

D. 考案

SSc 患者では末梢血中の CEP の減少と血管新生因子に対する分化障害が存在した。また、CEP の著明な減少を伴う症例では血管病変の程度が強いことも示された。これらの結果は SSc で CEP を介した血管新生、傷害血管修復の障害が存在することを示唆する。従来、血管内皮傷害により SSc の血管病変が誘導されると考えられてきたが、今研究成果から血管内皮傷害に加えて修復不全も病態に関与することが明らかにされた。

血管内皮が機械的あるいは代謝障害により傷害されると、血管壁内部が露出し、血栓や出血など重篤な合併症をきたす可能性がある。それを防ぐためには、血管内皮欠損部分の迅速な修復が必要である。そのため、損傷部位から VEGF などの血管新生因子が産生され、骨髄から CEP が動員される⁵⁾。SSc 患者では CEP の絶対数が少なく、また血管新生因子に対する CEP の反応性も低下していることから、血管新生因子濃度の高値が持続しても血管内皮の修復が十分に行われない。そのため、損傷部位に血小板の付着や炎症細胞の浸潤が起こり、癒痕化がすすみ、血管内腔の狭小化につながると推測される。現時点で SSc における CEP 異常のメカニズムは明らかでないが、循環中の CEP が何らかの機序で破壊されるか、骨髄での幹細胞からの分化障害のいずれかの可能性が考えられる。

現在 SSc の血管病変に対する治療として血管拡張薬が用いられているが、満足のいく臨床効果は得られていない。本研究結果から骨髄より CEP を誘導することが SSc の血管病変の治療につながる可能性が考えられる。スタチン薬⁶⁾や G-CSF などの成長因子³⁾が CEP の動員を促進することが報告されており、SSc に対する有効

性が期待され、今後の検討が待たれる。

E. 結論

SSc では CEP の減少と成熟障害が存在し、末梢血管病変との関与が考えられた。

F. 文献

1. LeRoy EC. Systemic sclerosis: A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22: 675-94.
2. Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, et al. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34⁺ bone marrow cells. *Blood* 2000; 95: 581-5.
3. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-8.
4. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
5. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-8.
6. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885-90.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, et al. Impaired function of circulating endothelial precursors in patients with systemic sclerosis: Implication for pathogenesis of microvascular damage. The 67th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Orlando). 2003. 10.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

