

0030782

厚生科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

## 自己免疫疾患に関する調査研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16年3月

主任研究者 小池隆夫

—目次—

(1)	構成員名簿 . . . . .	3
(2)	総括研究報告書 . . . . .	7
(3)	全体研究報告書 . . . . .	15
(4)	分担研究報告書 . . . . .	23
1	自己免疫疾患を発症する HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T 細胞機能異常の解析 石津 明洋 . . . . .	25
2	自己免疫性拡張型心筋症の分子病態解析 岡崎 拓 . . . . .	28
3	活性化ビタミン D3 による免疫バランスの制御機構 西村 孝司 . . . . .	34
4	実験的自己免疫性筋炎(EAM)ラットの経時的病態解析 原 まさ子 . . . . .	38
5	SLE における NKT 細胞の役割 広瀬 幸子 . . . . .	42
6	クラス II HLA 分子を介したシグナル伝達による免疫制御機構に関する研究 繊維芽細胞による抗原提示 松下 祥 . . . . .	47
7	CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T 細胞による CD4 <sup>+</sup> T 細胞の増殖抑制メカニズムの解析 三村 俊英 . . . . .	55
8	全身性自己免疫疾患における自己抗体産生機構についての研究 鏑田 武志 . . . . .	59
9	間質性肺病変の CT 像のコンピュータを用いた定量評価 西本 憲弘 . . . . .	62
10	Clinically Amyopathic Dermatomyositis 患者血清中に見いたされた 140kDa 蛋白を認識する自己抗体(抗 US 抗体)の臨床特徴に関する研究 平形 道人 . . . . .	68

11	抗プロトンピン抗体の接着分子発現に及ぼす影響 山崎 雅英	72
12	膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対するタクロリムスの有用性に関する検討 宮坂 信之	77
13	シェーグレン症候群唾液腺上皮細胞死におけるCD40 下流分子の同定 菅井 進	85
14	シェーグレン症候群唾液腺組織における Toll-like receptors (TLRs) 発現の検討 江口 勝美	90
15	SLE T 細胞の早期シグナル伝達分子異常によって誘導される病態関連機能分子の検索 竹内 勤	96
16	抗リン脂質抗体症候群の診断法に関する検討 松浦 栄次	99
17	抗リン脂質抗体症候群の病因としての $\beta$ 2-グリコプロテインIの分子修飾 桑名 正隆	104
18	抗リン脂質抗体関連血小板減少症のマネジメントについて 小池 隆夫	108
19	全身性エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子解析 土屋 尚之	112
20	ループス腎炎患者腎内浸潤 T 細胞サイトカインの単細胞レベルでの解析 伊藤 聡	118
21	酸化ストレスによる蛋白抗原性の変化について プロテオミクスによる包括的解析 加藤 智	121
22	抗 DNA 抗体の細胞内侵入 佐々木 毅	123
23	SLE における多剤抵抗性遺伝子発現とその制御 田中 良哉	127
24	ループス腎炎WHO IV型におけるTh1細胞の動態 橋本 博史	131
25	スタチン類の自己免疫疾患に対する治療の試み 簗田清次	139
(5)	研究成果の刊行に関する一覧	141

(1) 構成員名簿

平成15年度 構成員名簿

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	小池 隆夫	北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座 第二内科	教授
分担協力者	竹内 勤	埼玉医科大学総合医療センター第二内科	教授
	鏑田 武志	東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス 免疫疾患研究部門免疫疾患分野	教授
	西本 憲弘	大阪大学大学院生命機能研究科免疫制御学講座	教授
	広瀬 幸子	順天堂大学医学部病理学第二講座	助教授
	松下 祥	埼玉医科大学免疫学講座	教授
	宮坂 信之	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体環境応答学系生体応答学講座生体応答調節学分野	教授
	石津 明洋	北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻 病態解析講座 分子病理学分野	講師
	伊藤 聡	筑波大学臨床医学系内科膠原病リウマチアレルギー	講師
	江口 勝美	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析 制御学講座 (第一内科)	教授
	岡崎 拓	京都大学大学院医学研究科分子生物学教室	助手
	加藤 智啓	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター第一部門分子免疫研究室	助教授
	桑名 正隆	慶応義塾大学医学部先端医科学研究所	講師
	佐々木 毅	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病態制御学講座免疫 血液病制御学分野	教授
	菅井 進	金沢医科大学血液免疫内科学	教授
	田中 良哉	産業医科大学医学部第一内科学講座	教授
	土屋 尚之	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室	助教授
	西村 孝司	北海道大学遺伝子病制御研究所疾患制御部門・免疫制御分野	教授
	橋本 博史	順天堂大学医学部膠原病内科学講座	教授
	原 まさ子	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター	教授
	平形 道人	慶応義塾大学医学部内科リウマチ研究室	講師
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講座細胞化学分野	助教授	
簗田 清次	自治医科大学アレルギー膠原病学	教授	
三村 俊英	埼玉医科大学リウマチ膠原病科	教授	
山崎 雅英	金沢大学医学部附属病院内科	助手	
事務局	渥美 達也	北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 TEL (011) 706-5915 FAX (011) 706-7710	講師
経理事務担当者	笹川 文子	北海道大学大学院医学研究科経理掛 TEL (011) 706 - 5009 FAX (011) 706-7873 E-mail keiri@med.hokudai.ac.jp	主任

