

傾向として主として Ground-Glass shadow を示すものに比べて Entropy が高くなつたと考えられる。Fig 7 に各種間質性肺疾患におけるホリウムヒストグラムの傾向を簡易的に表した簡易ヒストグラムシエマを示す。

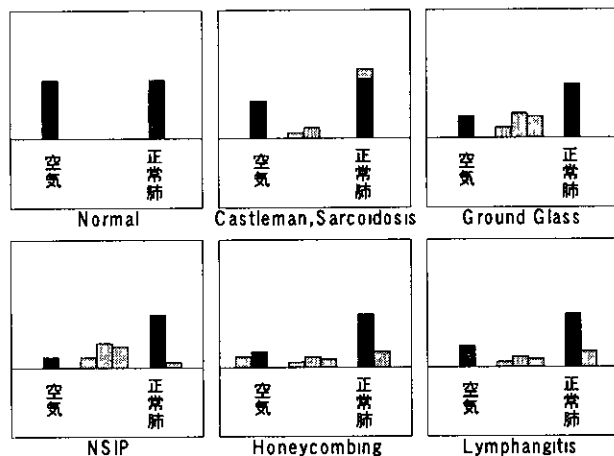


Fig 7 各種間質性肺疾患における簡易ヒストグラムシエマ

NSIP では non-segmental な高吸収領域が肺野領域の広範囲に存在することが多いため<sup>d)</sup>、Variance・Entropy は高いと考えられる。また、繊維化の程度は比較的均一であり、Ground-Glass shadow がみられる場合、正常肺に比べて Contrast が低くなると考えられた。ステロイド治療後は強い高吸収領域は消失し、多少の Ground-Glass shadow を残すのみで、所見の改善が顕著であるため<sup>d)</sup>、Variance・Entropy が低下し、Contrast が上昇した。

今回はレトロスペクティブに抽出した症例を用いて検討を行ったが、今後、同条件で治療を行い、プロスペクティブに特徴量解析を行うことで、特徴量解析のさらなる定量的な評価が期待できる。また、本手法においては統計量のみに基づく特徴量の算出を行うため、位置情報が考慮されていない。何らかの形でこの位置情報を特徴量に付加することにより、より正確な定量評価が可能となるであろう。

ホリウムヒストグラムを用いた特徴量解析による定量的診断の可能性が示唆されたことから、この方法により、間質性肺炎に対する

新規治療薬の有効性の客観的評価が可能であると考えられる。特に、Ground-Glass shadow を有する症例群に関しては、特徴量解析により、治療効果の評価ができる可能性が高い。今後、この方法を用いて、IL-6 レセプター抗体のみならず、タクロリムスなどの免疫抑制剤による、膠原病に合併した間質性肺病変の治療の効果を検討したい。

## 参考文献

- a) 画像処理標準テキストブック編集委員会 イメージプロセッシング 画像処理標準テキストブック。財団法人画像情報教育振興協会 p151-153, 1999
- b) 画像処理標準テキストブック編集委員会 イメージプロセッシング 入門編画像処理標準テキストブック講師手引書 財団法人画像情報教育振興協会 p82-87, 1997
- c) 酒井幸市 デジタル画像処理入門。CQ 出版 p38-44, 2002
- d) 池添潤平、村田喜代史 肺の CT。医学書院 p283-290, 1998

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T Interleukin-6 In *Smolen J, Lipsky P, eds Targeted Therapy in Rheumatology London Martin Dunitz*, 2003, 231-241
- 2) Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda K, Kuritani T, Deguchi H, Sato B, Imai N, Suemura M, Kakei T, Takagi N, Kishimoto T Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti-Interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis Phase I/II clinical study *J Rheum*

2003, 30 1426-1435

- 3) Goya S, Matsuoka H, Mori M, Morishita H, Kida H, Kobashi Y, Kato T, Taguchi Y, Osaki T, Tachibana I, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kawase I, Hayashi S Sustained interleukin-6 signaling leads to the development of lymphoid organ-like structures in the lung *J Pathol* 2003, 200 82-87
- 4) Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor (VEGF) production in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 2003, 48 1521-1529
- 5) Saeki Y, Mima T, Ishii T, Ogata A, Kobayashi H, Oshima S, Ishida T, Tabunoki Y, Kitayama H, Mizuki M, Takada Y, Asaoku H, Kitano M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda M, Kon S, Kinoshita N, Uede T, Kawase I Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma clinical and pathogenic implications *Br J Haematol* 2003, 123 263-70
- 6) Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin 6 receptor antibody *Arthritis Rheum* (in press)
- 7) Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, Matsumoto T, Yamamura T, Azuma J, Nishimoto N, Yoshizaki K, Shimoyama T, Kishimoto T A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn's Disease *Gastroenterol* (in press)
- 8) Mihara M, Shiina M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Akamatsu K Anti-interleukin-6 receptor antibody inhibits murine AA-amyloidosis *J Rheum* (in press)

## 2. 学会発表

- 1) Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Kishimoto T, 67th National Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology Long-term safety and efficacy of anti-interleukin 6 receptor antibody (MRA, Atlizumab) in patients with rheumatoid arthritis Orland, U S A 2003 10 23-28
- 2) Norihiro Nishimoto, American Society of Hematology 45th ASH Annual Meeting and Exposition The long-term safety and efficacy of humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, MRA in multicentric castlemans disease San Diego, U S A 2003 12 5-9
- 3) 西本憲弘 第47回日本リウマチ学会・シンポジウム「リウマチ薬物治療の最近の進歩」抗IL-6レセプター抗体 東京 2003 4 24-26
- 4) 西本憲弘 第47回日本リウマチ学会・シンポジウム「EBMに基づくリウマチ治療」抗IL-6R抗体療法はTNF阻害療法とどこか違うか 東京 2003 4 24-26
- 5) 西本憲弘, 第6回造血器腫瘍シンポジウム IL-6を標的とする分子治療 基礎から臨床へ 東京 2003 6 7
- 6) 西本憲弘, 第24回日本炎症・再生医学会・シンポジウム「生物製剤による炎症制御」IL-6レセプター抗体(MRA)を用いた関節リウマチの治療 京都・京都国際会議場 2003 11 26-27
- 7) 西本憲弘, 第33回日本免疫学会 モノクローナル抗体を用いた免疫難病の治療 福岡・福岡国際会議場 2003 12 8-10
- 8) 西本憲弘, 第15回中之島リウマチセミナー 抗IL-6治療 大阪・大阪国際会議場 2003 12 13-14

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録

なし

**Clinically Amyopathic Dermatomyositis患者血清中に  
見出された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(慶應義塾大学医学部・内科)

**研究要旨**

【目的】多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)において間質性肺炎(Interstitial Pneumonia, IP)は、重要な予後因子であるか、特に、筋炎症状に乏しい DM (Amyopathic DM, ADM) 症例に治療抵抗性の急速進行性間質性肺炎(Acute Interstitial Pneumonia, AIP) を合併することが知られている。かかる症例では、抗核抗体陰性が特徴とされてきたが、その詳細は不明である。本研究は、白血病細胞由来 K562 細胞を用いて ADM 患者血清中の自己抗体の追究を目的とした。【方法】自己抗体の検索は、白血病細胞由来 K562 細胞を用いた <sup>35</sup>S メチオニン標識免疫沈降法でおこなった。これらの方法で、K562 細胞成分中の蛋白を認識した症例の臨床症状、検査所見、経過、治療、予後などについて検討した。【結果】1 C-ADM 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。2 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 AIP であった。また、2 例で、シクロスポリン (CyA) が有効であった。3 抗 US 抗体は、C-ADM 患者に特異的に検出された。【考察】ADM 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。

