10 ² μl)	hematocrit (%)	hemoglobin (g/dl)	plasma protein (mg/ml)
control (n=4) (saline)	652 ± 55	46.8 ± 1.6	43.1 ± 2.0	14.4 ± 0.3	55.7 ± 1.32
EV (n=3) (monocrotaline)	655 ± 40	41.7 ± 8.8	43.1 ± 0.5	14.0 ± 0.3	56.4 ± 0.3
PGDS (n=3) (monocrotaline)	580 ± 47	43.5 ± 3.7	42.2 ± 0.7	14.5 ± 0.6	57.7 ± 2.6

(mean ± s.e.m.)

Table 1.

Effects of introduced PGDS cDNA-expressing fibroblasts on RBC, WBC, hematocrit, hemoglobin, and plasma protein in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats

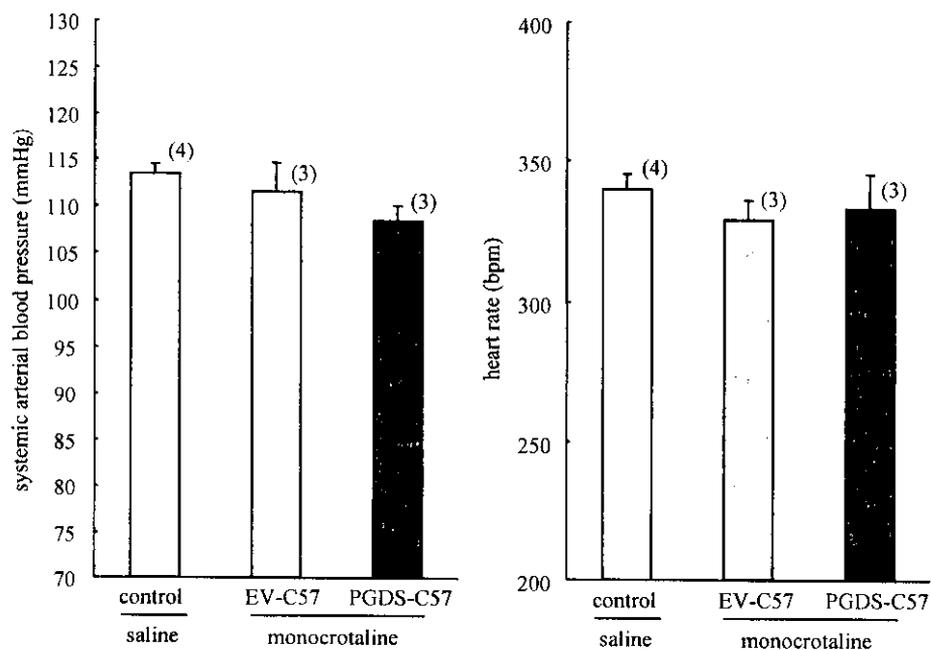


Fig. 3. Effects of introduced PGDS cDNA-expressing fibroblasts on systemic blood pressure and heart rate in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats

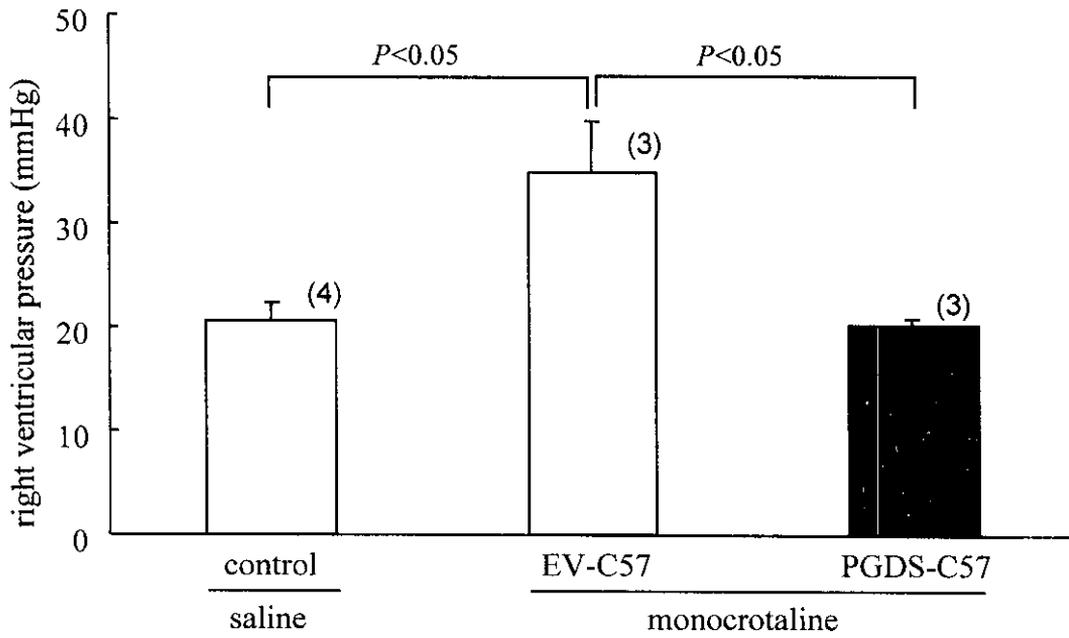


Fig.4 Suppressive effect of PGDS cDNA-expressing fibroblasts on monocrotaline-induced pulmonary hypertension