(2) 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
総括研究者報告書

自己免疫疾患に関する調査研究

主任研究者 小池 隆夫  
(北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座)

研究要旨

本研究では以下の項目を分担研究として行った。

①全身性エリテマトーデス(SLE)患者 T 細胞機能の異常、②SLE における T 細胞-B 細胞相互関係の解析、③SLE および膠原病間質性肺炎に対する新たな治療法の展望、④抗リン脂質抗体と関連する病態の解析、⑤抗リン脂質抗体症候群における自己抗体産生機構ならひに血管病変発現機構の解析、⑥多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)の病態解析、⑦PM/DM に合併する間質性肺炎の発症機序ならひに治療の検討、⑧シェーグレン症候群の組織障害機構の解析

以下の項目を全体研究として行った。

①膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対する新たな治療法を開発する目的で、タクロリムスの有用性について検討を開始した。②抗リン脂質抗体症候群の治療指針(案)の作製を引き続き行った。③抗リン脂質抗体測定法の標準化をすすめた。④SLE の疾患感受性遺伝子解析を、厚生労働科学研究費補助金による ヒトゲノム・再生医療等研究事業「SLE を中心とした自己免疫疾患感受性遺伝子の解明班(笹月健彦主任研究者)」との共同研究事業として継続した。

A.研究目的

本研究の目的は各々の自己免疫疾患における免疫系の異常の特徴を明らかにし、疾患特異的治療戦略を構築し、患者の QOL の向上を計り、さらには病気の治癒を目指す事である。

B 研究方法

昨年度にひきつづき、自己免疫疾患の中から研究調査の対象を全身性エリテマトーデス(SLE)、抗リン脂質抗体症候群(APS)、多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)、Sjogren 症候群(SjS)の4疾患に絞り、各々の疾患における免疫系の異常の特徴を明らかにし、疾患特異的治療戦略を構築し、患者の QOL の向上を計り、

さらには病気の治癒を目指すために以下の研究を行った。

- 1 HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットにおける CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能異常に関する研究。
- 2 PD-1 受容体欠損マウスにおける自己免疫性拡張型心筋症の解析。
- 3 CD25+CD4+T 細胞による CD4+T 細胞の増殖抑制メカニズムの解析。
- 4 免疫バランス(Th1/Th2 ハランス)の自己免疫病における意義。
- 5 全身性エリテマトーデス患者 T 細胞機能異常の分子機序に関する研究

- 6 クラスII HLA 分子を介したシグナル伝達による免疫制御機構に関する研究。
- 7 全身性自己免疫疾患における自己抗体産生機構についての研究。
- 8 抗リン脂質抗体産生を誘導する $\beta$  2-グリコプロテインI分子修飾に関する研究。
- 9 抗リン脂質抗体症候群の診断法 酸化LDL $\cdot\beta$  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。
- 10 抗プロトンヒン抗体の接着因子誘導に関する研究。
- 11 抗リン脂質抗体と血小板減少症の関連についての研究
- 12 膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対するタクロリムスの有用性に関する検討。
- 13 Amyopathic Dermatomyositis 患者血清中の新規抗 US 自己抗体に関する研究。
- 14 実験的自己免疫性筋炎(EAM)の作製と経時的病態解析に関する研究。
- 15 間質性肺炎画像の自動分析法の開発に関する研究。
- 16 シェークレン症候群唾液腺上皮細胞死における CD40 下流分子の解析に関する研究。
- 17 *Ltk* 遺伝子多型と自己反応性 B 細胞の増殖に関する研究。
- 18 候補遺伝子解析による SLE 疾患感受性遺伝子に関する研究。
- 19 SLE における多剤抵抗性遺伝子発現とその制御に関する研究。
- 20 ループス腎炎における Th1 細胞の動態

に関する研究。

- 21 細胞侵人性抗 DNA 抗体の病原性の研究。
- 22 全身性自己免疫疾患における自己抗体の網羅的検索に関する研究。
- 23 スタチン類の自己免疫疾患に対する治療に関する研究。
- 24 ループス腎炎腎内浸潤 T 細胞サイトカインの単細胞レベルでの解析。
- 25 シェークレン症候群唾液腺組織における TLRs 発現の検討に関する研究