**A.研究目的**

IP は、膠原病各疾患において重要な予後規定因子であるが、その発症機序は未だ不明である。PM/DM に併発する IP は多彩な病態を示すことが知られており、これまで報告されている抗アミノシル tRNA 合成酵素抗体(抗 ARS 抗体)は、その診断、病型分類、臨床経過の予測などに有用とされている。近年、筋炎症状に乏しい DM (ADM) 症例に治療抵抗性の AIP が合併することが報告されている。かかる症例では、自己抗体陰性が特徴とされているが、その詳細は不明である。そこで本研究は、白血病細胞由来 K562 細胞を用い、ADM 患者血清中の自己抗体の追究を目的とした。

**B.研究方法**

**I. ADM 患者血清中の自己抗体の追究:**

教室および共同研究施設の膠原病および健康人 314 例を対象とした (PM 61, DM 42

(C-ADM 15 を含む)、関節リウマチ 50, 全身性エリテマトーデス 46, 混合性結合組織病/重複症候群 27, 全身性強皮症 22, シェークレン症候群 7, IP 43, 健康人 16 例) 自己抗体の検索は、白血病細胞由来 K562 細胞抽出物を用いた <sup>35</sup>S メチオニン標識免疫沈降法でおこなった。

**II. 140kDa を認識する自己抗体陽性**

**C-ADM 患者の臨床特徴の検討:**

免疫沈降法で、K562 細胞成分中の蛋白成分を認識した症例の臨床症状、検査所見、経過、治療、予後などについて検討した。

**C.研究結果**

**I. C-ADM 患者血清中の自己抗体の追究:**

**(i) K562 細胞を用いた C-ADM 血清中の自己抗体の追究**

白血病細胞由来 K562 細胞抽出物を基質とした免疫沈降法で、C-ADM 患者血清 8 例か約

140kDa 蛋白を沈降した(図 1) そこで、この新たな自己抗体を抗 US 抗体と命名した

## (ii) 抗 US 抗体の疾患別頻度

抗 US 抗体は、DM42 例中 8 例 (19%) に認め、その全 8 例は、C-ADM 症例であった また、これまでの検討では、C-ADM 以外の膠原病および健常人では認められなかった

## II. 抗 US 抗体陽性 C-ADM 患者の臨床的検討:

### (i) 抗 US 抗体陽性 C-ADM 患者の臨床特徴(表 1)

抗 US 抗体陽性 C-ADM 患者 8 例の臨床特徴をまとめた 全例で、ゴットロン徴候あるいはヘリオトロープ疹を認め、皮膚生検においても DM に特徴的な所見であったか、筋力低下は 2 例に軽度認めるのみであった 最大クレアチンキナーゼ(CK)値も、6 例は正常範囲内、他の 2 例も軽度の上昇であった 筋生検は 5 例で施行されたが、2 例で、軽度の炎症細胞浸潤などの筋炎の所見を認めた レイノー現象を 1 例、関節炎を 4 例に認め、他の自己抗体は、抗核抗体/抗 SS-A 抗体か 1 例、抗核抗体か 1 例にのみ陽性であった

### (ii) 抗 US 抗体陽性 C-ADM 患者に併発する間質性肺炎の特徴

8 例中 7 例で IP を併発しており、その臨床特徴をまとめた 7 例中 4 例は AIP たった KL-6 は測定した全例で高値を認めた AIP と診断された 4 例は、パルス療法を含むステロイド大量療法にシクロスポリン(CyA)を併用する強力な治療が行われ、2 例で CyA が有効であった

### (iii) 抗 US 抗体陽性および陰性 C-ADM に併発する IP の臨床特徴の比較

1998 年から当教室で経験した C-ADM 15 例の臨床特徴をまとめたところ、15 例中、13 例 (87%) で IP を併発しており、うち 5 例が AIP たった AIP 5 例中 4 例が抗 US 抗体陽性例で、同抗体陰性例は 1 例のみであった

## D. 考察

### I C-ADM 患者血清中の自己抗体の

#### 追究:

PM/DM の臨床的特徴は非常に、多彩なことか

知られているが、以前より、DM に典型的な皮疹を有しながら、筋症状を認めないか、あってもごく軽度である症例の存在が ADM として知られている しかしながら、かかる症例は、Bohan らの PM/DM の診断基準では、DM と診断されなかった Sontheimer は、臨床的に筋症状はないが、血液検査や筋電図所見などで、軽微な筋炎所見が認められる症例を hypomyopathic DM (HDM) とし、いわゆる ADM と HDM をあわせたものを臨床的には筋炎の所見がないことから、clinically ADM (C-ADM) と定義することを提唱した 140kDa 蛋白を免疫沈降した 8 症例は、いわゆる C-ADM の症例であった

ADM に AIP を併発することが知られているが、かかる症例は、従来、自己抗体陰性とされており、ADM に特異的な自己抗体はこれまで詳細に検討されていない 近年になり、ADM 患者における自己抗体の報告が散見されている Targoff らは、HeLa 細胞抽出物を基質とした免疫沈降法で、C-ADM 患者血清中の自己抗体を検討し、18 例中 13 例で 155 kDa 蛋白、6 例で 95 kDa (Se) 蛋白を認識する自己抗体を認めたと報告した 抗 155 kDa 抗体は、C-ADM 以外に小児 DM など DM に主に見出されたが、抗 Se 抗体陽性例は、全例 C-ADM 例で、既知の筋炎特異自己抗体は、陰性であったとしている

本研究では、白血病細胞由来 K562 細胞を基質とした免疫沈降法で C-ADM 患者血清中に、140kDa 蛋白に対する抗体の存在が示唆された抗 US 抗体は、これまでの検討で DM のサブタイプである C-ADM 以外の膠原病および健常人では認められず、C-ADM の疾患特異抗体である可能性が示唆された

### II 抗 US 抗体陽性 ADM 患者の臨床特徴:

抗 US 抗体陽性患者は、全例 DM に特徴的な皮疹を呈しながら、筋炎症状に乏しく、Sontheimer らが、提唱する分類の C-ADM に相当する症例であった 抗 ARS 抗体陽性症例とは異なり、レイノー現象、関節炎などの臨床症状および筋炎特異自己抗体を含め他の自己抗体の併存は低頻度であった

IPを8例中7例で併発しており、その7例中4例がAIPであったことが特徴的であった。一方、抗US抗体陰性のC-ADM患者7症例中、AIPと診断されたのは1例のみであった。症例数が少なく、統計学的に有意差はないが、抗US抗体とAIPとの関連が注目され、今後の症例の集積が課題である。KL-6は測定した全例で高値を示し、肺病変の増悪と平行して、KL-6値も上昇しており、間質性肺炎の活動性の指標として臨床上有用であることが確認された。AIPと診断された4例を含め、パルス療法を含むステロイド大量療法にCyAを併用する強力な治療が行われ、2例で有効であった。これまで、AIPに対するCyAの有効性が報告されているが、今回の検討でも、その有効性が示唆された。しかし、CyAの無効例もあり、かかる症例の診断と治療法の開発が望まれる。

### III.今後の展望

今後、抗US抗体陽性症例の集積とその対応抗原の追究・検討が課題である。抗US抗体の産生機序の追究は、C-ADMに合併するAIPの病態を解明する上で重要な課題と考えられ、この新たな自己抗体の同定は临床上、極めて予後不良とされるAIP併発C-ADMの早期診断・治療法の選択に有用と考えられ、その予後の改善につながるものと期待される。

