

**表 5. Clinical features in 50 patients with systemic rheumatoid vasculitis**

(Scott DGI, Bacon PA, Tribe CR Medicine 1981,60 288-297)

関節外症状	陽性率	うちわけ	厚生省 MRA 1989
1 Cutaneous	44 (88%)	26 digital etc 28 ulcers (19 leg), 17 rash (12 purpura), 7 gangrene	皮膚梗塞19%,皮膚潰瘍34%,指趾壊疽15%,紫斑出血68%
2 Neuropathy	21 (42%)	21 sensory, 7 motor (2 also CVA)	59/158 (37%)
3 Systemic	41 (82%)	41 weight loss, 6 hepatomegaly, 13 splenomegaly (2 Felty)	118/161 (73%) 発熱 体重減少
4 Nodules	43 (82%)	not described	112/165 (68%)
5 Cardiac	17 (34%)	7 pericarditis, 9 arrhythmia, 2 aortic incompetence, 3 myocardial infarction	心嚢炎15%,心筋炎3%
6 Pulmonary	17 (34%)	9 fibrosing alveolitis, 8 pleurisy/effusion, 1 nodule	間質性肺炎 肺線維症 81/168 (48%)
7 Ophthalmic	88(16%)	7 scleritis(1 perforans), 3 Sjogren	上強膜炎27%,虹彩炎7%
8 Renal	12 (24%)	4 amyloid, 2 chronicrenal failure, 6 proteinuria and or hematuria	なし
9 Gastrointestinal	5 (10%)	2 acute abdomen, 2 postmortem only, 1 colitis	臓器梗塞(腸、心筋など) 15%

表 6 Rheumatoid vasculitis (Textbook of Rheumatology 4<sup>th</sup> より)

**RA with : Systemic vasculitis,** A small- and medium-sized arteries

Having RA for 10 years and more

Males are afflicted as commonly as female

HLA-DRB1\*0401 homozygote

**Clinical features** (一部省略)

Rheumatoid nodules

Systemic vasculitis not associated with significant renal involvement, vs PAN

**Laboratory findings**

A high titer of RF

A low level of serum complement

Immune complex and cryoglobulins in sera

**Pathological findings**

An occlusive intimal proliferation without much inflammation vs PAN

**Treatment**

High dose glucocorticoid, Cytotoxic drugs

**Prognosis**

Worse than that of RA

表7.1 MRAの予後と組織所見、臨床像との関係 (文献15-17による)

血管炎の有無	病型	病理学的特徴	臨床的特徴	生命に対する予後
	A 全身性動脈炎 (systemic arteritis型, Bevans 型)	内臓を系統的に侵す	胸膜炎、心嚢炎、肺臓炎、心筋炎	不良
血管炎型	B 末梢性動脈炎型 (peripheral arteritis 型、Bywaters型)	四肢末端および皮膚を侵す	多発性単神経炎、皮膚潰瘍、指趾潰瘍、上胸膜炎、皮結節、皮膚出血	良好
非血管炎型	C 肺臓炎 (pneumonitis型)	肺臓を主として侵す (血管炎はない)	肺臓炎、肺線維症	不良
	D 全身性感染症	化膿性炎		不良

表7.2 病理組織所見による分類 (文献15-17による)

RA	血管壁にリウマトイド結節様病変を示す壊死性血管炎
Ra	巨細胞出現を伴った汎動脈炎
PN	(polyarteritis nodosa) PN様フィブリノイド血管炎
Pn	内膜のみ、または血管壁の一部にフィブリノイド変性を伴った血管炎
EA	(endoarteritis) 閉塞性動脈内膜炎
Ep	(endoproliferation) 内膜の増殖のみ

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

難治性血管炎に関する調査研究

高安動脈炎における抗 heat shock protein70B' (HSP70B')抗体の検討

分担研究者	吉田俊治	藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科
研究協力者	王熊桂子	藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科
	田口博章	藤田保健衛生大学リウマチ感染症内科

【研究要旨】

抗好中球細胞質抗体に次いで血管炎症候群で高頻度に認められる抗内皮細胞抗体のうち、抗 74kDa 抗体が高安動脈炎患者血清に高率に検出され、対応抗原の候補の内の一つか heat shock protein70(HSP70)に関連がある可能性を報告してきた。

今回、抗 74kDa 抗体の疾患特異性についてさらに症例数を増やし検討を行うとともに、HSP70 family の中でも厳密に stress によって誘導される HSP70B' 抗原に対する抗体の検討を目的とした。対象は各種患者 109 例および健常人 10 例の血清を用いた。ヒト臍帯静脈内皮細胞膜を抗原とし SDS-PAGE および Western blot 法を用いた。また、市販の Recombinant HSP70B' を抗原とし同様の方法を用いて抗 HSP70B' 抗体を検索した。その結果、抗 74kDa 抗体は、膠原病関連疾患にも少数例見られたものの高安動脈炎に比較的高い特異性をもつことが再確認された。抗 HSP70B' 抗体は、抗 HSP70 抗体、抗 74kDa 抗体との相関は見られなかった。

**Anti-heat shock protein 70B' antibodies in Takayasu arteritis**

Shunji Yoshida (Fujita Health University School of Medicine, Department of Internal Medicine)

Keiko Tamakuma (Fujita Health University School of Medicine, Department of Internal Medicine)

Hiroaki Taguchi (Fujita Health University School of Medicine, Department of Internal Medicine)

Anti-endothelial cell antibodies are the second most frequently detected autoantibodies in patients with vasculitis syndrome. Previously we found that anti-74kDa antibodies were specific to Takayasu arteritis, and that one of the candidates for the corresponding antigens was heat shock protein (HSP) 70. However, the presence of anti-HSP70 antibodies was not correlated with that of anti-74kDa antibodies. Recently we attempted to confirm the specificity of anti-74kDa antibodies for Takayasu arteritis using larger samples of sera from patients with various connective tissue diseases. And we also attempted to detect

antibodies to another HSP, HSP70B', which is induced in response to stress. We collected sera from 109 patients and 10 normals. Anti-74kDa antibodies were detected by SDS-PAGE plus Western blotting using human umbilical vein endothelial cells as antigens. Anti-HSP70B' antibodies were detected by SDS-PAGE plus Western blotting using recombinant HSP 70B' as antigens.