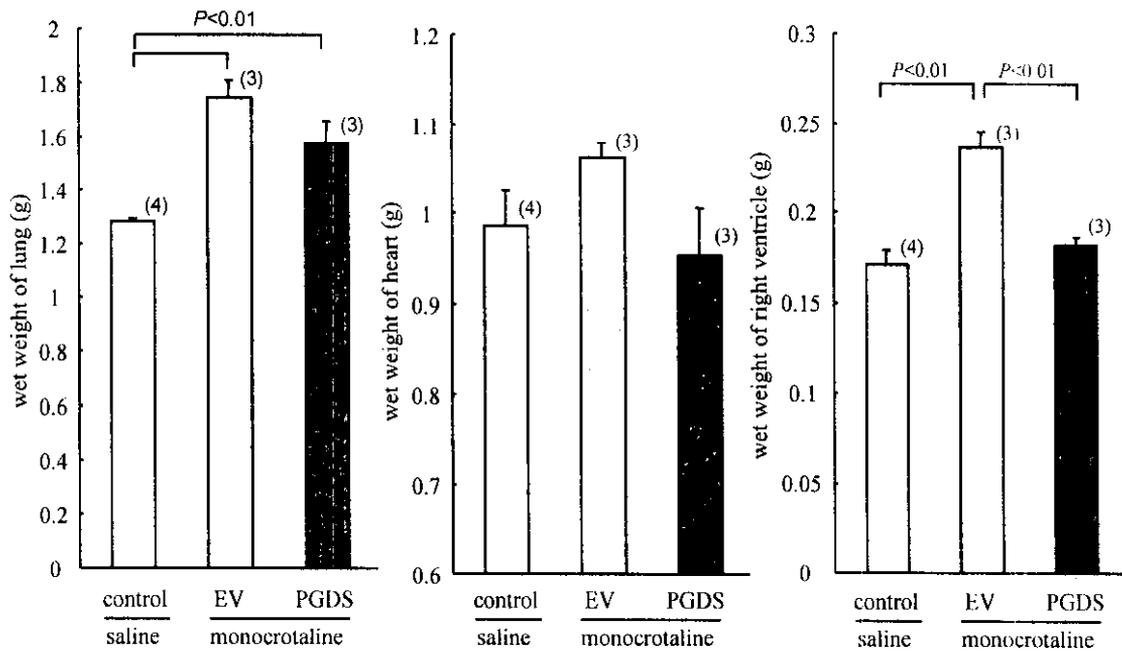


Fig.5 Effects of PGDS cDNA-expressing fibroblasts on weights of lung and heart in monocrotaline-induced pulmonary hypertension

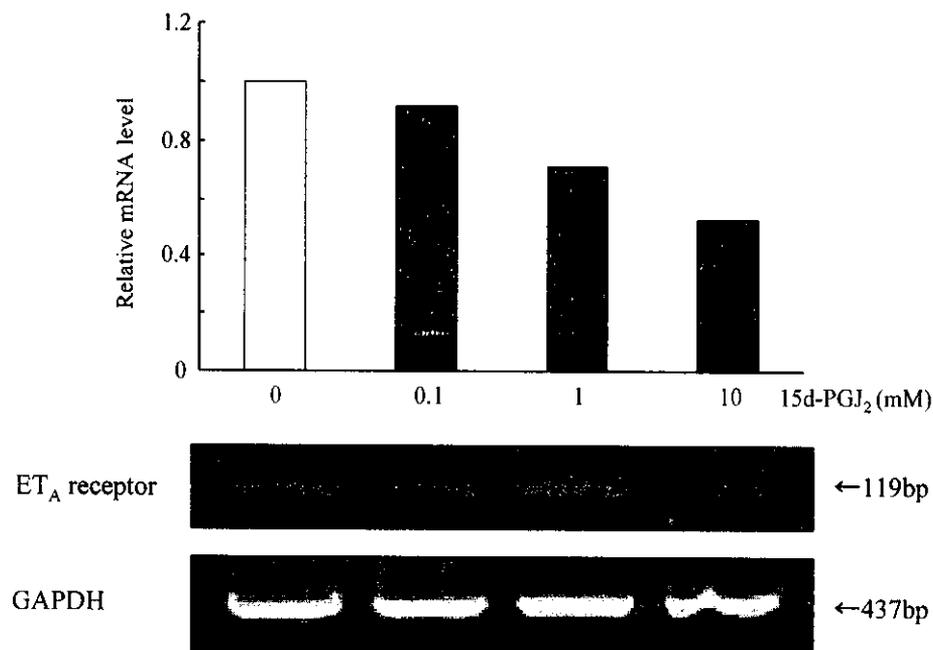


Fig.6. Attenuated expression of endothelin A receptor mRNA by 15d-PGJ₂ in HPAEC

THE ROLE OF PROSTAGLANDIN (PG) IN PULMONARY HYPERTENSION

Hidero Kitasato, Izumi Hayashi, Yousuke Murakami, Hirahito Endo, Jun Okada, Miyuki Ando, Atsushi Hashimoto, Shizuka Kono, Hirobumi Kondo

Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine
 Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine

Mouse fibroblast cells designated PGDS-C57, expressing retrovirally introduced human prostaglandin D synthase (H-PGDS) were introduced via tail vein into monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension (MCT-PH) rats. Other mouse fibroblast cells, EV-C57 expressing only retrovirus vector were also introduced into MCT-PH rats then used as control. The expression of H-PGDS was significantly detected in the lung of MCT induced rats with PGDS-C57, after 19 days of MCT induction. The weight of rats was slightly lower in MCT induced rats in comparison with saline induced rats. The wet weight of right ventricular and right ventricular pressure were significantly increased in MCT induced rats with EV-C57 in comparison with saline induced rats. They were dramatically improved in MCT-PH rats with PGDS-C57, as same level as saline induced rats. In addition, we have also shown that 15d-PGJ₂ which is non enzymatic metabolite from PGD₂ produced by PGDS, inhibited the expression of endothelin receptor A in human endothelial cells derived from lung artery. Our data suggested that the mechanism of remission for MCT-PH rats by PGDS was probably via down regulation of endothelin receptor A.

15. 肺高血圧症を合併した混合性結合組織病患者の臨床免疫学的特徴

分担研究者： 諏訪 昭
研究協力者： 野島崇樹、平形道人
所属施設： 慶應義塾大学医学部内科

研究要旨

肺高血圧症(PH)は混合性結合組織病(MCTD)において重要な予後決定因子として知られている。今回、われわれは心エコーによるPH診断例も含め、MCTDに合併するPHの頻度、臨床免疫学的特徴を、前毛細血管性 (isolated PH:iPH)、心肺疾患に起因する後毛細血管性PH(cpPH)、PH非合併(非PH)の3群に層別化し分析した。結果は、(1) MCTD 297例中、53例(17.8%)にPHを合併し、iPH群:cpPH群が48:5と、iPH群が高頻度であった。(2) 患者背景で、男女比、発症年齢に差はなかった。(3)PHは強皮症を含む重複症候群で高頻度に認められた。一方、他の膠原病基準を満たさない19例ではPH合併は認められなかった。(4) iPH群は非PH群と比較し、前腕を越える皮膚硬化、開口障害、pitting scar、皮膚潰瘍、持続性蛋白尿、下肺野-肺線維症、DLco低下、%VC低下、食道運動低下、貧血、低補体血症、ループスアンチコアグラント、抗リボソーム抗体、抗SS-A抗体、ステロイド投与、PG製剤治療が高頻度であった。(5) iPH群、cpPH群ともに予後不良であった。以上より、PH合併MCTD例の臨床免疫学的特徴が明らかとなった。

A. 研究目的

混合性結合組織病(MCTD)における肺高血圧症(PH)の合併率は他の膠原病に比して高く、重要な予後決定因子として知られている¹⁻⁶⁾。しかし、その頻度、臨床特徴は不明な点も多く、有効な治療法は未だ確立されていない。従来、PHの診断には侵襲を伴う右心カテーテル検査が必要とされてきたが、近年、心エコー法の進歩に伴い、早期診断ならびに多数例の検討が可能となった。そこで、われわれは心エコーによるPH診断例も含め、MCTDに合併するPHの頻度、臨床免疫学的特徴、治療、予後について、前毛細血管性と後毛細血管性に分け履歴的に検討した。

B. 対象及び方法

1. 対象

対象は、1962-2001年に当院内科を初診した膠原病患者2,122例で、その内訳は重複症候群(OL)168例、全身性エリテマトーデス(SLE)628例、強皮症(SSc)298例、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)117例、関節

リウマチ(RA)662例、原発性シェーグレン症候群(SjS)230例とした。そして1996年改訂、診断の手引きに合致するMCTD297例とした。

2. 方法

PHの診断は、(1)心エコー・ドップラー法による肺動脈収縮期圧>30mmHg(2)右心カテーテルで肺動脈平均圧>25mmHg(3)剖検時の組織所見、を用いた。

PH合併MCTD患者を、心、肺、腎疾患に起因しない前毛細血管性PH群(iPH群)と、心、肺、腎疾患に起因する後毛細血管性PH群(cpPH群)に分類し、iPH群、cpPH群、PH非合併群(非PH群)の3群において、臨床症状・検査項目について、 χ^2 検定で検討した。発症年齢、PH診断年齢、観察期間はt検定で検討した。さらに、生命予後をKaplan-Meier法を用いて、各群間における生存率の差をLogrank testで検討した。