### E.結論

1. C-ADM患者15例中8例(53%)で140kDa蛋白を認識する新たな自己抗体(抗US抗体)を認めた
2. 抗US抗体陽性7例は、IPを併発しており、4例はAIPだった。うち2例で、CyAが有効であった
3. 抗US抗体は、C-ADMの疾患特異抗体である可能性が示唆された

### F.健康危険情報

該当なし

### G.研究発表

#### 論文発表

- 1 平形道人 炎症性筋疾患(多発性筋炎・皮膚筋炎)の予後 リウマチ科 30(1) 35-42, 2003

- 2 平形道人 抗リボ核酸蛋白 (ribonucleoprotein RNP) 抗体 日内会誌 92(10) 1932-1940, 2003
- 3 佐藤慎二, 平形道人 Amyopathic dermatomyositis に特異的に見出される自己抗体 臨床免疫 2004 (in press)

### 学会発表

- 1 M Hirakata, A Suwa, S Sato, T Nojima, T Okada, Y Kawakami, M Nishikai, J A Hardin, I N Targoff New profiles of autoantibodies in the sera of Japanese patients with myositis 67th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct, 2003
- 2, S Sato, A Suwa, T Nojima, M Suzuki, Y Kaneko, M Kuwana, S Inada, M Akizuki, T Nishikawa, M Hirakata Clinical and immunological features of autoantibodies to the 140kDa polypeptide in patients with amyopathic dermatomyositis 67th Annual meeting of American College of Rheumatology, Oct, 2003

### H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

#### 特許取得

該当なし

#### 実用新案登録

該当なし

#### その他

該当なし

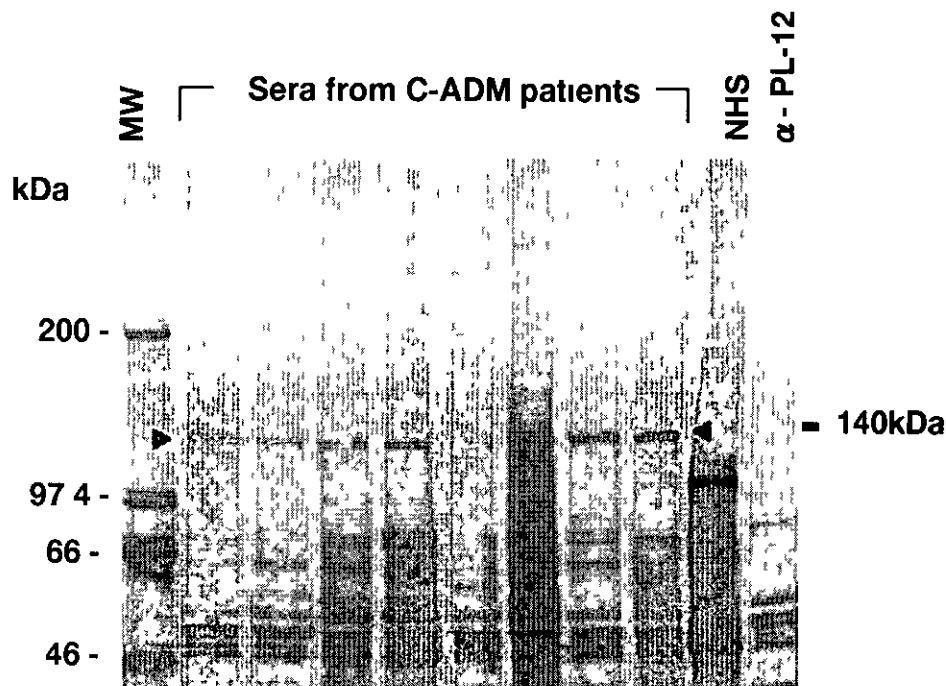


図1 ADM患者血清が免疫沈降する蛋白成分  
免疫沈降法による蛋白成分の分析では，ADM患者血清  
8例で約140kDa蛋白を沈降した

表1. 抗US抗体陽性C-ADM患者の臨床特徴

Patient no	1	2	3	4	5	6	7	8
	KH	US	YH	TS	YF	YO	AS	TN
年齢/性	62/F	56/F	39/M	52/F	19/M	51/F	39/F	47/F
コットン徴候	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
ヘリオトロープ疹	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
皮膚生検でDM所見	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
筋力低下	(-)	(-)	(-)	(±)	(-)	(±)	(-)	(-)
筋痛	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	(-)	(-)
最大CK値(IU/l)	85	68	167	185	238	138	47	57
筋原性変化(筋電図)	(-)	nd	(-)	(-)	(-)	(-)	nd	(-)
筋生検で筋炎所見	nd	nd	(-)	(-)	(±)	(±)	nd	(-)
レイノー現象	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
関節炎	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
他の自己抗体	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	ANA/SS-A	(-)	ANA

## 抗プロトロンビン抗体の接着分子発現に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 山崎 雅英 金沢大学大学院医学研究科細胞移植学・血液内科 助手

### 研究要旨

われわれはこれまでに抗プロトロンビン抗体(aPT)をその結合様式により4種類に分類し、臨床症状の出現頻度が異なることを報告してきた。今回、4種類のaPTの血管内皮における接着分子発現の相違につき検討し、接着分子の発現と臨床症状の関連につき解析した。その結果、PLおよびCa<sup>2+</sup>依存性にヒトプロトロンビンとのみ結合するaPT#1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)・血小板との相互作用により血栓が生じる可能性等が明らかになった。この結果は、これまでのわれわれの検討(antiPT#1陽性例では血栓症発症頻度が有意に高い)と合致するものであり、抗ICAM-1抗体などの接着分子抑制因子を用いることで血栓症発症を抑制できる可能性があることが明らかになった。

### A.研究目的

抗リン脂質抗体は健常成人にも検出され、抗体を有するものの血栓症や不育症などの臨床症状を来さない症例も経験される。われわれはこれまでに抗プロトロンビン抗体(aPT)をその結合様式により4種類に分類し、臨床症状の出現頻度が異なること、抗体により血管内皮細胞・単球・血小板を易血栓性に傾かせることを報告してきた(表1)。近年、抗リン脂質抗体症候群(APS)の血栓形成機序として細胞接着分子の関連が注目されている。今回、4種類のaPTの血管内皮における接着分子発現の相違につき検討し、接着分子の発現と臨床症状の関連につき解析した。

### B.研究方法

4種類のIgG型aPTは既報の方法により抗リン脂質抗体陽性患者血漿より分離精製した。すなわち、抗リン脂質抗体症候群症例ならびに健常成人より得た血漿をProtein Gカラムに用いてIgGを精製した。得られたIgGにつき、phosphatidylserine(PL)およびCaCl<sub>2</sub>存在下・非存在下でウシプロトロンビン affinityカラムを通し、eluteとbinding IgGに分類した。ウシウシプロトロンビン affinityカラムとPL, Ca<sup>2+</sup>存在下で結合し

たIgGをaPT#3, 非存在下で結合したIgGをaPT#4とした。ウシプロトロンビン affinityカラムを通過したeluteにつき、PL, Ca<sup>2+</sup>存在下・非存在下でヒトプロトロンビン affinityカラムを通し、結合したIgGを各々aPT#1, aPT#2とした。得られたaPT 100μg/mLをHUVECに添加、5%CO<sub>2</sub>, 37℃にて4時間インキュベーションしたあとプレートに固定し、マウス抗ヒトICAM-1およびVCAM-1抗体を加えたPox標識抗マウスモノクローナルIgGを加え発色させることにより4種類のaPT刺激による細胞接着分子発現量を測定した。LPS 3μg/mL添加群をpositive control, MCDB 110 medium添加群をnegative controlとした。得られた結果はmean±SDで表し、student's t-testにて統計処理し、p<0.05を有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