Anti-74kDa antibodies were detected in 62% of patients with Takayasu arteritis and in 20-30% of patients with other vasculitis syndrome and connective tissue diseases. Anti-HSP70B' antibodies were detected in 67% of patients with Takayasu arteritis and in 0-70% of patients with other vasculitis syndrome and connective tissue diseases. The presence of anti-HSP70B' antibodies was not correlated with that of anti-74kDa antibodies nor that of anti-HSP70 antibodies.

These data suggest that anti-74kDa antibodies are relatively specific to Takayasu arteritis, and that anti-HSP70B' antibodies are not the same as anti-74kDa antibodies.

#### A 研究目的

抗内皮細胞抗体は、血管炎症候群で抗好中球細胞質抗体 (ANCA) に次いで高率に認められる自己抗体である。前年度までの検討<sup>1)2)</sup>で、抗内皮細胞抗体の中で、抗 74kDa 抗体が高安動脈炎に高率に検出されることを報告してきた。そして、2 次元電気泳動より対応抗原を分析<sup>3)</sup>し、高安動脈炎の抗 74kDa 抗体陽性の 3 血清から共通する 3 つの spots が検出された。アミノ酸分析より同定<sup>4)</sup>した 3 つの対応抗原の候補のうちの一つである heat shock protein70(HSP70)について検討したか、抗 HSP70 抗体と抗 74kDa 抗体に相関がみられなかった<sup>5)</sup>。そこで、以前報告した抗 74kDa 抗体の疾患特異性についてさらに症例数を増やし検討を行なうとともに、HSP70 family の中でも厳密に stress によって誘導される HSP70B' 抗原に対する抗体について

検討を試みた。

#### B 対象

高安動脈炎 21 例、結節性多発動脈炎 2 例、ANCA 関連血管炎 13 例、関節リウマチ (RA) 13 例、全身性エリテマトーデス (SLE) 17 例、強皮症 (SSc) 6 例、多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM) 19 例、混合性結合組織病 (MCTD) 13 例、シェーグレン症候群 (SS) 5 例、健常人 10 例の血清を用いた。

#### C 研究方法

抗 74kDa 抗体検出法は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) から抽出した細胞膜分画<sup>6)</sup>を抗原とし SDS-PAGE 法および Western blot 法を用いて各種血清中の抗体を検索した。また、市販の Recombinant HSP70B' (MBL 社) を抗原とし同様の方法を用いて抗 HSP70B' 抗体を検索した。

#### D 研究結果

抗 74kDa 抗体については、高安動脈炎 17 例中 9 例(62%)、PN2 例中 1 例(50%)、ANCA 関連血管炎 13 例中 4 例(31%)、RA13 例中 3 例(23%)、SLE17 例中 4 例(24%)、SS c 6 例中 1 例(17%)、PM/DM19 例中 5 例(26%)、MCTD13 例中 3 例(23%)、SS5 例中 0、健常人 10 例中 0 に認めた。(図 1)

抗 HSP70B'抗体についての検討は、高安動脈炎 18 例中 12 例(67%)、PN2 例中 0、ANCA 関連血管炎 13 例中 9 例(69%)、RA13 例中 9 例(69%)、SLE17 例中 9 例(53%)、SS c 6 例中 2 例(33%)、PM/DM19 例中 14 例(74%)、MCTD12 例中 6 例(50%)、SS5 例中 2 例(40%)、健常人 9 例中 5 例(56%)に認めた。(図 2)

#### E 考察

抗 74kDa 抗体の疾患特異性については、以前より対照疾患血清数を増やして検討したところ膠原病関連疾患にも低率でみられたか、やはり高安動脈炎に最も高率に認められた。また、昨年度に続き対応抗原候補の一つである HSP70 の family の中でも stress によって誘導される HSP70B' に対する抗体を検討したが、抗 HSP70 抗体および抗 74kDa 抗体の有無とは相関しなかった。2 次元電気泳動法、Western blot 法より高安動脈炎の抗 74kDa 抗体陽性の患者血清から同定した 3 つの対応抗原は必ずしも抗 74kDa 抗体を反映するものではなかったかもしれない。HUVEC は培養を始めとする膜分画処理や電気泳動など多くの負荷(stress)をかけている。その時々の実験条件に

よって含有するタンパク量が異なる可能性も大きく考えられる。よって、再度実験条件を見直し、引き続き対応抗原を検討しつつ、新たに抗 74kDa 抗体の対応抗原を同定していく方針である。

#### F 結論

抗 74kDa 抗体は高安動脈炎に比較的高い頻度で検出されることを再確認した。抗 HSP70B' 抗体は抗 74kDa 抗体と関連はみられず、血管炎症候群や膠原病関連疾患にも検出された。

#### G 健康危険物情報

該当なし。

#### H 文献

- 1 吉田俊治、片山雅夫、水谷昭衛、大島久二、鳥飼勝隆 高安動脈炎における抗内皮細胞抗体の検討。厚生省厚生科学特定疾患対策研究事業難治性血管炎に関する調査研究班平成 10 年度研究報告書、1999、
- 2 吉田俊治、片山雅夫、深谷修作、大島久二、鳥飼勝隆 血管炎症候群における抗内皮細胞抗体(抗 74kDa 蛋白抗体)に関する検討。厚生省厚生科学特定疾患対策研究事業難治性血管炎に関する調査研究班平成 11 年度研究報告書、2000、107-109
- 3 吉田俊治、田口博章、鳥飼勝隆 高安動脈炎における抗内皮細胞抗体(抗 74kDa 抗体)の対応抗原の分析。厚生科学研究研究費補助金特定疾患対策研究事業難治性血管炎に関する調査研究平成 12 年度総括研究報告書、2001、134-136
- 4 吉田俊治、田口博章、吉田秀雄、玉熊桂子、片山雅夫、深谷修作 高安動脈