### C. 研究結果と考察

HTLV-I env-pX 遺伝子がコートする p40Tax は複数の経路を介して宿主細胞のさまざまな遺伝子転写に影響を及ぼす。HTLV-I 感染者に限らず p40Tax の作用経路を模倣する分子異常が生じた場合、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞に機能障害が発生し、自己免疫疾患の発症に関与する可能性が考えられる。

PD-1 欠損マウスに発症する拡張型心筋症の原因である、抗心筋型トロポニン I 自己抗体の作用機序を明らかとした。心筋細胞のカルシウム電流が障害を受ける事により拡張型心筋症が発症しうることを示したものであり、これまで心臓移植しか治療法がなかったこの難治性疾患に対し、免疫抑制、自己抗体の除去、カルシウム電流の調節といった新たな治療法の可能性を開いた。

CFSE 染色による *in vitro* での細胞分裂回数の評価から、Treg はこれまで anergic とされてきたか、他の CD4<sup>+</sup>T 細胞の存在に依存して分裂していることか判明した。この分裂は IL-2 に依存していることか抗 IL-2 抗体を用いた実験から明らかになった。更に *in vivo* の cell transfer の実験を行い、Treg は allo



の CD25-CD4<sup>+</sup>T 細胞の存在によって分裂がより進むことが判明した。allo の T 細胞は活性化 T 細胞と考えられるため、今回得られた結果は炎症に依存して Treg が増殖するという、negative feedback のシステムの存在を示唆する。

VD3 を BMDC1 の誘導系に加えることによって、MHC class I や共刺激分子の発現増強を著しく抑制し、BMDC1 が本来示す Th1 や Tc1 の誘導促進効果も、強く抑制された。このことから、VD3 は IFN- $\gamma$  や IL-12 の作用抑制を介して DC1 誘導を阻害し、Th1 免疫を低下させている可能性が示された。次に、ナイーブ Th 細胞から、IL-2 と抗原あるいは抗 CD3 抗体で刺激する際に、VD3 を添加して、VD3 の T 細胞に対する直接作用を検討した。その結果、VD3 を添加することによって、IFN- $\gamma$  産生型 Th1 の誘導は抑制され、IL-4 産生型の Th2 細胞の誘導が亢進された。これらの結果から、VD3 は DC サブセットの誘導制御を介した間接的作用、あるいは T 細胞に対する直接作用を介して、Th1 免疫を抑制し、免疫バランス制御に影響を及ぼし得ることが明確にされた。

全身性エリテマトーデス(SLE)における末梢血 T 細胞機能の分子機序として、T 細胞レセプター・CD3複合体からの早期シグナル伝達に欠陥が存在し、解析した症例の60%に、TCR $\zeta$ 鎖の蛋白合成低下が、一部の症例には異常スプライシングを伴ったメッセージ異常が見いだされた。TCR $\zeta$ 鎖蛋白合成障害に、この異常スプライシングを受けた TCR $\zeta$ 鎖 mRNA ウェアラントかとのように関与しているかは不明である。その分子機序を明らかにするため、これらウェアラント mRNA を安定して発現する T 細胞株を樹立した。それら T 細胞株の TCR $\zeta$ 鎖 mRNA 安定性を検討した所、exon7(-)ウェアラント、short 3'-UTR ウェアラントの両者において不安定性が確認され、それら TCR $\zeta$ 鎖蛋白発現低下を引き起こしたものと考えられた。病態のエフェクター分子を明らかにする目的で、

これら2つの T 細胞株に共通して認められる発現異常分子を遺伝子チップを用いて解析し、シグナル伝達分子、転写因子、アダプター分子、サイトカイン、ケモカインなどの有望な分子が明らかとなった。

抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示する際に、HLA クラス II 分子を介して抗原提示細胞側にも刺激が入ることか明らかになってきている。HLA クラス II 分子は、IFN の刺激によりヒト繊維芽細胞上にも発現するか、その機能については不明であった。本分科研究では、抗原提示の際の HLA-DR 分子を介したシグナルにより繊維芽細胞が RANTES などを産生し、これには JNK-2 の活性化が関与することを明らかにした。

自己抗体産生制御機構を解明するために、CD40L トランスジェニックマウスにおける B リンパ球自己トレランス異常と産生される自己抗体の性状について検索した。その結果、自己抗体の親和性により、中枢リンパ組織または末梢リンパ組織でトレランスが誘導されることか明らかとなり、異常となっている自己トレランス機構の同定には、親和性によく依存するアッセイ系が有用であることか明らかとなった。