3. 倫理面への配慮

主治医によるretrospective studyのため研究対象者に対する不利益や危険性はない。また、得られた調

査票の管理を厳重にし、プライバシーの保護に留意した。

C. 研究結果

1. MCTDにおける膠原病基準満足症例の内訳

MCTD 297例において他の膠原病の診断基準を満足する症例を調べた。278例が他の膠原病診断基準を満足し、その内訳では2つ以上の膠原病が診断されるOLが120例と最も多く、一方、古典的膠原病の診断がつかず、MCTDの基準のみ満たす症例は19例であった。(図1)

2. 膠原病各疾患のPH合併頻度とその背景

膠原病2,122例におけるPH合併は、137例6.5%であった。MCTD 297例のPH合併は53例17.8%で、iPH群:cpPH群が48:5と、iPH群が高頻度であった。(図2)

膠原病各疾患におけるPH合併群の疫学的背景を検討した。MCTDの3群間において、差はみとめなかった。SScではcpPH群がiPH群および非PH群に比し、発症年齢が高かった。(表1)

3. PH合併MCTDにおける膠原病診断基準満足症例の内訳

PH合併MCTD53例における膠原病診断の内訳は、SLE、SSc、PM/DMの診断例において、いずれも21-25%の症例にPH合併していた。MCTDのみの19例ではPH合併は1例もみられなかった。OLの診断にいたる120例では、35例、29%と高率にPHを合併していた。なかでも、強皮症をふくむ3群が約3割にPHを合併していた。(図3)

4. PH合併MCTDにおける臨床特徴と予後

MCTD各群の臨床特徴の比較では、iPH群は非PH群と比較し、前腕を越える皮膚硬化、開口障害、pitting scar、皮膚潰瘍、持続性蛋白尿、下肺野-肺線維症、DLco低下、%VC低下、食道運動低下、貧血、低補体血症、ループスアンチコアグラント、抗リボソーム抗体、抗SS-A抗体、ステロイド投与、PG製剤治療が高頻度であった。(表2, 図4-11)

Kaplan-Meier法による生命表分析では、iPH群の累積生存率は非PH群に比し低く、cpPH群の累積生存率は非PH群に比し低い傾向にあった。(図12)

D. 考察

本研究では、MCTD 297例を、PH合併の2群(前毛

細血管性(iPH群)と後毛細血管性(cpPH群))およびPH非合併群(非PH群)の3群に分類し、臨床免疫学的特徴、治療、予後について、履歴的に検討した。

MCTDのPH合併は17.8%(297例中53例)で、膠原病におけるPH合併6.5%(2,122例137例)と比べ、高頻度であった。OL 45例(26.7%)、SSc 34例(11.4%)と同様、高頻度であることが確認された。PH合併MCTD 53例のうちcpPHは5例と少なく、大多数(48例)がiPHであった。Yamaneらは、125例のSScを対象としたプロスペクティブ研究で、PHの合併率を16%報告しているが、その内訳は、iPH11.2%に対してccPH4.8%であった⁵⁾。MCTDでは肺線維症の合併が45%と高頻度であるにもかかわらず、cpPHの併発が必ずしも多くないという成績が興味深い点であった。

PH合併MCTD53例における膠原病診断の内訳では、OLの診断にいたる120例において、35例、29%と高率にPHを合併していた。なかでも、SScをふくむ3群では約3割にPHを合併していた。一方で、SLE、SSc、PM/DMの単独診断例において、11、13、0%と、MCTD基準のみ満たす19例のなかでPH合併が0例と、頻度が低い点が注目された。こうした成績は、これまでのSScにおけるPHの合併が4.9%-33%と高頻度であるとする報告と一致し、PHの合併とSScの病態が密接にかかわる可能性を示している⁵⁻⁹⁾。そこで、MCTD症例をPH合併の2群と非PH群に分け、その臨床特徴を分析した。iPH群は非PH群と比較し、前腕を越える皮膚硬化、開口障害、pitting scar、皮膚潰瘍、下肺野-肺線維症、DLco低下、%VC低下、食道運動低下、といったSScの特徴的所見が高頻度であることが確認されると同時に、SLEの臨床特徴である持続性蛋白尿、低補体血症、ループスアンチコアグラント、抗リボソーム抗体、抗SS-A抗体陽性頻度が高い点が注目された。これまでに、SLEにおけるPHの危険因子として、レイノー現象、リウマトイド因子、抗リン脂質抗体が指摘されているが¹⁰⁾、MCTD症例では、ループスアンチコアグラントが同様に危険因子となることが示された。

治療歴についての検討での、ステロイド投与、PG製剤治療が高頻度であったが、こうした治療がPHの病態にいかなる影響をおよぼしているかは、今回の研究では検討し得なかった。さらに、生命表分析による予後の検討では、iPH群、cpPH群ともに累積生存率が、非PH群に比し低く、PH合併MCTD例が予後不良であることがあらためて確認された。今後は、PHの自然経過