- 炎における抗内皮細胞抗体（抗 74kDa 抗体）の対応抗原の同定。厚生科学研究研究費補助金特定疾患対策研究事業難治性血管炎に関する調査研究平成 13 年度研究報告書、2002 , 232-
- 5 吉田俊治、田口博章、王熊桂子 高安動脈炎における抗 heat shock protein 抗体の検討。研究事業難治性血管炎に関する調査研究平成 14 年度研究報告書、2003 , -
- 6 Van der Zee JM, Siegert CEH, de Vreede TA, Daha MR, Breedveld FC Characterization of anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus  
Clin exp Immunol 1991, 84 238-244
- 1 研究発表
- 1 論文発表
- 1) 深谷修作、吉田俊治 混合性結合組織病の肺高血圧症 Mebio 20 46-49, 2003
- 2) 大竹智子、吉田俊治、芦原 睦 RA 患者における QOL とストレス対処行動 ストレスと臨床 17 13-19, 2003
- 3) 深谷修作、吉田俊治 基本的治療方針 混合性結合組織病 今月の治療 11 1264-1271, 2003
- 4) 大塚清香、大津史子、吉田俊治、他 薬剤師のための患者の自覚症状(訴え)及び個人背景に基づく膠原病発症の可能性評価 医療薬学 29 596-574, 2003
- 5) 吉田俊治 診断の進歩 膠原病の診断基準の進歩 医学のあゆみ別冊膠原病 19-23, 2003
- 6) 水谷昭衛、深谷修作、吉田俊治 アテノウイルス肺炎 臨床医 29 1991-1994, 2003
- 7) 水谷昭衛、吉田俊治 膠原病薬物治療の実際 膠原病に伴う肺高血圧症 医薬ジャーナル 39 3272-3278, 2003
- 8) 片山雅夫、吉田俊治 最先端の薬物治療 副腎皮質ステロイド薬 カレントセラピー 22 23-27, 2003
- 9) 大竹智子、浅原 睦、吉田俊治 全身性エリテマトーデス レジデントノート 5 120-123, 2004
- 2 学会発表
- 1) 吉田俊治 膠原病に伴う肺高血圧症 第 18 回日本臨床リウマチ学会総会 スポンサーシンポジウム 7、札幌、2003
- J 知的財産権の出願・登録状況
- 1 特許取得  
該当なし。
- 2 実用新案登録  
該当なし。
- 3 その他  
なし

図 1

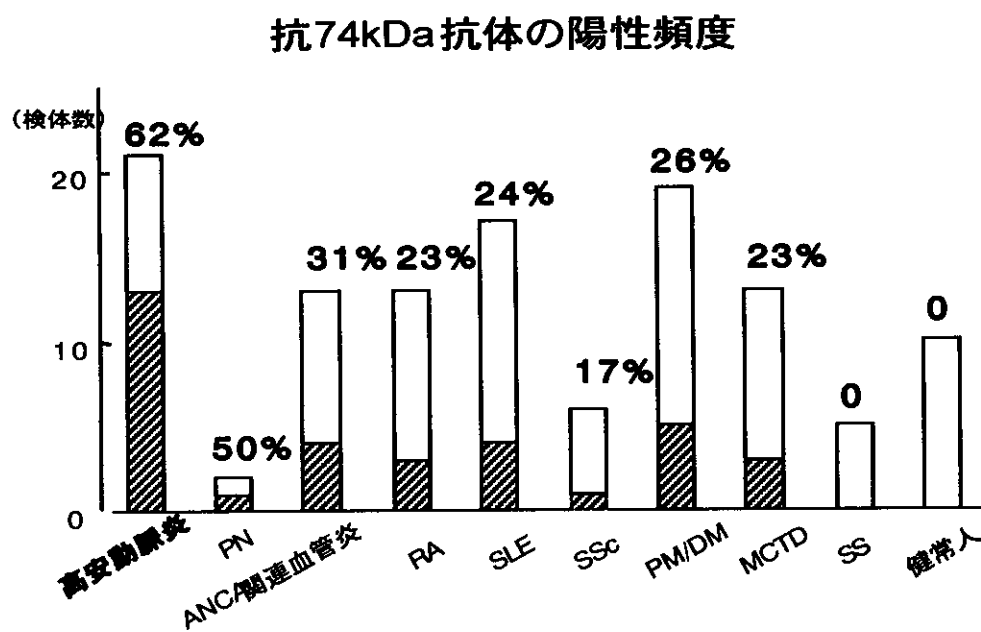
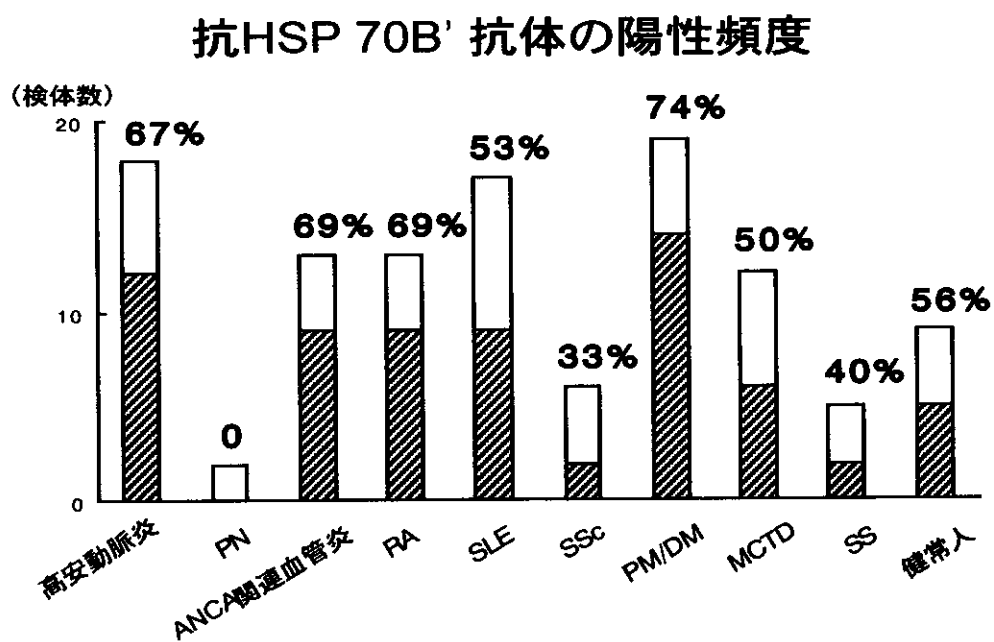