DRB4\*0103 を持つ健常人 6 名を対象とし、末梢血単球から作成した樹状細胞、マクロファージを APC として用いた。これら APC にフォスファチシルセリン・リポソームに結合させた  $\beta_2$ GPI をパルスし、IL-2 存在下で自己末梢血 CD3<sup>+</sup>T 細胞と共培養した。T 細胞を回収し、native な  $\beta_2$ GPI、リコンヒナント・ $\beta_2$ GPI 断片、p276-290 をパルスした自己 B 細胞と培養し、上清中に産生された IFN- $\gamma$  を測定した。その結果、p276-290 に対する T 細胞の特異的反応は樹状細胞を用いると 4 例、マクロファージを用いると 1 例で検出された。このようにリン脂質に結合した  $\beta_2$ GPI で健常人 T 細胞を感作することにより、 $\beta_2$ GPI に対する T 細胞のプライミングを誘導してきた。 $\beta_2$ GPI が陰性荷電を有する外

来微生物成分やアポトーシス細胞と結合して強力な抗原提示能を持つ樹状細胞に取り込まれれば、 $\beta_2$ GPI 反応性 T 細胞の活性化を介して APS の発症につながる可能性が考えられた。

酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複合体(抗原)は SLE や APS のみならず、酸化ストレスが発症に関与すると考えられる糖尿病や梅毒患者で見られ血管内皮傷害に関連していることが示唆された。抗酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複合体抗体に関しては、APS で高率に検出され、特に動脈血栓との関連が示された。PON 活性は抗酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複合体抗体との間で負の相関を、また、PAF-AH は逆にこれと正の相関を認めた。これら種々の酸化ストレス、炎症、あるいは動脈硬化の進展に関連する因子の測定により、動脈硬化性疾患の診断の可能性が示された。

陰性リン脂質および  $Ca^{2+}$  依存性にヒトプロトンピンとのみ結合する aPT#1 は血管内皮からの ICAM-1, VCAM-1 発現を有意に増強した。このタイプの抗プロトンピン抗体添加により血管内皮活性化が生じ、接着分子の発現が亢進して白血球(単球) $\cdot$ 血小板との相互作用により血栓が生じる可能性が示唆された。

抗リン脂質抗体は APS 患者を除外しても血小板減少症と関連していた。また、血小板減少を認めた患者のなかで aPL の存在は明らかに血栓症/妊娠合併症のリスクであった。したがって抗リン脂質抗体陽性の(自己免疫)血小板減少症の患者は ITP とは別の疾患概念で考えたほうがそのマネジメントの確立に有利であると考え、血栓/妊娠合併症のリスクとしての「抗リン脂質抗体関連血小板減少症」という症候群に分類することを提唱する。

タクロリムスの有用性に関する検討を後ろ向き評価によりおこなった。8例(皮膚筋炎3例など)を対象とし、臨床効果を評価した。7例のうち1例においては、タクロリムス開始後症状・呼吸機能 $\cdot$ CT 上変化は見ないものの KL-6 値が

上昇を続け 7 週間後にプレトニンの増量を必要としたか、残り 6 例全例で KL-6 値低下(平均低下率 -31%)、呼吸機能検査が行われた 3 例全例で%VC (平均上昇率 23%)及び%DLCO (平均上昇率 39%)の改善が見られ、症状及び CT 所見も安定又は改善を来した。これらは本病態におけるタクロリムスの有用性を示唆するものである。

Amyopathic DM 患者 15 例中 8 例(53%)が免疫沈降法で 140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗体(抗 US 抗体)を認めた。抗 US 抗体陽性 8 例中 7 例で、IP を併発しており、うち 4 例は急性間質性肺炎であった。すなわち Amyopathic DM 患者血清中に、140kDa 蛋白を認識する新たな自己抗体(抗 US 抗体)の存在が示唆された。

実験的自己免疫性筋炎(experimental autoimmune myositis, EAM)における免疫学的病態の経時的解析を行った。罹患筋組織では、初期には主に CD8 陽性 T 細胞とマクロファージの浸潤が認められ、炎症極期には主に CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞とマクロファージの浸潤が認められた。C 蛋白誘導性 EAM の病態形成には病初期からのマクロファージの関与が重要と考えられた。

間質性病変の CT 像のコンピュータを用いた定量評価を試みた。新規開発したホリウムヒストグラム法を用いて各種間質性肺疾患において 3 種の特徴量(Contrast, Entropy, Variance)の算出を行い、その傾向を比較した。さらに、膠原病に伴う Non-specific Interstitial Pneumonia(NSIP)6 症例におけるステロイド治療前後の特徴量の変化を検討した。その結果、NSIP の 6 症例全てにおいてステロイド治療後に Contrast が上昇し、Variance と Entropy が低下した。これよりホリウムヒストグラムを用いた特徴量解析による自動診断の可能性が示唆された。

シェーグレン症候群液腺上皮細胞死には

IFN $\gamma$ , Fas/FasL, CD40/CD40L, c-FLIP, p38MAPK などの分子が関与していることが示唆された。SS 唾液腺においてこれら分子の発現を調節することによる分子標的治療法の開発の可能性を模索する。