予めインフォームド・コンセントを得たのち、抗リン脂質抗体症候群症例ならびに健常成人より採血して得られた血漿を用いて本検討を行なった。

### C.研究結果

測定結果を表2に示した。Normal IgG添加群ではmedium群と比較して各接着分子発現の有意

な亢進はみられなかった。PL, Ca<sup>2+</sup>存在下でヒトプロトロンビンとのみ結合するaPT#1添加群ではmedium添加群と比較してICAM-1, VCAM-1とも有意に発現の亢進が認められた(p<0.01 & <0.01, respectively)。PL, Ca<sup>2+</sup>非存在下でヒトプロトロンビンとのみ結合するaPT#2ではaPT#1ほど高度ではなかったものの, medium添加群と比較してICAM-1, VCAM-1の発現が有意に亢進した(p<0.05 & <0.05, respectively)。APT#3, #4添加群では接着分子発現の有意の亢進は見られなかった。

#### D. 考察

抗リン脂質抗体は健常成人の2%前後でも陽性となるほか, 血栓症発症をみる場合でもほとんどの症例では動脈または静脈のいずれかのみには血栓症を発症するなど, 臨床症状の多様性が認められるが, その原因はいまだ明らかではない。われわれはこれまでの検討でPL, Ca<sup>2+</sup>存在下でヒトプロトロンビンとのみ結合するaPT#1陽性症例では血栓症発症危険率が有意に高く, その原因として本抗体はin vitroで血管内皮・単球・血小板に作用し凝固亢進状態を惹起することを明らかにしてきた。今回の検討の結果, aPT#1はICAM-1, VCAM-1といった細胞接着分子の発現も亢進することが確認された。この結果より, 血管内皮細胞にaPT#1が結合することにより内皮細胞の活性化が生じるとともに接着分子の発現も亢進し, 単球・血小板の活性化も惹起する可能性が示唆された。一方, aPT#3, #4では接着分子の発現に影響を与えず, 同じ抗プロトロンビン抗体でもそのサブタイプにより血管内皮・単球・血小板に対する作用が異なることが, 本抗体陽性例における臨床症状の多様性の一因であることが示唆された。

#### E. 結論

PLおよびCa<sup>2+</sup>依存性にヒトプロトロンビンとのみ結合するaPT#1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)・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。この結果は, これまでのわれ

われの検討(antiPT#1陽性例では血栓症発症頻度が有意に高い)と合致するものである。今後, 接着分子の発現と血管内皮・単球・血小板の活性化との関連につき詳細な検討を加えることにより, aPT#1による一連の凝固亢進状態惹起の機序を解明することか期待される。

#### F. 健康危険情報

特に記載すべき健康危険情報はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 山・雅英 特発性血小板減少性紫斑病 内科キーワード 2003 内科 91(6) 1381, 2003
- 2 山・雅英, 石山謙, 飯田恵, 斉藤祐希, 奥村廣和, 朝倉英策, 中尾眞二 播種性血管内凝固(DIC)を併発した急性骨髄性白血病妊婦に対するメシル酸ナファモスタットの使用経験 医薬の門 43(4) 492-495, 2003
- 3 Asakura H, Suga Y, Yoshida T, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Ito T, Eriko Morishita, Yamazaki M, Miyamoto K, Nakao S Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation (DIC) progresses at a different rate in tissue factor-induced and lipopolysaccharide-induced DIC models in rats Blood Coagulat Fibrinol 14(3) 221-228, 2003
- 4 表美香, 吉田知孝, 朝倉英策, 御館靖雄, 水谷朋恵, 山崎雅英, 森下英理子 血漿FDP測定試薬の基礎的検討とFDP測定値の乖離例の解析 日本検査血液学会誌 4(3) 406-415, 2003
- 5 Asakura H, Okudaira M, Ontachi Y, Mizutani T, Omote M, Yoshida T, Kaneda M, Yamazaki M, Morishita E, Takami A, Miyamoto K, Nakao S Antithrombotic role of nitric oxide in rats under physiological conditions Thromb Haemost 91(1) 71-75, 2004



- 6 御館靖雄, 朝倉英策, 伊藤貴子, 山崎雅英, 森下英理子, 南眞司, 中尾眞二 上部消化管出血に対するトラスネキサム酸使用が誘引となり膝か動脈血栓症を発症したと推測された1例 日本救急医学会雑誌 14(11), 748-752, 2003
  - 7 山崎雅英 抗リン脂質抗体症候群 よくわかる強皮症のすべて 竹原和彦編著, 永井書店, 大阪, pp241-250, 2004
  - 8 山・雅英, 竹原和彦 全身性強皮症における抗リン脂質抗体陽性率と臨床的特徴について 厚生労働科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 強皮症における病因解明と根治的治療法の開発 平成14年度 総括・分担研究報告書 43-49, 2003
  - 9 山・雅英 抗リン脂質抗体症候群に対するrituximab(リツキサンの有用性 厚生労働科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 自己免疫疾患に関する調査研究 平成14年度 総括・分担研究報告書 102-107, 2003
- 2. 学会発表**
- 1 山・雅英, 御館靖雄, 水谷朋恵, 金田みのり, 伊藤貴子, 高見昭良, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二 抗リン脂質抗体症候群に対するrituximab(リツキサンの有用性 第65回日本血液学会・第45回日本臨床血液学会合同総会, 2003年8月28日-31日, 大阪(第65回日本血液学会総会・第45回日本臨床血液学会総会プログラム・抄録集 389, 2003年8月)
  - 2 Yamazaki M, Kaneda M, Yoshida T, Kawashima Y, Mizutani T, Ito T, Asakura H, Morishita E, Nakao S Is an antithrombin substance (aFIIa) more hemorrhagic compared with an anti-factor Xa (aFXa), Differential inhibitory effects of these two agents against platelet activation 19<sup>th</sup> International ISTH (International Society of Thrombosis and Haemostasis) Congress, July 12-18, 2003, Birmingham, UK (CD-ROM)
  - 3 Yamazaki M, Kaneda M, Ito T, Ontachi Y, Mizutani T, Morishita E, Asakura H, Kawashima Y, Nakao S Rituximab reduces anti-phospholipid antibody (APA) titers and improves hypercoagulability in patients with anti-phospholipid syndrome (APS) 19<sup>th</sup> International ISTH (International Society of Thrombosis and Haemostasis) Congress, July 12-18, 2003, Birmingham, UK (CD-ROM)
  - 4 山・雅英 血球貪食症候群(Hemophagocytic syndrome, HPS) 第54回日本皮膚科学会中部支部学術集会シンポジウム, 2003年11月8日, 大阪(日本皮膚科学会誌, 印刷中)
  - 5 山・雅英 HIV感染症における日和見感染症 日本内科学会専門内科医北陸支部第23回学術集会, 2003年11月23日, 金沢(日本内科学会専門内科医雑誌, 印刷中)
  - 6 山・雅英 ループスアンチコアクulant標準化 平成15年度報告 第16回日本血栓止血学会学術集会 コンセンサスシンポジウム(Ⅲ)「抗リン脂質抗体」, 2003年11月27日-29日, 東京(日本血栓止血学会誌 14(5), 407-8, 2003年11月)
  - 7 山・雅英, 金田みのり, 中尾眞二, ほか 反復性劇症型抗リン脂質抗体症候群に対する血漿吸着療法の有用性 第16回日本血栓止血学会学術集会, 2003年11月27日-29日, 東京(日本血栓止血学会誌 14(5), 457, 2003年11月)
  - 8 Yamazaki M, Nakao S Roles of adhesion molecules in development of thrombosis and pregnant morbidity in antiphospholipid syndrome (APS) 45<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Hematology, August 5-10, 2003 San Diego, USA (Blood 102(11), 806a, 2003年12月)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)**
1. 特許取得 特記すべきことはない
  2. 実用新案登録 特記すべきことはない
  3. その他 特記すべきことはない