を詳細に分析し、各治療法が予後を改善するか否かを、プロスペクティブに追求していくことが必要と考えられる。

今回の検討では、MCTD例の抽出にあたり、抗U1-RNP抗体陽性の有無を、従来の二重免疫拡散法(DID)、酵素免疫測定法(ELISA)に加え、高感度のRNA免疫沈降法(RNA-IPP)による検査結果も併せて決定した。このため、従来はMCTDと診断されなかった抗U1-RNP抗体低力価陽性例も抽出された可能性がある。今後、抗U1-RNP抗体高力価陽性例と、低力価陽性例での臨床像の相違について詳細に検討することで、MCTDの診断ならびにPH合併例の背景を追及する新たな知見が得られることを期待したい。

また、MCTD診断の手引きによると、他の疾患標識抗体陽性例では、MCTD診断を慎重に行うとされている。われわれは他の疾患標識抗体が陽性であっても、すべてMCTD 297例に組み込んで今回の検討を進めた。結果として、従来OLと診断された重複現象をもった膠原病症例を含むMCTD/OLにおけるPH合併例の臨床特徴を明らかにすることとなった。他の疾患標識抗体陽性例におけるMCTD診断については、さらに詳細に検討すべき課題と考えられる。

E. 結論

PH合併MCTD例の臨床免疫学的特徴が明らかとなった。

文 献

1. Sullivan WD, Hurst DJ, Harmon CE, et al. :A prospective evaluation emphasizing pulmonary involvement in patients with mixed connective tissue disease. *Medicine (Baltimore)* 63:92-107, 1984.
2. Burdt MA, Hoffman RW, Deutscher SL, Wang GS, Johnson JC, Sharp GC. :Long-term outcome in mixed connective tissue disease: longitudinal clinical and serologic findings. *Arthritis Rheum* 42:899-909, 1999.
3. 鳥飼勝隆, 深谷修作, 国枝武義, 東條 毅. :混合性結合組織病患者における肺高血圧症の合併率調査. 厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班混合性結合組織病分科会平成10年度研究報告書 24-27, 1999.
4. Magliano M, Isenberg DA, and Hillson J. :Pulmonary hypertension in autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 46:1997-2009, 2002.
5. Yamane K, Ihn H, Asano Y, et al. :Clinical and laboratory features of scleroderma patients with pulmonary hypertension. *Rheumatology (Oxford)* 39:1269-1271, 2000.
6. 野島崇樹, 岡野裕, 金子祐子, 佐藤慎二, 諏訪昭, 岩永史郎, 佐藤徹, 小川聡, 平形道人, 池田康夫: 肺高血圧を合併した膠原

病患者の臨床免疫学的研究. *日本内科学会雑誌* 91(臨時増刊号): 283, 2002.

7. Ungereker RG, Tashkin DP, Clements PJ, et al. :Prevalence and clinical correlates of pulmonary arterial hypertension in progressive systemic sclerosis. *Am J Med* 75:65-74, 1983.
8. Koh ET, Lee P, Gladman DD, Abu-Schakra M. :Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: an analysis of 17 patients. *Br J Rheumatol* 35:989-993, 1996.
9. Stupi AM, Steen VD, Owens GR, Barnes EL, Rodnan GP, Medsger TA Jr. :Pulmonary hypertension in the CREST syndrome variant of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 29:515-524, 1986.
10. Jie-Yan S, Shun-Le C, Yi-Xian W, et al. :Pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 18:147-151, 1999.