SLE 自然発症 New Zealand マウス系を用いて、自己反応性 B 細胞の増殖に係わる感受性遺伝子のゲノムワイドな連鎖解析を行った。その結果、第 2 染色体上にコードされる *Ltk* (leukocyte tyrosine kinase) 遺伝子の kinase domain に見られる NZB 型多型が、PI3 kinase の活性化を介して自己反応性 B1 細胞の増殖をきたす遺伝的要因となっている可能性が示唆された。さらに、ヒトにおいても *Ltk* 遺伝子多型と SLE の相関が認められた。

*FCGR2B-232T* は東～東南アジア集団共通の SLE 感受性遺伝子であり、B 細胞の抑制シグナルの減弱により、SLE 発症に関連すると考えられることが明らかになった。また、*CD72* 多型は、スプライシング効率への影響を介して、SLE の臨床病型に関連することか示唆された。

健常人末梢血リンパ球は P 糖蛋白質を発現しなかったか、SLE リンパ球は、P 糖蛋白質発現率が高く、活動期症例で高度で、SLEDAI と正相関した。リンパ球を IL-2 や IL-4 等で刺激すると、*MDR1* 特異的転写因子 YB-1 の核内移行、*MDR-1* 転写、P 糖蛋白質発現、細胞内ステロイド濃度低下が誘導された。また、ステロイド不応性の活動期 SLE の P 糖蛋白質発現は、パルス療法を含む強化療法の反復にて減弱し、治療反応性や臨床症状改善が得られた。以上、疾患活動性の高い SLE 患者リンパ球は、活性化刺激により P 糖蛋白質が誘導されて治療不応性に陥るか、パルス療法や免疫抑制薬等による強化治療により P 糖蛋白質抑制を介して治療不応性の解除が可能であり、P 蛋白質発現の評価は、薬剤不応性の予測、治療方針決定に有用であると考えられた。

ループス腎炎 WHO IV 型における Th1 細胞を IFN $\gamma$  /IL-13 の細胞内染色により識別し、その動態を血中の CD62L の発現、MCP-1 の測定、*in vitro*における IFN $\gamma$  の産生を測定することにより検討した。WHO IV 型では血中の Th1 細胞が増加していたか、Th1 サイトカインの IFN $\gamma$  は増加していなかった。血中の CD62L 陽性細胞は増加しておらず局所嗜好性を示し、MCP-1 は高値であり局所への移行の可能性が示唆された。

正常免疫グロブリンは細胞内に直接的には侵入しにくいですが、陽性荷電の強い SLE 抗 DNA 抗体は細胞内に侵入しやすいことを見出した。抗 DNA 抗体は T 細胞にも侵入し、CD3 を介する細胞増殖や T 細胞における IL2 産生を増強させた。SLE における自己抗体の未知であった病態への関与様式とされる。

酸化ストレスによって修飾された蛋白が新たな抗原性を獲得する可能性のあることか、自己免疫疾患患者血清を用いた解析で明らかになった。このことは、蛋白の酸化が、生体内において自己免疫応答の誘導あるいは緩解に関与している可能性を示唆する。

スタチン類の多面的効果としての免疫抑制作用の解析について、今回はループスモデルマウス (MRL-*lpr/lpr*) に対して治療効果を示すか否かを検討した。フルハスタチン投与開始 8 週間後にはコントロール群と比較して生存率の延長、尿一般検査で蛋白尿と潜血反応との改善、さらに血清 BUN の正常化が認められた。フルハスタチンは、少なくとも短期的には MRL-*lpr/lpr* マウスに対して治療効果を示した。

ループス腎炎患者の腎内浸潤 T 細胞は、Th2 タイプ (または調節性) の T 細胞として作用し、ループス腎炎の発症進行に関与している可能性が示唆された。

シェーグレン症候群患者唾液腺組織に発

現する TLRs は MAPK superfamily を介してサイトカイン産生や細胞浸潤を促進し、SS 唾液腺の慢性炎症を増強していることが示唆された。

## E.結論

- 1 CD25+CD4+T 細胞をはしめとする調節性 T 細胞や T 細胞機能異常として自己免疫疾患をとらえることの重要性が明らかになった。
- 2 免疫調整分子としての PD-1 の重要性が明らかになった。
- 3 T細胞-B細胞相互作用やB細胞の機能分子の異常か自己抗体産生に関与することの重要性が明らかになった。
- 4 抗リン脂質抗体症候群における対応抗原の解析が進展した。
- 5 抗リン脂質抗体症候群や関連疾患の新しい疾患分類が詳細に検討された。
- 6 PM/DM の間質性肺炎に対する新しい画像評価法や治療法の可能性が示された。
- 7 SLE の遺伝子異常の解析が進展した。
- 8 SLE におけるステロイド抵抗性と多剤耐性遺伝子の関係が明確になった。
- 9 SjS の組織障害の機序の解析が進展した。
- 10 タクロリムス、スタチン等、既存薬で自己免疫疾患の治療に使用可能なものか明らかになってきた。