表1 各種抗プロトロンヒン抗体の臨床的特徴と

血管内皮細胞・単球・血小板に対する作用

aPT	#1	#2	#3	#4
結合 prothrombin	hF II のみ	hF II のみ	hF II & bF II	hF II & bF II
PL&Ca <sup>2+</sup> 依存性	あり	なし	あり	なし
動脈血栓	OR=8.4 (p<0.01)	まれ	関連なし	関連なし
静脈血栓	OR=15.2 (p<0.005)	OR=2.8	関連なし	関連なし
出血	関連なし	関連なし	関連なし	あり
血管内皮細胞				
Protein C 活性化	抑制 (p<0.005)	抑制傾向 (p=0.08)	変化なし	変化なし
TF 発現	亢進 (p<0.05)	変化なし	変化なし	変化なし
t-PA 放出	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
PAI-1 発現	亢進 (p<0.05)	変化なし	変化なし	変化なし
単球 PCA 活性	亢進 (p<0.01)	変化なし	変化なし	変化なし
血小板活性化	亢進 (p<0.001)	変化なし	変化なし	変化なし

aPT, 抗プロトロンヒン抗体(anti-prothrombin antibody), hF II, ヒトプロトロンヒン, bF II, ウシプロトロンヒン, PL, 陰性荷電リン脂質(phosphatidylserine), TF, 組織因子(tissue factor), t-PA 組織プラスミノゲン・アクチヘータ(tissue-plasminogen activator), PAI-1, プラスミノゲン・アクチヘータ・インヒビター-1型(plasminogen activator inhibitor type-1), PCA, procoagulant activity

表2 各種抗プロトロンヒン抗体の細胞接着分子発現に及ぼす作用

	ICAM-1	VCAM-1
MCDB 110 medium (negative control) (n=10)	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01
LPS (positive control) (n=10)	1.23 ± 0.23 *	1.18 ± 0.31 *
Normal IgG (n=10)	0.10 ± 0.03	0.07 ± 0.03
aPT #1 (n=10)	0.98 ± 0.38 *	0.85 ± 0.16 *
aPT #2 (n=10)	0.24 ± 0.19 @	0.18 ± 0.11 @
aPT #3 (n=10)	0.06 ± 0.05	0.09 ± 0.08
aPT #4 (n=10)	0.03 ± 0.05	0.10 ± 0.03

(mean ± SD)

ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1, LPS, lipopolysaccharide, aPT, 抗プロトロンヒン抗体(anti-prothrombin antibody)

\*, p<0.01 vs MCDB 110 medium, @, p<0.05 vs MCDB 110 medium

厚生科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

膠原病に合併する難治性間質性肺炎に対する  
FK506 の有用性に関する検討

分担研究者 宮坂 信之 東京医科歯科大学大学院生体応答調節学/膠原病・リウマチ内科 教授  
研究協力者 高田 和生 東京医科歯科大学大学院生体応答調節学/膠原病・リウマチ内科 助手

**研究要旨**

間質性肺炎(IP)は膠原病患者の予後を左右する合併症の一つであるか、現在確立された治療法はなく、様々な免疫抑制剤が保険適応外で使用されているか十分なエビデンスは存在しないのか現状である。一方、FK506 の膠原病に合併する IP における有効性が国内外から散発的に報告されていることから、本剤か新たな治療薬となりうる可能性がある。そこで我々はタクロリムスの有用性に関する検討を昨年度より開始し、第一段階である後ろ向き検討を継続した。当科の膠原病に合併する IP 症例で FK506 が最低 3 ヶ月以上投与された8例のうち、経済的事情で服用中止した1例を除外した7例にて臨床効果を評価した。FK506 は全血中トラフ濃度 5-9ng/ml で 4 から 21 ヶ月投与され、7 例中 6 例において、呼吸機能検査値、KL-6 値、そして CT 画像上順調な改善を示した。副作用は、投与量減量により可逆性の軽度の腎機能低下及び手指振戦がそれぞれ 1 例ずつに見られたのみであった。1 例では FK506 開始後症状・画像上安定していたものの KL-6 値上昇が続いたが、FK506 増量により改善傾向にある。後ろ向き検討で得られた FK506 の安全性及び治療効果に関する知見の前向き試験での再現性を評価し、また後に企画される検証的治験のための方法論の根拠を得る目的で、第二段階である前向き単群オープン試験を企画し、倫理審査委員会での承認を得て、患者登録を開始した。同試験にて有用性が更に確認されれば、第三段階として治療効果の立証及び適応承認拡大を目的とした検証的試験の企画・実行に移る予定である。本研究は段階的な臨床治験を通して膠原病に合併する IP に対する FK506 の有用性、及びそれを示すレベルの高いエビデンスを提供できることが期待される。

**A. 研究目的**

間質性肺炎(IP)は膠原病に高頻度に合併し、亜急性に進行し ADL(Activity of daily living)を徐々に低下させていく症例や、急性に進行し高い致死率を呈する症例も多く存在する。膠原病に合併する IP の詳細な病因は不明だが、肺胞・間質に多数存在する活性化T細胞が病態に関与していると考えられている。

これまでのところ膠原病に合併する IP には確立された治療法はなく、第一選択として一般に大量ステロイド療法が用いられるが抵抗例や副作用のために継続できない症例が多数あり、そのような症例にはシクロスポリンやシクロホスファミドな

と様々な免疫抑制剤が保険適応外で使用されているが十分なエビデンスは存在しないのか現状である。

近年、シクロスポリンと同しく Calcineurin 不活化によりT細胞機能を抑制し且つシクロスポリンより 100 倍近く強力な FK506 の膠原病に合併する IP における有効性が国内外から散発的に報告されており、膠原病に合併する IP の新たな治療薬となる可能性があるとして注目されている。

したがって我々は 2002 年度より、膠原病に合併する IP に対する FK506 の有用性に関する検討を開始し、2003 年度はその第一段階である後ろ向き検討を継続した。そしてそこで得られた知

見に基づき、第二段階として、安全性・治療効果の更なる予備知識の獲得のため前向き単群オープン試験を企画、患者登録を開始した。

## B.研究方法

### (1) FK506 使用症例における後ろ向き評価

2003年1月までに東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科にて、膠原病に合併するIPに対しFK506が最低3ヶ月以上投与された症例において、以下の4項目において臨床反応を評価した。

**呼吸機能検査** 努力性肺活量(%FVC)及び肺拡散能(%DLCO)の変動。

**血清マーカー** IP病変での再生II型肺胞上皮細胞に強く発現しており、IPに特異性が高くその活動性も反映するシアル化糖鎖抗原であるKL-6の変動。

**画像** 高分解能CTにおいて、IPに特異的に治療に対する高い反応性を持つスリガラス影の変動。

**プレドニゾン投与量** FK506開始前1ヶ月と、開始後1ヵ月毎のプレドニゾン総投与量の変動。

統計方法は、FK506開始前の数値と、開始3ヶ月後、6ヵ月後、または12ヵ月後の数値における変動を、対応のあるt検定またはWilcoxonの符号付順位検定も用いて解析した。