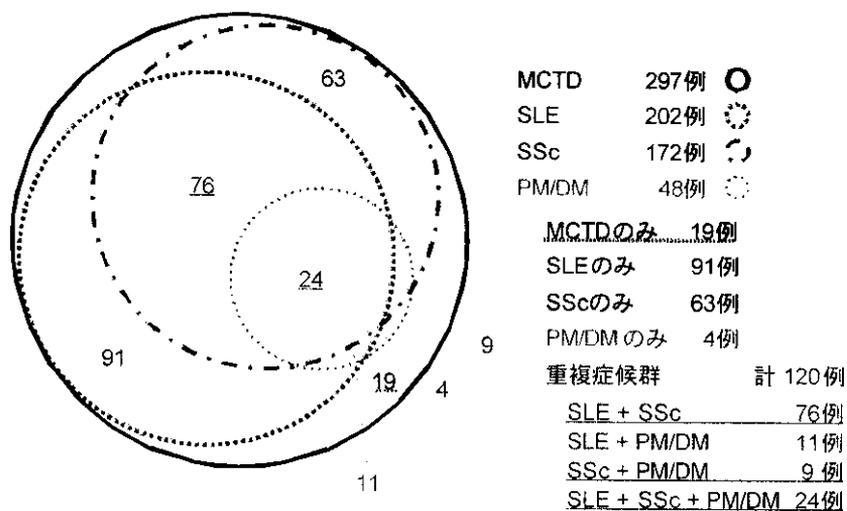


図1 MCTD297例における膠原病診断の内訳

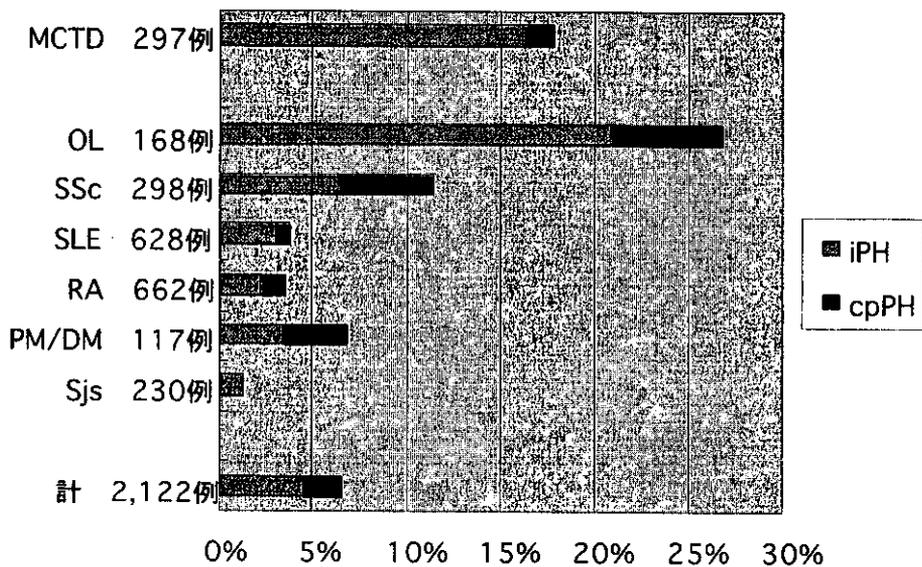


図2 膠原病におけるPHの合併頻度

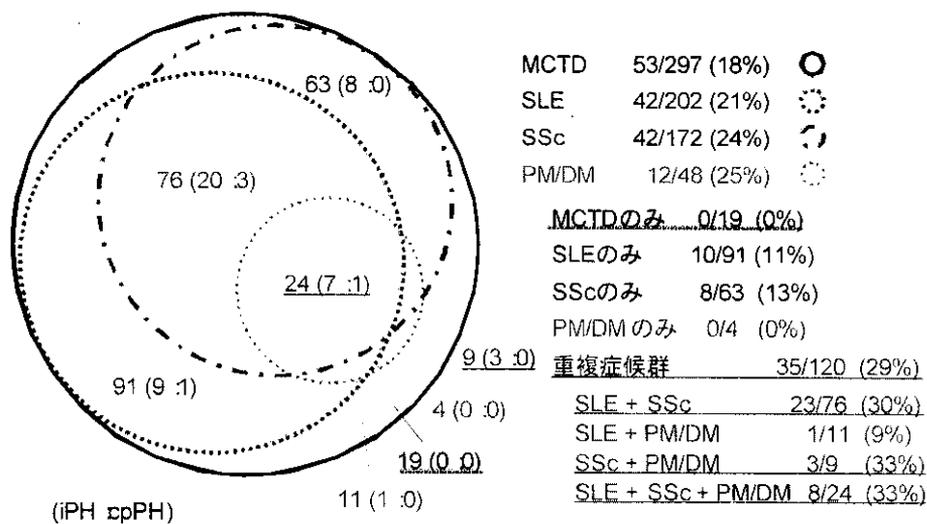


図3 PH合併MCTD53例における膠原病診断の内訳

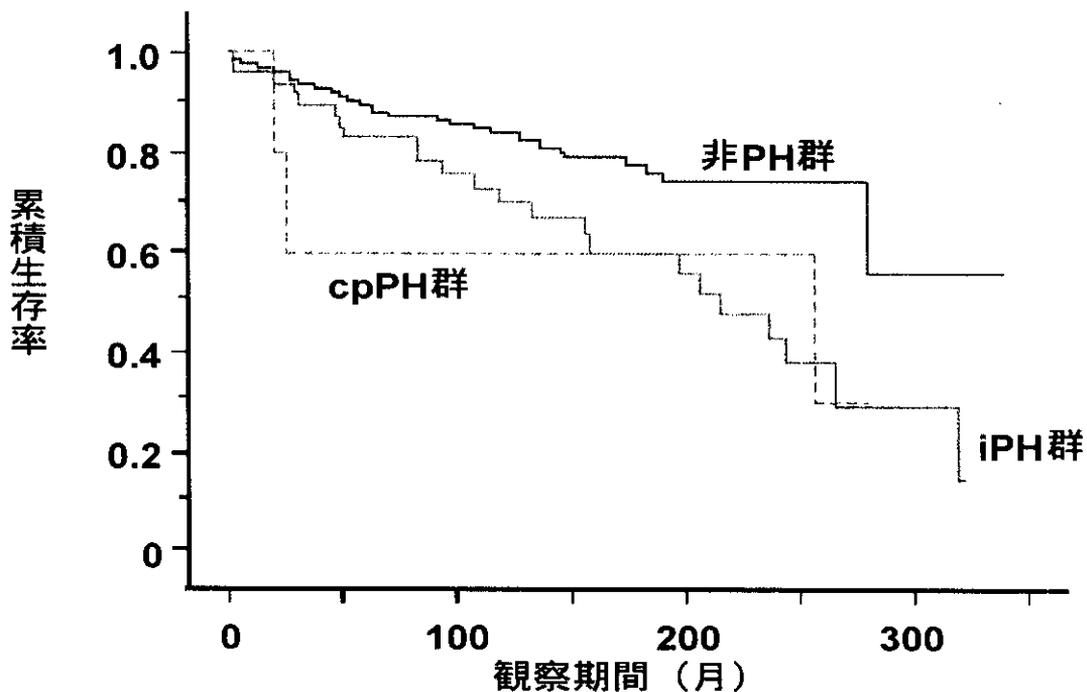


図4 Kaplan-Meier 法による生命表分析 (MCTD)

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF JAPANESE PATIENTS WITH MIXED CONNECTIVE TISSUE DISEASES ASSOCIATED WITH PULMONARY HYPERTENSION.

Akira Suwa, Takaki Nojima, and Michito Hirakata

Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Pulmonary hypertension (PH) is one of the important manifestations in patients with connective tissue diseases (CTD), especially mixed connective tissue diseases (MCTD).

To clarify the clinical and immunological features for its poor prognosis associated with PH, we have encountered 2,122 consecutive new patients with CTD evaluated at our center during the period 1962-2001. MCTD patients were divided into three groups; isolated pulmonary hypertension (iPH) group, secondary pulmonary hypertension (cpPH) group (due to interstitial lung fibrosis and/or cardiac involvement) and non-PH group. Then, the background, clinical, immunological features and prognostic factors of patients with MCTD were compared among these three groups.

Fifty three of 297 (18%) with MCTD developed PH (iPH : cpPH = 48:5).

There were no differences in background of MCTD patients. One hundred and twenty patients with MCTD also fulfilled the criteria for overlap syndrome involving systemic sclerosis diagnosis and in this population frequently developed PH (29%), whereas none of 19 patients with MCTD don't meet the criteria for other connective tissue diseases developed PH. When the clinical characteristics of patients with PH were compared with those of non-PH patients, proximal scleroderma, retraction of lips, pitting scar, skin ulcer, continuous proteinuria, lung fibrosis (lower fields), reduced diffusing capacity for carbon monoxide, decreased vital capacity, esophageal dysfunction, anemia, low serum complement levels, lupus anticoagulant, anti-ribosome antibody, anti-SS-A antibody, therapy of steroids and therapy of PGE1 or prostacyclin were more common. Survival rate of MCTD patients with PH (both iPH and cpPH) is clearly lower than that of non-PH patients.