### (3) 全体研究報告書

## ループスアンチコアラントの標準化について(中間報告)

### 研究要旨

本研究班の全体研究の目的のひとつは、抗リン脂質抗体症候群(APS)の診断基準と治療指針の整備である。APSは血栓症/妊娠合併症などの臨床症状と、抗リン脂質抗体の存在によって診断される。抗リン脂質抗体は免疫学的検出法(ELISA)と凝血学的検出法(ループスアンチコアラントLA)とがあるか、特にLAは疾患を定義する検査でありながら、その標準化は困難でありこの分野の長期の課題であった。本研究班では、血栓止血学会学術専門委員会抗リン脂質抗体標準化検討部会および検査血液学会との合同でLAのわか国での標準化にとりくんだ。全国の主要施設にLAの実施法についてサーベイをおこない、その結果にもとづいてLAスクリーニング用の候補試薬を選定した。11施設に試薬とLAサンプルを送付して凝固検査をやっていたときその結果を集計した。スクリーニング試薬の標準品としての条件は、①廉価である、②入手しやすい、③感度が高い、④測定結果の施設間差が少なく判定の一致率の高いこと、である。6試薬の比較から、PTT-LAをスクリーニング標準品とした。

たまたこのことは、他の試薬を排除するものではなく、あくまである試薬を「LAスクリーニングの標準品」とすることによって検査の標準化をはかる、ということであり、他の試薬を用いる場合は標準品との比較検討をふまえたうえでおこなうのであればLAの診断に何ら問題がないものとする。

今後は、さらに多施設による検討、また確認試験の標準化をすすめる予定である。

### A.研究目的

本研究班の全体研究の目的のひとつは、抗リン脂質抗体症候群(APS)の診断基準と治療指針の整備である。

APSは血栓症/妊娠合併症などの臨床症状と、抗リン脂質抗体の存在によって診断される。抗リン脂質抗体は免疫学的検出法(ELISA)と凝血学的検出法(ループスアンチコアラントLA)とがある。国際的に利用されているAPSの分類基準案(Sapporo Criteria)では、IgGまたはM型 $\beta$ 2-クリコプロテイン1依存性抗カルシオリピン抗体陽性またはLA陽性が検査項目として必須となっている。前者は比較的標準化がすすんでおり、測定キットが普及している。一方、LAは1995年に国際血栓止血学会の標準化委員会か、①リン脂質依存性凝固時間でスクリーニング、②ミキシ

ンクテストでインヒビターであることを確認、③リン脂質添加試験で凝固時間異常が是正されることを確認、という手順で検出することを推薦しているか、用いる凝固時間試薬や測定条件によって結果が大きくことなり、施設間差が極めて大きい難しい臨床検査と認識されている。

本研究班では血栓止血学会学術専門委員会抗リン脂質抗体標準化検討部会および検査血液学会との合同でLAのわか国での標準化にとりくんだ。その途中経過を報告する。

### B.研究方法

当研究班員、血栓止血学会および検査血液学会評議員の計284人に、LAのスクリーニング試薬として何を使用しているか、という設問を含

めたアンケート調査をおこなった。返答のあった59施設で使用されている試薬のうち、多く使用されている、入手しやすい、廉価である、を条件として4試薬を選定した。サンプルとともにこれらの試薬を11施設に送付し、凝固時間を測定いただいた。

標準化で用いたサンプルを表1に示す。いずれもインフォームトコンセントの得られた患者あるいは健常人から採取、調整した。人工的LA血漿は、当班研究で作成した強いLA活性をもつホスファチシルセリン依存性モノクローナル抗プロトンヒン抗体(aPS/PT)である23-1Dを正常血漿に加えて作成した。高力価LA血漿は50 $\mu$ g/ml、低力価LA血漿は10 $\mu$ g/mlに23-1Dを調節した。

APTTについては、スクリーニング時に施行されている希釈APTT(オーレンバッファーを同時に送付してAPTT試薬を25倍希釈して凝固時間を測定)を施行いたいたが、PTT-LAはすでにリン脂質濃度が低く設定されているためPTT-LAを用いた希釈APTTはおこなわなかった。表2に示すように、4試薬6アッセイで結果を比較した。