### (2) 前向き単群オープン試験

膠原病に合併するIPで、ステロイド大量療法・シクロスポリン・シクロホスファミドの少なくとも一つに対して抵抗性または副作用のため継続不可能であった症例を対象とした、比較群なしの、単一血中濃度目標域を用いたFK506の単施設前向きオープンラベル試験であり、24週間を必須治療期間とし安全性及び治療効果の評価を行う。治療効果の評価には呼吸苦スコア(Mahler Transition Dyspnea Index)、呼吸機能検査(%FVC, %DLCO, 安静時PaO<sub>2</sub>, AaDO<sub>2</sub>)、高分解能CT(Wellsらによる半定量化法を使用)、及びADLやQOL(quality of life)における、治療前後での変動を解析する。目標症例数はFK506

投与24週間以上の症例で8例、途中脱落例を考慮して目標登録症例を12例とした。

また、これと平行する補足研究として、FK506は多剤耐性遺伝子MDR-1の産物であるP-glycoproteinの基質であり、P-glycoproteinは腸間上皮のみでなく末梢血単核球にも発現していることから、単核球におけるP-glycoprotein mRNA及び蛋白発現を測定し、それとFK506の臨床効果との関連の解析も行う。

## C.研究結果

### (1) FK506 使用症例における後ろ向き評価

合計8例(皮膚筋炎3例、多発性筋炎、成人発症ステイル病、混合性結合組織病、シェークレン症候群、強皮症各1例)検索され、経済的事情で服用中止した1例を除外した7例(女性6例)にて臨床効果を評価した。治療を必要とするIP罹患期間は22ヶ月間(中間値)、タクロリムス投与開始時の年齢は57歳(中間値)であり、目標全血中トラフ濃度5-9ng/mlで4から21ヶ月間(中間値14ヶ月)投与された(**Table 1**)。

縦隔気腫の合併や強い呼吸苦のために解析可能な呼吸機能検査結果が得られたのは3例のみであったが、3例全例において、治療開始6ヶ月後に%VC(平均上昇率23%)及び%DLCO(平均上昇率39%)の改善が見られた(**Figure 1**)。KL-6は7例全例にて追跡され、6例において治療開始後低下した(**Figure 2**)。

CT画像においては、スリガラス影の減弱が7例中4例にて認められ、残りの3例においても、スリガラス影の明らかな減弱はなかったものの同影及び網状影を含めて増悪は認められなかった。**Figure 3**に典型例におけるCT画像の変化を記した。

プレドニゾン投与量は、KL-6値上昇が続いたために2ヵ月後に投与量が増量された下記の1症例以外では、減量達成または必要最低限の維持量が継続された(**Figure 4**)。

抗Jo-1抗体陰性Amyopathic dermatomyositisに合併したIPの1症例では、FK506開始後症状・CT画像上安定していたがKL-6値の上昇が続いたため、2ヵ月後に大量プレドニゾン療法

追加、そして 4 ヶ月後に FK506 増量したところ KL-6 値及び CT 所見の改善を認め、現在プレトニゾロン減量中である。

副作用としては、投与量減量により可逆性の軽度の腎機能低下及び手指振戦がそれぞれ 1 例ずつに見られたのみであった。

#### (2) 単施設前向き単群オープン試験

2004 年 2 月に東京医科歯科大学倫理審査委員会にて承認され、患者登録が開始された。

### D. 考察

2002 年度より、膠原病に合併する IP に対する FK506 の有用性に関する検討を開始し、今年度はその第一段階である後ろ向き検討を継続した。筋炎を中心に様々な膠原病に合併した難治性 IP 症例 8 例を検索され、その 7 例において解析を行った。昨年度報告した 3 症例と同様に、ほとんどの症例がシクロスポリン及びシクロホスファミドの双方に抵抗性を示した難治例であった。FK506 治療開始後、7 例中 6 例において、呼吸機能検査値、KL-6 値、そして CT 画像上改善を示し、継続観察中(中間値 14 ヶ月、最長 21 ヶ月)再燃を認めなかった。一方、副作用としては投与量減量により可逆性の軽度の腎機能低下及び手指振戦がそれぞれ 1 例ずつに見られたのみであった。これらは、膠原病に合併する IP に対する FK506 の有用性を示唆している。

FK506 は、強力な T 細胞抑制作用を持つ免疫抑制剤として既に重症筋無力症の治療に承認されているほか、関節リウマチ、ループス腎炎、潰瘍性大腸炎などに対しての開発も進められている。膠原病に合併する IP に対しての有用性も、症例報告や後ろ向き検討を中心に国内外から散発的に報告されている。Oddis らは 2003 年のアメリカリウマチ学会にて、抗 tRNA シンターゼ抗体陽性筋炎に合併した IP13 症例における FK506 の臨床効果を後ろ向きに評価し、FVC 及び DLCO に著明な改善を認め、またステロイド減量も達成されたと報告している。我々の症例は筋炎以外の膠原病に合併した IP も含めるが、現在までに得られている病理所見、臨床経過、及び治療への反応性に関する知見に基づき、筋

炎に合併する難治性 IP もそれ以外の膠原病に合併するものも非常に似た臨床病態であると考えられ、したがって Oddis らの報告とあわせて、広く膠原病に合併する難治性 IP に対する FK506 の有用性を示唆しているものと考察する。

7 例中、抗 Jo-1 抗体陰性 Amyopathic dermatomyositis に合併した IP の 1 例で、FK506 開始後も KL-6 値の上昇が続いた。本症例はシクロスポリンに抵抗性でシクロホスファミドパルス投与にて一時病勢が安定化したものの再び増悪したため FK506 開始となった。開始後 KL-6 上昇は続いたか、症状・CT 画像上明らかな増悪は認めなかった。FK506 への反応不十分との判断のもとに 2 ヶ月後に大量プレトニゾロン療法追加したかそれによる明らかな改善はなかった一方、4 ヶ月後に FK506 増量したところ KL-6 値及び CT 所見の改善を認め、その後順調にプレトニゾロン減量が進められている。FK506 増量により臨床反応が得られたことは、T 細胞レベルでの FK506 への抵抗性を示唆するものかもしれない。特に、FK506 は多剤耐性遺伝子 MDR-1 の産物である P-glycoprotein の基質であり、P-glycoprotein は腸間上皮のみでなく末梢血単核球にも発現していることから、T 細胞における P-glycoprotein 発現の違いが FK506 への抵抗性に関係している可能性が推測される。

第一段階の後ろ向き検討で得られた FK506 の安全性及び治療効果に関する知見の前向き試験での再現性を評価し、また後に企画される検証的治験のための方法論の根拠を得る目的で、第二段階である前向き単群オープン試験を企画し、当院倫理審査委員会での承認を得て、患者登録を開始した。膠原病に合併する IP に対する FK506 の治療効果の前向き試験による検証は、国内外を通して本試験にて初めて行われる。本試験は 2004 年度中の目標症例数登録達成を目標とし、後ろ向き検討で得られた知見が同試験で再現されれば、治療効果の立証及び適応承認拡大を目的とした、第三段階の検証的治験の企画・実行に移る予定である。

## **E.結論**

FK506 は、膠原病に合併する IP におけるその有用性が示唆されている。我々の研究は、段階的な臨床治験を通してその有用性とそれを裏付ける質の高いエビデンスを提供し、また補足研究を通して治療薬選択や FK506 初期投与量設定に有用なデータを提供し、結果、膠原病に合併する IP 治療のテーラーメイド化の実現に貢献できる可能性がある。