図 2





## 薬剤によるマウス皮膚由来血管内皮細胞株 F-2 の細胞死誘導に関する研究

分担研究者 古川福実 (和歌山県立医科大学皮膚科)

**研究要旨** ヒトララジンは、時間および濃度依存的にマウス皮膚由来血管内皮細胞株 F-2 の増殖を抑制し、DNA 断片化を促進することより、アポトーシスの関与が示唆された。また、ヒトララジンは、カスパーゼ 3 の活性を亢進し、カスパーゼ 3 阻害薬は、濃度依存的にヒトララジンによる DNA 断片化を抑制した。さらに、ヒトララジンは、TNF- $\alpha$  が誘導するアポトーシスに対して、相加的に効果を促進する可能性が考えられた。

### A. 研究目的

ANCA 関連血管炎は、ときに、薬剤により誘発されることか知られているが、降圧薬のヒドララジンもその原因薬の 1 つに挙げられる。ANCA 関連血管炎の発症機序として、ANCA と対応抗原の結合を介して好中球が活性化し、好中球から放出される蛋白分解酵素などにより、血管内皮細胞の壊死が進行することが想定されている。しかし、血管内皮細胞のアポトーシスか、関与するか否かは、明らかでない。本研究では、ヒドララジンか、活性化した好中球とは独立に、血管内皮細胞の傷害にかかわる可能性を *in vitro* の系で検討した。

### B. 研究方法

マウス皮膚由来血管内皮細胞株 F-2 を 5%FBS を含む DMEM で培養し

た。

①ヒドララジンを含まない群と 1~20  $\mu$ M のヒドララジンを含む群について、マイクロタイタープレート上で 24~72 時間培養した後、細胞に WST-1 を 2 時間取り込ませ、ELISA 法により、定量した。

②①と同様にして、24 時間培養した細胞のライセートをストレプトアビジンでコートしたマイクロタイタープレートのウエルに添加し、ビオチンで標識した抗ヒストン抗体およびペルオキシターゼで標識した抗 DNA 抗体とともに、2 時間インキュベートし、ヒストンと結合した DNA のモノおよびオリゴヌクレオゾームレベルでの断片化を定量した。

③ヒドララジンを含まない群と 20  $\mu$ M のヒドララジンを含む群をそれぞれ、直径 10cm のプレート上で、24

～36 時間培養した。細胞ライセート 50  $\mu$ g に最終濃度 200  $\mu$ M となるように DEVD-pNA (pNA p-nitroanilide) を添加し、37°C で 2 時間反応させた後、405nm の吸光度を測定した。

④ 0.1～1  $\mu$ M のカスパーゼ 3 阻害薬で前処置した後に 20  $\mu$ M のヒドララジンを加えた群と、前処置を行わなかった群について、②の方法により、比較した。

⑤ 20  $\mu$ M のヒドララジンと 50ng/ml の TNF- $\alpha$  の両方を含む群と、後者のみを含む群について、②の方法により、比較した。

### C. 研究結果

① ヒドララジンは、時間および濃度依存的に F-2 の増殖を抑制した。

② ヒドララジンは濃度依存的に、DNA の断片化を促進した。

③ ヒドララジンは、カスパーゼ 3 の活性を亢進した。

④ カスパーゼ 3 阻害薬は、濃度依存的にヒドララジンによる DNA の断片化を抑制した。

⑤ ヒドララジンは、TNF- $\alpha$  による DNA 断片化の促進を相加的に増強した。

### D 考察

ヒドララジン存在下の血管内皮細胞は、一部の細胞が、アポトーシスの誘導を受けながらも、血管の構築を保っているが、血管炎の急性期のように、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの産生が亢進した状況では、ヒドララジン非存在下の血管内皮細胞と比較して、より強い細胞傷害を受け、破綻をきたしやすい可能性が考えられた。また、ヒドララジンによるアポトーシスは、カスパーゼ 3 を介した経路の関与が示唆されたか、TNF- $\alpha$  が誘導するアポトーシスの経路とは、一部、異なる可能性も考えられた。

胞は、一部の細胞が、アポトーシスの誘導を受けながらも、血管の構築を保っているが、血管炎の急性期のように、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの産生が亢進した状況では、ヒドララジン非存在下の血管内皮細胞と比較して、より強い細胞傷害を受け、破綻をきたしやすい可能性が考えられた。また、ヒドララジンによるアポトーシスは、カスパーゼ 3 を介した経路の関与が示唆されたか、TNF- $\alpha$  が誘導するアポトーシスの経路とは、一部、異なる可能性も考えられた。

### E. 結論

ヒドララジンは、カスパーゼ 3 を介して、F-2 のアポトーシスを誘導し、TNF- $\alpha$  が惹起する F-2 のアポトーシスを増強する可能性が考えられた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1 論文発表

1 Wakita H, Yamamoto Y, Furukawa F Aberrant suprabasal P-cadherin expression in acanthotic but not psoriatic

- thickened epidermis Arch Dermatol Res 295 (suppl 1) S71-S74, 2003
- 2 Yamamoto Y, Uede K, Yonei N, Kaminaka C, Furukawa F Expression of tenascin and human  $\beta$ -1 integrin in the skin peeled with phenol or trichloroacetic acid Aesthet Dermatol 13 17-24, 2003
- 3 Ohtani T, Hiroi A, Sakurane M, Furukawa F Slow acetylator genotypes as a possible risk factor for infectious mononucleosis-like syndrome induced by salazosulfapyridine Br J Dermatol 148 1035-1039, 2003
- 4 Uede K, Furukawa F Skin manifestation in acute arsenic poisoning from the Wakayama curry-poisoning cases Br J Dermatol 149 757-762, 2003
- 5 Yamamoto Y, Uede K, Ohtani T, Wakita W, Furukawa F P-cadherin expression in skin peeled with phenol or trichloroacetic acid (TCA) J Dermatol 30 920-923, 2003
- 6 Hiroko Shimomura, Yukiho Nakase, Hiroto Furuta, Masahiro Nishi, Taisei Nakao, Tadashi Hanabusa, Hideyuki Sasaki, Katuyuki Okamoto, Fukumi Furukawa, Kishio Nanjo A rare case of autoimmune polyglandular syndrome type 3 Diabetes Research and Clinical Practice 61 103-108, 2003
- 7 Seo N, Furukawa F, Tokura Y, Takigawa M Vaccine therapy for cutaneous T-cell lymphoma, Hematology/oncology clinics of North America, cutaneous lymphomas, Foss FM and Demierre M-F (eds), W B Saunders Company, Philadelphia, 1467-1474, 2003
- 8 Fukumi Furukawa Photosensitivity in cutaneous lupus erythematosus lessons from mice and men, J Dermatol Sci 33 81-89, 2003
- 9 古川福実 結節性皮膚ループスマチン症、Visual Dermatology 2 30-31, 2003
- 10 上中智香子、廣井彰久、上出康二、古川福実 トリアゾラム大量服用後に認められたコンパートメント症候群の一例、臨床皮膚科 57 49-51, 2003
- 11 西出武司、櫻根幹久、古川福実 オメプラゾール内服および H pylori 除菌療法中に発症した蕁疹の一例、臨床皮膚科 57 675-678, 2003
- 12 古川福実、池田高治 全身性強