凝固時間の正常値は健常人22人の平均プラス2SDで定義した。11施設で測定したそれぞれのサンプルの凝固時間を集計し、パラメータとして、1) それぞれの試薬ごとに感度(LAサンプルすべて、低力価2サンプル、高力価3サンプルでそれぞれ計算)、2) 特異度、3) 平均正答率A-Hのサンプル毎の11施設における正答率を平均した数値(高いほど正確)、4) SD index A-Hのサンプルの11施設での凝固時間SD/凝固時間平均 $\times$ 100を8サンプルで平均した数値(施設間での当該サンプルの凝固時間測定値のはらつきをあらわす)、を計算した。

### C. 研究結果

サンプルことの11施設で測定した凝固時間を試薬別にまとめた(表3)。凝固時間の平均とSD、また括弧内には11施設での正答率を示した。

試薬ことの感度、特異度、平均正答率、SD-indexを表4に示した。

### D 考察

スクリーニング試薬の標準品としての条件は、①

廉価である、②入手しやすい、③感度が高い、④測定結果の施設間差が少なく判定の一致率の高いこと、と考えられる。基本的に凝固検査はLAのスクリーニング検査としては現時点で健保適応はない。各施設で検討のうえLAスクリーニング検査を施行していると考えられる。実際に使用されている試薬をアンケート調査してらへて、廉価で入手しやすい試薬を標準試薬の候補として選定した。

ラッセル蛇毒時間はかつては試薬の調整が煩雑であったか、現在はキットとして発売され、そのうちのひとつはLA確認試験として保険適応となっている。キットは入手が容易であり、その中にある試薬のひとつはスクリーニングとしても適している可能性があるか、本試薬はきわめて高価であること、ラッセル蛇毒試薬間での比較かてきないことから、今回は検討しなかった。

カオリン凝固時間はAPTTと同様に内因系凝固反応のインヒビターを検出する。しかし試薬にリン脂質が含まれず、血漿に内因性のリン脂質をもちいて反応がすすむので反応は遅くて不安定である。今回の検討でも施設間差が大きく、標準品にはむかえないと考えられる。

APTT試薬についても、われわれの予想よりかなり施設間差がみられた。希釈するとLA検出感度があがるはずであるが、試薬に含まれる凝固安定剤も希釈されてしまうため反応が不安定になりやすい。そのため健常人の凝固時間のはらつきが大きくなって正常値の設定がむずかしくなる。結果として、希釈APTTはかならずしも感度があからず、施設間差が大きいという結果となった。

今回の検討で、上記の条件をもっとも満たすのかPTT-LA試薬と考えられる。そこでPTT-LAをLAスクリーニングと標準品として設定し、アッセイのプロトコール、および確認試験の標準化へと検討をすすめていきたい。

## E. 結論

PTT-LA 試薬を LA スクリーニングのための標準試薬として、より標準化された LA 検査の確立をめさす。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## H 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

### 1. 特許取得

特記事項なし

### 2. 実用新案登録

特記事項なし

### 3 その他

特記事項なし

(謝辞)

本研究のアッセイにご協力いただいた以下の皆様に深謝する。

川合陽子先生、島田舞先生  
(慶應義塾大学中央臨床検査部)

阪田敏幸先生  
(国立循環器センター臨床検査部)

佐野雅之先生 (佐賀医科大学血液内科)

程原佳子先生 (滋賀医科大学輸血部)

吉田孝先生 (同検査部血液部門)

瀧正志先生 (聖マリアンナ大学小児科)

山崎哲先生 (同臨床検査部)

松林秀彦先生 (東海大学産婦人科)

川田勉先生 (同臨床検査科)

杉浦真弓先生(名古屋市立大学産婦人科)

家子正裕先生 (北海道医療大学内科)

内藤澄悦先生 (同検査部)

和田英夫先生 (三重大学臨床検査医学)



表1 測定検体

検体	期待されるスクリーニング検査結果
A 低力価 LA 患者血漿 (ワーファリン使用なし)	陽性
B 健常人血漿	陰性
C モノクローナル aPS/PT 添加低力価 LA 血漿	陽性
D 高力価 LA 患者血漿 (ワーファリン使用)	陽性
E LA 陰性患者血漿 (ワーファリン使用)	(偽)陽性
F モノクローナル aPS/PT 添加高力価 LA 血漿	陽性
G 高力価 LA 患者血漿 (ワーファリン使用なし)	陽性
H 健常人血漿	陰性

表2 使用した試薬

試薬名	発売元	凝固検査法
プラテリン LS	オルカノンテクニカ	APTT
希釈プラテリン LS	オルカノンテクニカ	希釈 APTT
トロンホチェック	国際試薬	APTT
希釈トロンホチェック	国際試薬	希釈 APTT
PTT-LA	ロシュタイアクノスティックス	(希釈)APTT
カオリン溶液	ヘーリンカーマンハイム	KCT