## **F.健康危険情報**

なし

## **G.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)**

### **1.特許取得**

なし

### **2.実用新案登録**

なし

### **3.その他**

なし

**Table 1.** 患者背景

	N=7
性別	女性 6 名
治療を必要とする IP 罹患期間	22 ヶ月(4-148)*
FK506 投与開始時年齢	57 歳(50-70)*
FK506 投与期間	14 ヶ月(4-21)*
FK506 投与開始時のプレトニソロン投与量	12.5mg (7-30)*

\*中間値 (最小値-最大値)

**Figure 1** 呼吸機能検査値における変動

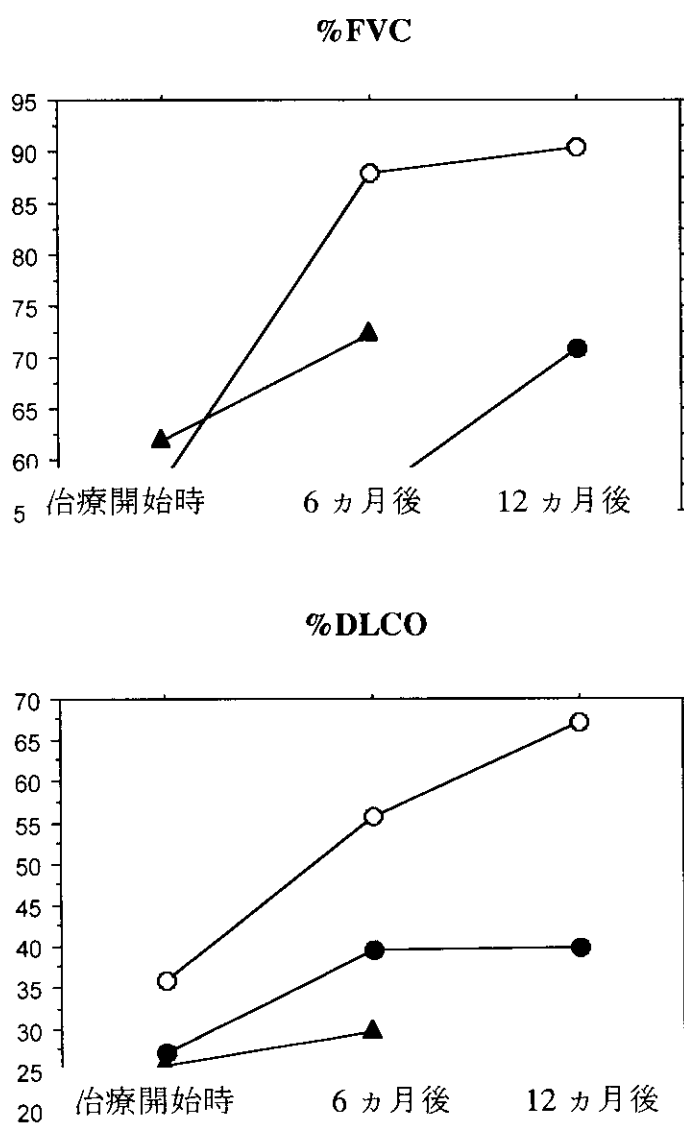




Figure 2. KL-6 値における変動

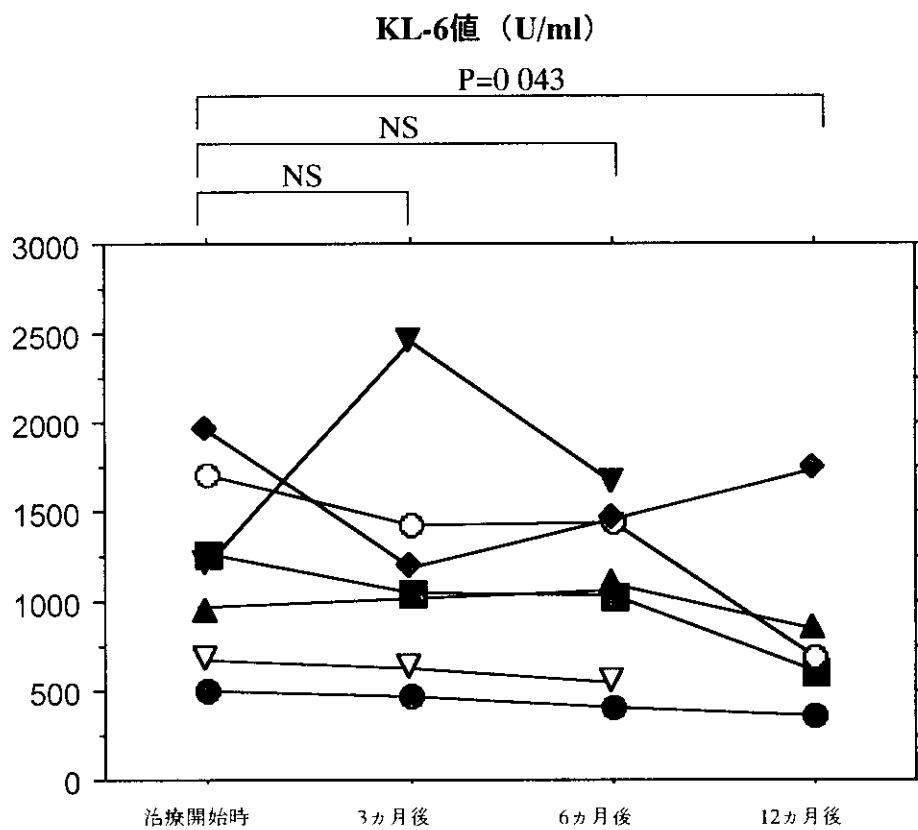
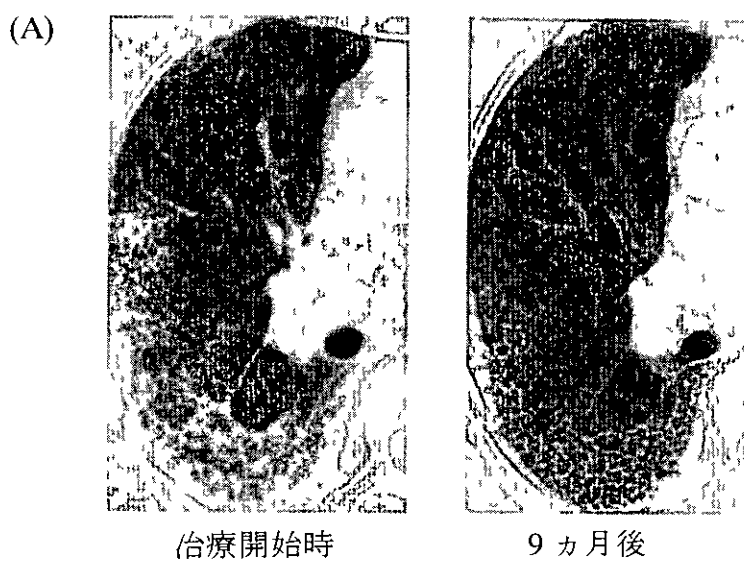