皮膚に合併した逆流性食道炎の自覚症状に対する酸分泌抑制剤の臨床評価、新薬と臨床 52 1286-1292, 2003

13 西出武司、吉益 隆、池田高治、大谷稔男、上出康二、山本有紀、古川福実 サンスクリーンの光線過敏性・毒性に対する防御作用 1 ヒト培養表皮細胞に対する検討、日本美容皮膚科学会雑誌 13 92-95, 2003

14 池田高治、西出武司、吉益 隆、大谷稔男、上出康二、山本有紀、古川福実 サンスクリーンの光線過敏性・毒性に対する防御作用 2 MRL/lpr マウスを用いた検討、日本美容皮膚科学会雑誌 13 96-100, 2003

15 山本有紀、西出武司、上出康二、古川福実 血管肉腫に対するフェノール塗布の組織学的変化、日本美容皮膚科学会雑誌 13 176-179, 2003

16 池田高治、古川福実 本当の蝶形紅斑とは、medicina 40 984-986, 2003

17 大谷稔男、古川福実 TEN/Lyell 症候群、アレルギー科 15 387-390, 2003

18 古川福実、高木清孝、橋爪秀夫 皮膚疾患におけるリンパ球機能検査、臨床検査 47 1023-1029, 2003

19 古川福実、池田高治 皮膚科におけるステロイド骨粗鬆症に対する

予防的治療の実態、臨床と薬物治療 22 1008-1011, 2003

20 立花隆夫、古川福実、宮地良樹 皮膚潰瘍・褥瘡治療の再生医療、Geriatr Med 41 1779-1784, 2003

## 2 学会発表

(国際会議)

1 Yoshimasu T, Furukawa F, Ohtani T, Hiroi A, Seo N Th1 predominance of fluorouracil-induced discoid lupus erythematosus in TCR  $\alpha$  chain knockout mouse 4th International Investigative Dermatology, 2003 4 30-5 4, Miami

2 Ikeda T, Uede K, Hasizume H, Furukawa F Etretinate improves sclerotic skin of systemic sclerosis 4th International Investigative Dermatology, 2003 4 30-5 4, Miami

3 Yamamoto Y, Ohtani T, Uede K, Furukawa F, Yonei N, Kaminaka C Phenol and trichloroacetic acid peeling is a new tool as non-invasive therapy to the aged patients with skin cancer 4th International Investigative

Dermatology, 2003 4 30-5 4, Miami

4 Takaharu Ikeda, Koji Ueda, Hideo Hashizume, Fukumi Furukawa Clinical improvements of skin sclerosis of systemic sclerosis by vitamin A derivative tretinoin 5th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2002 6 6, Yamaguchi

5 T Yoshimasu, A Hiroi, N Seo, T Ohtani, and F Furukawa Th1 predominance of Fluorouracil-induced Discoid Lupus Erythematosus in TCR  $\alpha$  Chain Knockout Mouse, The Montagna Symposium, "Stem Cells in Skin" 2003 6 15, Snowmass Village, Colorado

6 Yamamoto Y, Ueda K, Sakai A, Furukawa F Change of epidermal Langerhans cells in chemically peeled skin, 8th International Workshop on Langerhans Cells, 2003 9 5-7, Tokyo

7 Minami Y, Ueda K, Furukawa F, Sagawa K, Kimura A, Tsuji T Coexistence of eccrine and apocrine differentiation in a cutaneous mixed tumor Immunohistochemistry of C8/144B and Dermcidin,

Australasian College of Dermatologists and the Japanese Dermatological Society 2003 9 18 - 21, Ayers Rock, Northern Territory, Australia

(国内学会)

シンポジウム

1 古川福実 シンポジウム 膠原病関連病態 「成人発症 Still 病」 第 54 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、2003 11 8-9、大阪

全国学会

1 三木田 直哉、上出康二、古川福実 急速に増大し気管や食道の圧迫を伴った頭部血管肉腫、第 26 回皮膚脈管・膠原病研究会、2003 1 30-31、千葉

2 他田高治、上出康二、古川福実、橋爪秀夫 modified Rodnan TSS system を用いた強皮症の皮膚硬化への tretinoin の有用性の検討、第 26 回皮膚脈管・膠原病研究会、2003 1 30-31、千葉

3 貴志知生、大谷稔男、古川福実 sinusoidal hemangioma の 1 例、第 66 回日本皮膚科学会東京支部学術大会、2003 2 15-16、東京