These results suggest that MCTD patients with PH may constitute clinically and immunologically characteristic features.

[Ⅲ]

平成14年度業績目録

1. 雑誌

著者名	論文題目	雑誌名	巻：頁,西暦年号
Akahoshi T, Namai R, Murakami Y, Watanabe M, Matsui T, Nishimura A, Kitasato H, Kameya T, <u>Kondo H.</u>	Rapid induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human monocytes by monosodium urate monohydrate crystals.	Arthrihi Rheum	48:231-239,2003
Akahoshi T, Sasahara T, Namai R, Matsui T, Watabe H, Kitasato H, Inoue M, <u>Kondo H.</u>	Production of macrophage inflammatory protein-3 alpha(MIP-3alpha)(CCCL20)and MIP-3beta(CCCL19)by human peripheral blood neutrophils in response to microbial pathogens.	Infect Immunol	71:524-526,2003
Liu J, He T, He Y, zhng Z, Akahoshi T, <u>Kondo H</u> , Zheng S.	Prolongativn of functional life-span of neutoophils by recobinant verotoxin 2.	Chin Med J	115:900-903,2002
<u>近藤啓文</u> 、石川 章	可溶性 TNF α レセプター 関節リウマチにおける有用性と問題点	治療学	36:1249-1252,2002
桑名正隆、佐藤伸一、 <u>近藤啓文</u> 、竹原和彦	全身性強皮症患者の評価法	日本リウマチ学会誌	42:654-665,2002
<u>近藤啓文</u>	診療ガイドラインレビュー 関節リウマチ (ACR コアセット)	日内会誌	91:2728-2737,2002
<u>近藤啓文</u> 、濱名 俊也	関節リウマチへのアプローチ 予後改善に結びつく最新の薬物療法の実際	Medical Practice	19:1086-1093,2002
原まさ子、菅原幸子、廣瀬俊一、内田詔爾、入交昭一郎、 <u>近藤啓文</u> 、柏崎禎夫	慢性関節リウマチに対する FK506 の臨床的検討	炎症・再生	22:213-226,2002
<u>近藤啓文</u> 、濱名 俊也	全身性強皮症	内科	89:1369-1372, 2002
<u>近藤啓文</u> 、岡田 純	厚生科学研究費 特定疾患対策研究事業研究報告 混合性結合組織病	日臨免誌	25:215-226, 2002
川合眞一、越智隆弘、 <u>近藤啓文</u> 、西岡久寿樹、宮坂信之、吉野慎一、	日本ウチ財団委員会報告 メトトレキサートおよびサラソ・スルファピリジンの慢性関節リウマチ患者における臨床用量調査	リウマチ	42:76-79, 2002
Kawahata K, <u>Misaki Y</u> , Yamauchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, Yamamoto K.	Peripheral Tolerance to a Nuclear Autoantigen : Dendritic Cells Expressing a Nuclear Autoantigen Lead to Persistent Anergic State of CD4+ Autoreactive T Cells After Proliferation	J Immunol	168(3):1103-12, 2002
Kawahata K, <u>Misaki Y</u> , Yamauchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, Yamamoto K.	Generation of CD4+CD25+ regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from non-autoreactive T cells by endogenous T cell receptor expression	J. Immunol.	168(9), 4399-4405, 2002
<u>三崎義堅</u>	サイトカインと自己免疫疾患	ホルモンと臨床	50(3),293-299,2002