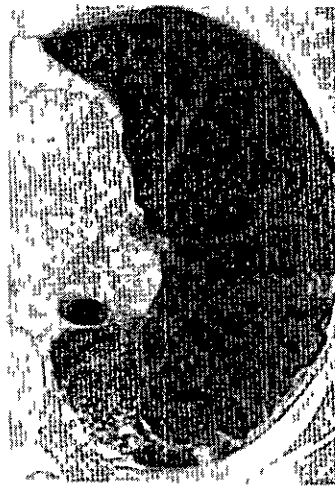
Figure 3. 典型例における CT 画像上の変化



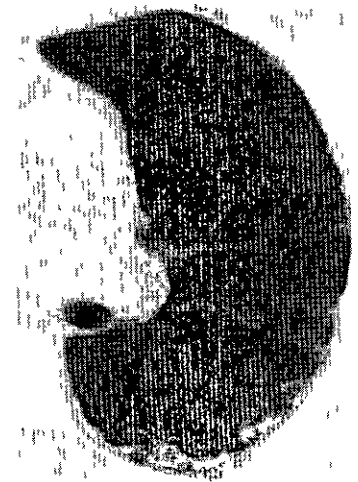
(B)



治療開始時



5ヵ月後



14ヵ月後

(C)

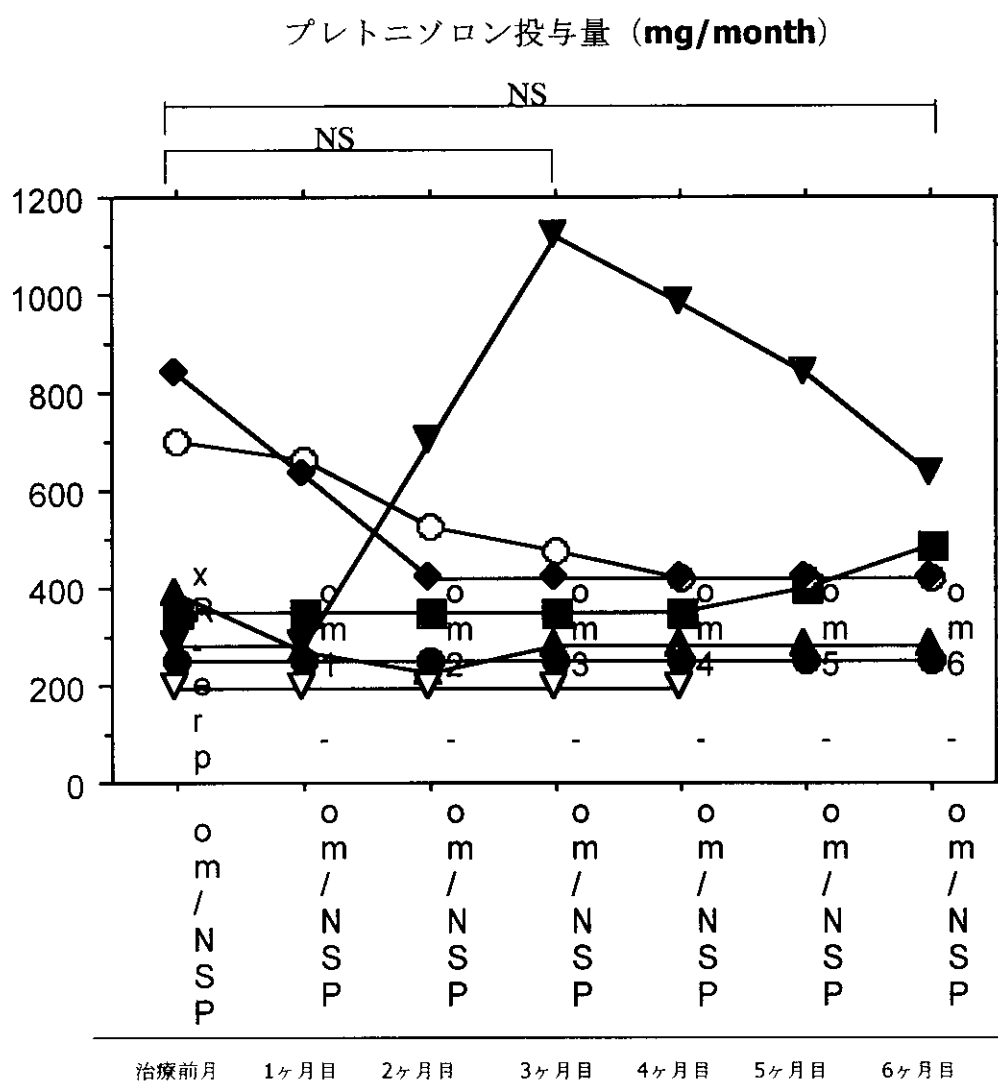


治療開始時



8ヵ月後

Figure 4 プレトニソロン投与量の変動



## シェークレン症候群唾液腺上皮細胞死における CD40 下流分子の同定に関する研究

分担研究者 菅井 進 金沢医科大学血液免疫内科 教授  
小川 法良 金沢医科大学血液免疫内科 助教授

### 研究要旨

我々はヒト唾液腺上皮細胞の特異的無血清培養法を確立し、シェークレン症候群(以下 SS)唾液腺上皮細胞において IFN $\gamma$ か Fas、CD40 発現を誘導し、両者を同時に刺激すると Fas death 経路の細胞死抑制分子である cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP)の発現が抑制され、効率的に上皮細胞死が誘導されることを報告した。今回の検討では CD40 下流に存在し、唾液腺上皮細胞死に関与する分子の同定を試みた。その結果、1) p38 インヒビター、JNK インヒビターともに抗 Fas 抗体と抗 CD40 抗体にて誘導される上皮細胞死を部分的に抑制した、2) CD40 刺激後、SS 唾液腺上皮細胞に pp38 (活性化 p38)発現が誘導された。これらより、SS 唾液腺上皮細胞においては CD40 の下流に p38 や JNK などのシグナル伝達分子が存在することが示唆された。これら分子を介する刺激か c-FLIP 調節に働いているのか、あるいは他の経路の活性化や抑制に関与しているのかは未だ不明である。以上より、1) Fas・FasL、CD40・CD40L などの細胞表面機能分子や 2) c-FLIP、p38、JNK などの細胞内シグナル伝達因子などが唾液腺上皮細胞死の調節を目的とした分子標的治療のターゲットとなりうる可能性を持つことが示された。

### A.研究目的

シェークレン症候群(以下 SS)においては唾液腺における組織障害の分子機構の解明が治療戦略を考える上で重要である。現在までの検討により、IFN $\gamma$ かシェークレン症候群唾液腺上皮細胞に Fas および CD40 発現を誘導し、抗 Fas 抗体と抗 CD40 抗体を同時に作用させるとアポトーシスが効率的に誘導されることが判明した。この細胞死は Fas 中和抗体により抑制され、また CD40 刺激は Fas death 経路に関与する細胞死抑制蛋白 c-FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein)の発現を低下させることにより Fas のシグナルを促進した。今回は唾液腺上皮細胞死のメカニズムをさらに解明することを目的として、CD40

下流に存在し、細胞死シグナル伝達に関与する分子の同定を試みた。

### B.研究方法

1) p38MAPK および JNK の解析  
IFN $\gamma$ 刺激 SS 唾液腺上皮細胞に抗 Fas 抗体および抗 CD40 抗体を作用させ、この系に p38 インヒビター (SB203580) または JNK インヒビター (SP600125) を添加し、アポトーシス細胞を TUNEL 法にて測定した。2) CD40 刺激による p38MAPK の活性化の解析

IFN $\gamma$ 刺激 SS 唾液腺上皮細胞に抗 CD40 抗体を作用させ、p38 とその活性化分子であるリン酸化 p38 (pp38)の発現を Western blot 法を用いて解析した。