- 4 大谷稔男、岡本勝行、貴志知生、櫻根幹久、山本有紀、南好美、上出康二、古川福実 著明な好酸球増多症を伴う手足の紫紅色斑で発症し、急速に壊疽を生じた1例 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会、2003 5 12-14、横浜
- 5 上中智香子、米井希、大谷稔男、上出康二、古川福実 骨髓異形成症候群に合併した好中球性皮膚症の1例、第102回日本皮膚科学会総会、2003 5 23-25、千葉
- 6 南好美、上出康二、古川福実、佐川和則、木村章彦、辻力 dermcidin に対するモノクローナル抗体 (G-81) を用いた免疫組織化学的検討 第102回日本皮膚科学会総会、2003 5 23-25、千葉
- 7 米井希、櫻根幹久、浜喜和、山本有紀、上出康二、古川福実、高木正 腹部有茎皮弁にて再建した右第1指の壊疽性膿皮症後癍痕 第18回日本皮膚外科学会総会・学術集会、2003 8 23-24、岐阜
- 8 瀬尾尚宏、北中進、古川福実、瀧川雅浩 天然抗アレルギー薬物投与における免疫調節性T細胞活性低下と腫瘍増殖抑制、第62回日本癌学会、2003 9 25-27、名古屋
- 9 大谷稔男、西出武司、上出康二、古川福実 遅発型悪性症候群の1例、第53回日本アレルギー学会、2003 10 23、岐阜
- 10 古川福実 特別講演「皮膚筋炎の診療」第5回センチュリーカンファランス、2003 2 7、京都
- 11 古川福実 膠原病の光線過敏をどう考えるか 第34回静岡県臨床免疫懇話会、2003 7 5、静岡
- 12 古川福実 膠原病の皮膚潰瘍 第5回新潟皮膚潰瘍治療懇話会、新潟県医師会後援、新潟皮膚潰瘍治療懇話会共催、2003 11 14、新潟

# 治療前後の顕微鏡的多発血管炎患者遺伝子 profile の検討： Subtractive Hybridization 法を用いて

分担研究者 津坂 憲政 埼玉医科大学総合医療センター第二内科 講師

**研究要旨** 顕微鏡的多発血管炎 (MPA) 患者の治療前後においてどのような遺伝子群が増加あるいは減少するのはいまだ不明な点である。そこでわれわれは今年度 Subtractive hybridization 法を用いて MPA 患者の治療前後の遺伝子 profile 変化を検討した。MPA 患者 (85 才, 男性) の治療前ならびに治療後 (寛解導入後) の末梢血リンパ球 (PBL) から得られた全 mRNA より reverse transcriptase で変換した全 cDNA を RsaI で処理したものを治療前後の driver DNA とした。Driver DNA の両側に adaptor を ligate したものを治療前後の tester DNA とし、治療前 tester DNA と治療後 driver DNA 間および治療後 tester DNA と治療前 driver DNA 間で Subtractive hybridization を行い、subtractive tester DNA を PCR で増幅した。次に、subtractive tester DNA を pCRII vector に組み込み、reverse tester DNA をプローブとして用いた differential screening 法によって治療前・後に優位に発現されていたクローンを抽出した。その結果、Differential screening 法により治療前に優位に発現された 2 クローンを得られ、MPA 未治療時の遺伝子 profile と関連する可能性が考えられた。

## A 研究目的

顕微鏡的多発血管炎 (MPA) は小型血管炎を代表する疾患であるが、治療前後においてどのような遺伝子群が増加あるいは減少するのはいまだ不明な点である。近年 DNA chip 等を用いた方法によって組織で発現される遺伝子プロファイルを検討する試みかなされているが、MPA 発症に未知の遺伝子が関わっている可能性も否定できない。その一方で、Subtractive hybridization 法を初めとして未知の遺伝子も含めて検討できる方法が開発されている。そこでわれわれは今年度 Subtractive hybridization 法<sup>1)2)</sup>を用いて MPA 患者の治療前後の遺伝子 profile 変化を検討することを目的とした。

## B 研究方法

### 1) 研究対象者

84 歳、男性。2002 年 3 月に発熱、呼吸困難で発症。

同年 4 月に本院入院し、間質性肺炎、腎不全、MPO-ANCA 陽性より MPA と診断された。同年 4 月 19 日よりプレドニゾロン 50mg/日 経口投与とサイクロフォスファミド 間歇的点滴静注療法 (500mg/月) が開始された。6 月にカリニ肺炎併発するもその後軽快し、7 月 31 日時点で腎機能ならびに胸部レントゲン上間質性陰影の改善が認められた。末梢血は、同年 4 月 19 日と 7 月 31 日に採取した。

### (倫理面への配慮)

末梢血採取ならびに mRNA 抽出にあたって、研究対象者には不利益・危険性の排除と十分な説明 (インフォームドコンセント) を行い理解が得られ、また本研究での遺伝子 profile 解析にあたっては ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日付 文部科学省・厚生労働省 経済産業省告示第 1 号) を遵守した。

## 2) mRNAの抽出

末梢血よりFicoll法を用いてリンパ球分画を抽出し、抽出した末梢血リンパ球 (PBL) から mRNA purification kit (Pharmacia社) を用いて全 mRNA を抽出した。次に、全 mRNA 1  $\mu$ g を reverse transcriptase (Clontech社) を用いて一本鎖 cDNA に変換後、DNA polynucleotide kinase により二本鎖 cDNA (whole cDNA) に変換した。

## 3) Subtractive hybridization

1) 得られた whole cDNA を RsaI で 37°C、2 時間処理し精製したものを driver DNA とした。つぎに、この driver DNA に adaptor1 ならびに adaptor2 とをそれぞれ加えて、T4 DNA ligase で 4°C 一晩反応させ、driver DNA の両側に adaptor を結合させたものをそれぞれ tester DNA1 ならびに tester DNA2 とした。

続いて、sample tester DNA1, sample tester DNA2, control driver DNA を加えて Hybridization Buffer 中で 68°C 一晩反応させ、ハイブリダイゼーションを行い得られた DNA を sample subtracted tester DNA とした。また control tester DNA1, control tester DNA2, sample driver DNA を加えて Hybridization Buffer 中で 68°C 一晩反応させ、ハイブリダイゼーションを行い得られた DNA を control subtracted tester DNA とした。

## 4) Differential screening

Subtracted tester DNA を 鋳型 DNA とし、adaptor1 と adaptor2 とに特異的な primer を用いて PCR で subtracted tester DNA を増幅した。QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて subtracted tester DNA を精製後、pCRII vector (STRATAGENE 社) に組み込み、E coli (TOP 10F' 細胞) を形質転換させ クローンを LB プレート上に発現させた。これら クローンを 37°C 一晩、ABPC 含有 LB 培地中で培養し、5  $\mu$ l をナイロン膜上に滴下し風乾させた後に紫外線を 5 分間照射しナイロン膜上に固定した。続いて、sample または control subtracted tester DNA を Prime-It Fluor Fluorescence Kit (STRATAGENE 社) を用いて、fluor-12-dUTP で標識