Fujii T, Okada M, <u>Mimori T</u> , Craft J	The transmembrane form of TNF α drives autoantibody production in the absence of CD154: Studies using MRL/Mp-Faslpr mice	Clin Exp Immunol	130:224-232, 2002
<u>Mimori T</u>	Clinical Significance of Anti-Ku Autoantibodies -A Serologic Marker of Overlap Syndrome?	Internal Medicine	41(12), 1096-1098, 2002
<u>三森経世</u>	主要疾患の歴史-混合性結合組織病	日本内科学会雑誌	91(9), 2676-2682, 2002
<u>高崎芳成</u>	ループス腎炎	Mebio	20: 50-54, 2003
Tan E M, Smolen JS, McDougal JS, Klippel JH, Fritzler M J, Gordon T, Hardin J A, Kalden JR, Lahita R G, Maini R N, Rothfield N P, <u>Takasaki Y</u> , Wiik A, Wilson M R, Koziol J A	A critical evaluation of enzyme immunoassay kits for the detection of antinuclear antibodies of defined specificities. II. Potential for quantitation of antibody content	J Rheumatol	29: 68-74, 2002
Yano T, <u>Takasaki Y</u> , Takeuchi K, Hirokawa K, Yamanaka K, Hashimoto H	Anti-Ki antibodies recognize an epitope homologous with SV40 nuclear localization signal-Clinical significance and reactivities in various immunoassays	Modern Rheumatol	12: 50-55, 2002
Hirokawa K, <u>Takasaki Y</u> , Takeuchi K, Kaneda K, Ikeda K, Hashimoto H	Characterization of a novel antibody against the sequence-specific RNA by a random RNA selection in patients with Sjogren's syndrome	J Rheumatol	29: 931-937, 2002
<u>Takasaki Y</u> , Kaneda K, Yamada H, Ikeda K, Matsushita M, Matsudaira R, Takeuchi K, Shindo N, Murayama K, Hashimoto H	Autoimmune response to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is strongly associated with its cellular function in lupus patients	Autoantigens, Autoantibodies, Autoimmunity	3:93-115, 2002
Sugimoto K, Morimoto S, Kaneko H, Nozawa K, Tokano Y, <u>Takasaki Y</u> , Hashimoto H	Decreased IL-4 producing CD4 + T cells in patients with systemic lupus erythematosus-Relation to IL-12R expression	Autoimmunity	35: 381-387, 2002
Kogure T, <u>Takasaki Y</u> , Takeuchi K, Yamada H, Nawata M, Matsushita M, Matsudaira R, Kaneda K, Terasawa K, Hashimoto H	Autoimmune responses to proliferating cell nuclear antigen multiprotein complexes involved in cell proliferation are strongly associated with their structure and biologic function in patients with systemic lupus erythematosus	Arthritis Rheum	46: 2946-56, 2002
Murakami A, Kojima K, Ohya K, Imamura K, <u>Takasaki Y</u>	A new conformational epitope generated by the binding of recombinant 70-kd and U1 RNA autoantibodies in sera from patients with mixed connective tissue disease	Arthritis Rheum	46: 3273-3282, 2002
Tokano Y, Ogasawara H, Ando S, Fujii T, Kaneko H, Tamura N, Yano T, Hirokawa K, Fukazawa T, Murashima A, Kobayashi S, Sekigawa I, <u>Takasaki Y</u> , Iida N, Hashimoto H	Cyclosporine A therapy for interstitial pneumonitis associated with rheumatic diseases	Modern Rheumatol	12: 305-310, 2002