表3 結果のまとめ

	プラテリン IS	希釈プラテリン LS	トロンボチェック	希釈トロンボチェック	PTT-LA	カオリン
項目	38±13	125±58	34±8	137±77	47±11	184±67
A	53±20(55)	168±145(18)	39±10(18)	271±161(73)	65±13(91)	376±173(91)
B	42±15(73)	115±66(100)	35±7(100)	139±80(100)	48±12(100)	259±139(55)
C	47±18(36)	185±151(46)	37±9(9)	203±134(36)	60±11(55)	284±116(60)
D	94±58(100)	243±196(73)	62±14(100)	680±325(100)	114±25(100)	800±404(100)
E	66±12(100)	188±146(46)	67±28(100)	263±153(73)	95±40(100)	251±140(36)
F	52±15(64)	223±225(46)	43±13(64)	263±184(73)	75±17(100)	402±174(100)
G	59±25(64)	168±149(18)	41±12(46)	306±164(82)	80±17(100)	473±171(100)
H	43±14(91)	160±163(82)	35±7(100)	181±106(82)	55±10(82)	242±138(64)

11 施設で凝固時間を測定 平均±SD 秒(11 施設での正答率 %)

表4 パラメータの比較

試薬	感度			特異度	平均正答率*	SD index**
	全体	低力価	高力価			
プラテリン LS	70	46	66	82	70.5	27.9
希釈プラテリン LS	44	32	36	91	53.4	43.2
トロンボチェック	53	14	62	100	67.0	13.8
希釈トロンボチェック	73	55	66	91	73.9	34.7
PTT-LA	91	77	100	86	90.1	11.6
カオリン 溶液	82	76	84	59	75.9	27.9

\*平均正答率 A-H のサンプル毎の 11 施設における正答率を平均した数値

\*\*SD index A-H のサンプルの 11 施設での凝固時間 SD/凝固時間平均×100 を 8 サンプルで平均した数値で、施設間での当該サンプルの凝固時間測定値のはらつきをあらわす

(4) 分担研究報告書

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

自己免疫疾患を発症する HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットに認める  
CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞機能異常に関する研究

分担研究者 石津 明洋 北海道大学大学院医学研究科病態解析学講座分子病理学分野 講師

研究要旨

自己免疫疾患を発症する HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラット(env-pX ラット)では、疾患発症前から CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 免疫制御性 T 細胞に機能障害が認められる。同系正常ラットとの骨髄置換実験の結果から、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能障害には同細胞における env-pX 遺伝子発現が重要な役割を果たしており、胸腺での分化成熟過程の異常が直接的な原因ではないと考えられた。また、cDNA アレイやフローサイトメトリー、定量的リアルタイム RT-PCR を用いた分子解析の結果、env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では、同細胞の機能発現に関与する CTLA-4、Foxp3、GITR の遺伝子発現が低下しており、さらに、炎症性サイトカインのシグナルを抑制する SOCS ファミリー分子の遺伝子発現が著明に低下していること等が明らかになった。

A 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス HTLV-I の env-pX 遺伝子を導入したトランスジェニックラット(env-pX ラット)は、関節炎や壊死性血管炎など種々の自己免疫疾患を発症する。これまでに、本ラットにおける末梢リンパ球や胸腺の異常を示し、昨年度は、本ラットにおいて疾患発症前から CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 免疫制御性 T 細胞に機能障害があることを明らかにした。本研究では、env-pX ラットに認められる CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能障害に関わる分子異常について検討した。

B 研究方法

疾患未発症の env-pX ラットと同系正常 WKAH ラットの間であらかじめ骨髄置換を行い、生着後のラットから magnetic cell sorting により CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞を採取して、同細胞の機能障害の有無を検討した。また、疾患未発症の env-pX ラットおよび WKAH ラットの脾臓から CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞を採取し、同細胞の機能発現に関わる各種分子群について、cDNA アレイやフローサイトメトリー、定量的リアルタイム RT-PCR の手法を用いて比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

北海道大学動物実験指針に基づいて行った。

C 研究結果

- 1) 致命的放射線照射後に WKAH ラットの骨髄を移植した env-pX ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞では免疫反応抑制機能が保たれていたか、env-pX 骨髄を移植した WKAH ラットでは同細胞の機能障害が認められた。
- 2) cDNA アレイを用いた解析では、env-pX ラット CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の遺伝子発現プロファイルは、WKAH ラットの CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞や、IL-2 により活性化した CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞のそれとは大きく異なっていた。
- 3) CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能に関わるとされる TCR、CD28、CD45RC、CD80、CD86、膜結合型 TGF β の細胞表面における発現は env-pX ラットと WKAH ラットの違いに差がなかった。しかしながら、env-pX ラットでは CTLA-4、Foxp3、GITR の mRNA 発現が低下しており、加えて炎症性サイトカインのシグナルを抑制する SOCS ファミリーの各遺伝子発現が著明に低下していた。