したものをプローブとして、sample subtracted tester DNA を固定したナイロン膜と 68°C、2 時間ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜上のシグナルは、発光法にて検出した。

この differential screening 法では、sample subtracted DNA プローブでシグナル陽性かつ control subtracted DNA プローブでシグナル陰性のものを有意なクローンとした。

## C 研究結果

MPA 患者治療前 (4 月 19 日) と治療後 (7 月 31 日) の末梢血より PBL を抽出し、そこから全 mRNA を精製した。続いて全 mRNA 1  $\mu$ g を reverse transcriptase、DNA polynucleotide kinase を用いて whole cDNA に変換した。得られた whole cDNA を RsaI で処理し精製したものを治療前あるいは治療後 driver DNA とし、adaptor1 あるいは adaptor2 を T4 DNA ligase を用いて結合させたものをそれぞれ治療前あるいは治療後 tester DNA1 ならびに tester DNA2 とした。続いて、治療前 tester DNA1 tester DNA2 と治療後 driver DNA とを、治療後 tester DNA1・tester DNA2 と治療前 driver DNA とをハイブリダイゼーションさせ得られた DNA をそれぞれ治療前 subtracted tester DNA、治療後 subtracted tester DNA とした。

PCR によってこれら subtracted tester DNA を増幅 精製し、pCRII vector に組み込み、TOP 10F' 細胞を形質転換させ、得られたクローンを LB プレート上に発現させた。続いてこれらクローンをナイロン膜上に固定し、fluor-12-dUTP で標識した治療前または治療後 subtracted tester DNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、治療前した。ナイロン膜上のシグナルは、発光法にて検出した。

この differential screening 法では sample subtracted DNA プローブでシグナル陽性かつ control subtracted DNA プローブでシグナル陰性のものを有意なクローンとした。その結果、治療後 subtracted DNA プローブではシグナル陰性であったが、治療前 subtracted DNA プローブで陽性であった治療前 subtracted DNA 2 クローン (6A 8G) が得られた (図 1)。



## D 結語

これら2クローンは、MPA患者の治療後と比較して治療前に有意に上昇していたPBL mRNAの可能性が高く、MPA発症機序を探る上で重要と思われた。今後は、これら2クローンが治療後と比較して治療前に特異的に増えていたかどうかをNorthern blot等を用いて検討し、さらにシークエンスを行って分子を同定する予定である。

## E 健康危険情報

特記すべきことなし。

### 【参考文献】

- 1 Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al  
Suppression subtractive hybridization a  
method for generating differentially regulated  
or tissue-specific cDNA probes and libraries  
*Proc Natl Acad Sci USA* 93 6025-30, 1996
- 2 Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchuk A, et al  
Equalizing cDNA subtraction based on selective  
suppression of polymerase chain reaction  
cloning of Jurkat cell transcripts induced by  
phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate  
13-acetate *Anal Biochem* 240 90-7, 1996

## F 研究発表

### 1) 論文発表

#### 【原著】

- 1 Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al  
*J Immunol* 171 2496-2503, 2003
- 2 Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, et al *Exp  
Eye Res* 76 233-240, 2003

#### 【総説】

- 1 津坂憲政。日本臨床免疫学会会誌, 26 43-53,  
2003
- 2 津坂憲政, 竹内勤。治療, 85, 1925-1928, 2003
- 3 津坂憲政。炎症と免疫, 11, 101-108, 2003
- 4 津坂憲政。薬事日報, 9820, 23, 2003

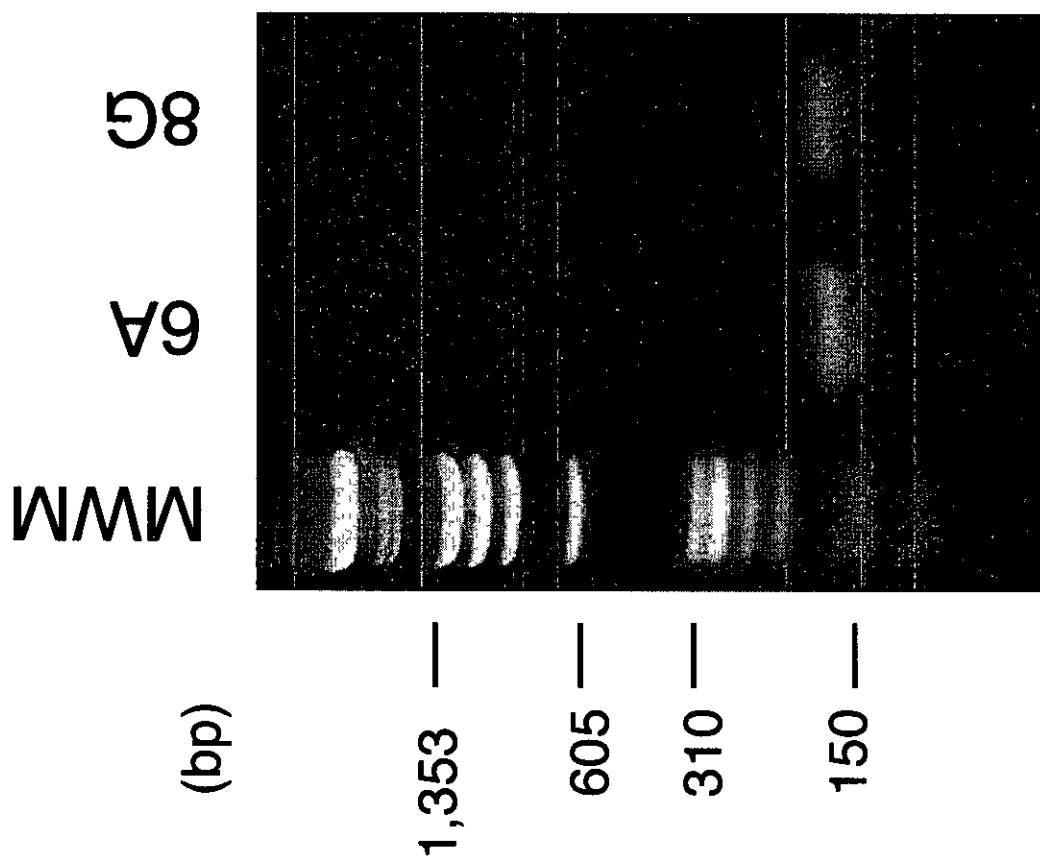
## 【学会発表】

- 1 Tsuzaka K, Fukuhara I, Setoyama Y, et al  
ACR 67th Annual Meeting, Orlando,  
U.S.A., October, 2003
- 2 Shiraishi K, Yoshimoto K, Tashiro S, et al  
ACR 67th Annual Meeting, Orlando,  
U.S.A., October, 2003
- 3 Yoshimoto K, Setoyama Y, Suzuki K, et al  
67th ACR Annual Meeting, Orlando,  
U.S.A., October, 2003

## G 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特記すべきことなし。

图 1



ANCA 関連血管炎治療における日和見感染の生命予後に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 山田秀裕 聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病アレルギー内科

#### 研究要旨

過去8年間に経験した全身性血管炎患者の病歴調査の結果、ステロイト単独投与例に比ベシクロホスファミト併用例は高齢で重症例が多かった。寛解例に比較して死亡例は、治療開始時において高齢で重症例 (BVAS スコア 24 vs 15,  $p < 0.05$ )、シクロホスファミト高用量群が多かった (64% vs 10%,  $p < 0.05$ )。年齢、体重および腎機能に応じたシクロホスファミト投与量の補正が重要と考えられた。また、日和見感染症、特にカリニ肺炎やサイトメガロウイルス感染に対する予防投与の重要性が確認された。

#### A 研究目的

重症血管炎に対しシクロホスファミトとステロイトの併用投与が行われているか、日和見感染症併発により寛解導入が困難となり不幸な転帰をとる症例がみられる。しかし、我が国における血管炎の治療現場には日和見感染症に対する一定の対策法が確立されていない。

本研究は、重症血管炎患者にシクロホスファミトを併用投与する際の日和見感染症対策の重要性と生命予後に与える影響を明らかにし、前向き臨床試験プロトコルを補佐することを目的とした。

#### B 研究方法

過去8年間に経験した全身性血管炎患者の病歴を調査し、確定診断、活動性、障害臓器、治療内容および転帰を追跡した。治療開始時の活動性の指標は BVAS-new、臓器障害は FFS を用いた。シクロ

ホスファミトの投与量は体重換算し、年齢と腎機能とて補正する欧米の基準より多く投与された症例をシクロホスファミト高用量群とした。

#### C 研究結果

調査対象は、顕微鏡的多発血管炎12例、アレルギー性肉芽腫性血管炎8例、古典的多発動脈炎と Wegener 肉芽腫症が2例ずつであった。ステロイト単独投与が5例みられたのに対し、シクロホスファミト間歇静注 (IVCY) 併用例が12例、経口シクロホスファミト併用例が9例、アサチオプリン併用例が1例みられた。ステロイト単独群に比較し、IVCY 群は有意に年齢が高く (68 vs 52)、血清 Cr が上昇し (1.9 vs 0.7)、FFS てみた臓器障害数が多く (2.5 vs 1.2)、BVAS スコアが高かった (20 vs 14)。シクロホスファミト併用例21例の追跡調査の結果11例が死亡

していた。寛解例に比較して死亡例は、治療開始時において高齢(67 vs 55)、FFS 高値(26 vs 15)の傾向があり、有意に BVAS スコアが高く(24 vs 15,  $p < 0.05$ )、シクロホスファミト高用量群が多かった(64% vs 10%,  $p < 0.05$ )。死因は血管炎によるもの3例(肺胞出血2例、心不全1例)に対して感染症によるもの8例(PCP 3, CMV 5, MRSA 2, TB 1, 重複あり)であった。感染症8例中ハクタの予防投与が行われた例はなく、INH の予防投与1例であった。寛解例にはハクタや INH の予防投与例が多い傾向であった。

#### D 考察

過去に教室で経験した症例のみならず、我が国における全身性血管炎の治療方針は、まずステロイド大量療法を行い、重症例やステロイド無効例・効果不十分な症例に対してシクロホスファミトなどの免疫抑制薬か後から追加併用されてきた。このようなアプローチは、治療を受ける患者に長期間の免疫抑制状態を強いることになり、日和見感染症併発の危険性が増大する。本研究においても日和見感染症は免疫抑制薬を併用する血管炎患者の生命予後を大きく規定することか再確認された。かかる問題を改善する手段として三つのことか重要であると考えられる。第1には、シクロホスファミトの投与量を、年齢、体重、腎機能によって調節し、過度の免疫抑制を回避することである。実際、欧米においてはこの点か設定され前向き臨床試験などに用いられている。

今回の検討においても、高用量投与群に日和見感染症の併発が多かったことから、投与量の調整の重要性か確認された。第2に、日和見感染症に対する予防投与の重要性か確認された。特に、カリニ肺炎やサイトメガロウイルス感染症の予防対策は厳重に行うことか重要と考えられた。第3に、一定の重症度のある例にはステロイドと同時にシクロホスファミトを投与し、可及的速やかに血管炎の進展を阻止することが重要と考えられる。何故なら、非可逆的な梗塞壊死病変か進行性に進展する血管炎の性質を考えると、治療開始時期か遅れるほど臓器障害は進行し、ステロイド投与量も増加することになり、その結果日和見感染症のリスクも増大するからである。欧米では10年前からシクロホスファミトとステロイド大量投与か同時に開始されており、その結果、累積ステロイド投与量か我が国の標準的ステロイド投与量の約半分量で寛解導入されていることか、欧米で行われている前向き臨床試験のプロトコールから明らかとなった。この第3の問題については次年度の検討課題の一つである。

#### E 結論

年齢、体重、および腎機能に応じたシクロホスファミト投与量の補正、および日和見感染症対策、特に PCP, CMV 感染症に対するスクリーニングと厳格な予防対策が、重症血管炎患者の生命予後を改善するものと考えられた。

#### G 研究発表