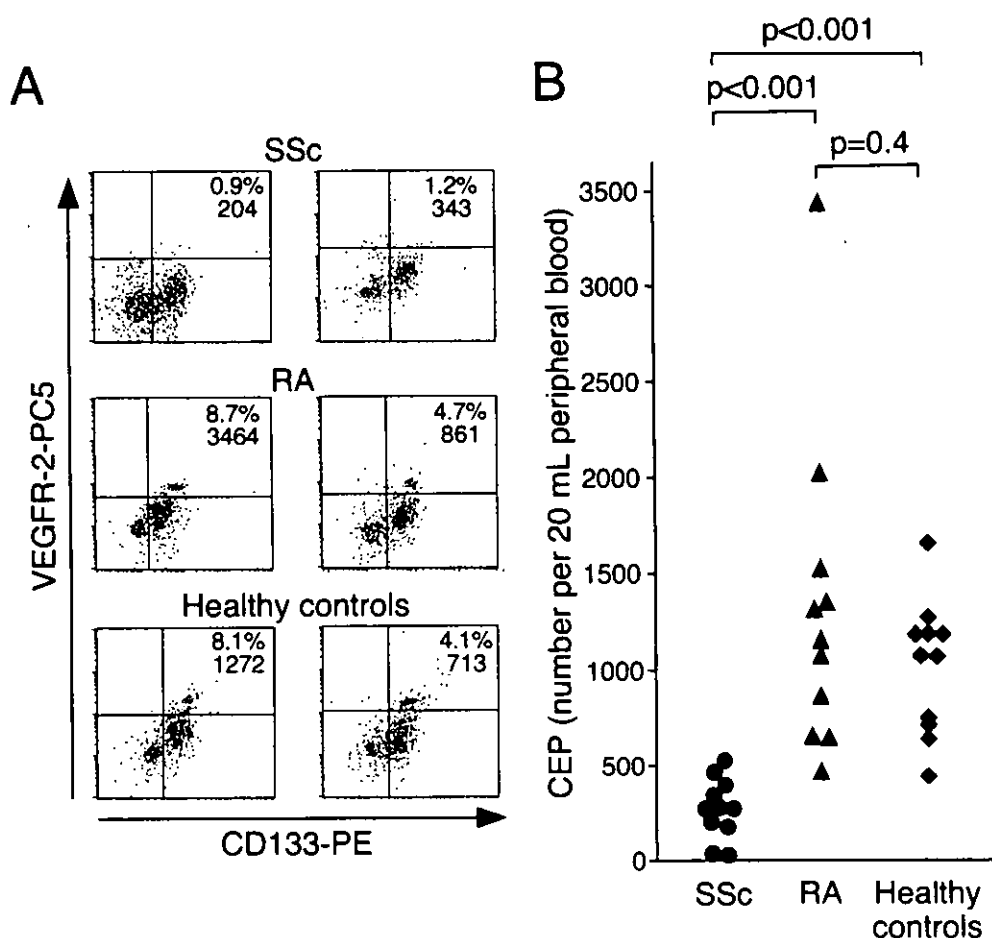


図 1. 末梢血中の CEP の検出および定量化。A. MACS によりソートした CD34⁺細胞を用いた CEP の検出。CD34⁺細胞を抗 CD34、抗 VEGFR2、抗 CD133 抗体により三重染色し、CD34⁺細胞にゲートをかけて VEGFR2 と CD133 の発現を調べた。B. SSc、RA、健常人における末梢血 20ml あたりの CEP の絶対数の比較。

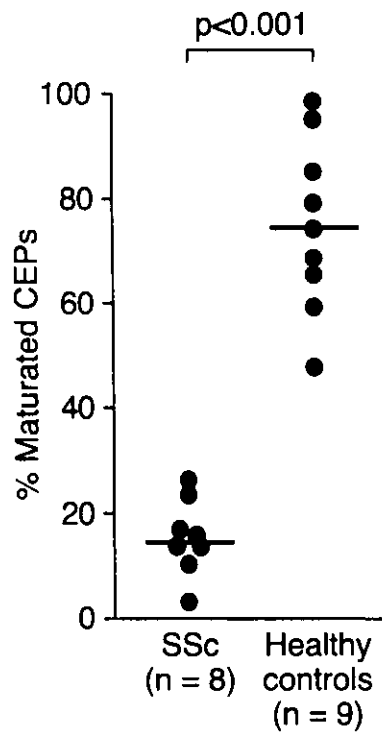


図 2. in vitro における分化誘導処理による CEP の分化能の解析。SSc および健康人由来の CD133⁺ 細胞を各種血管新生因子存在下で 5 日間培養し、CD45⁻VEGFR2⁺細胞における CD45⁻vWF⁺細胞の比率により CEP の分化率を調べた。

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

膠原病に伴う肺高血圧症におけるBMPR-II、ALK-1に対する
自己抗体の検索

分担研究者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所講師
協力者 佐藤隆司 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所研究員

研究要旨

原発性肺高血圧症（PPH）と臨床経過や病理組織像が類似する肺高血圧症を高率に合併する混合性結合組織病（MCTD）患者を対象として、PPH で遺伝子変異が報告されている TGF- β 受容体スーパーファミリー-BMPR-II、ALK-1 に対する自己抗体を検索した。自己抗体の検索法として in vitro で転写/翻訳した BMPR-II と ALK-1 リコンビナント蛋白を用いた免疫沈降法、BMPR-II 細胞外ドメインを用いた免疫沈降/免疫プロット法、BMPR-II または ALK-1 遺伝子導入細胞を用いた間接蛍光抗体法を用いたが、肺高血圧症の有無に関わらず MCTD 患者血清中に BMPR-II、ALK-1 に対する自己抗体は検出されなかった。したがって、BMPR-II や ALK-1 に対する自己抗体によるこれら受容体の機能不全が MCTD における肺高血圧症の原因となる可能性は低いと考えられた。

A. 研究目的

膠原病に伴う肺高血圧は生命予後に影響を及ぼす重篤な臓器障害だが、その発症機序はいまだ明らかでない。近年、原発性肺高血圧症（PPH）患者において bone morphogenetic protein receptor II（BMPR-II）の遺伝子変異が報告された¹⁾²⁾。BMPR-II の遺伝子変異は家族性 PPH の 56%、散発性 PPH の 26%と高率に検出される¹⁾²⁾。一方、PPH と区別できない肺高血圧症を高率に合併する 2 型遺伝性毛細血管拡張症患者では activin receptor-like kinase 1（ALK-1）の遺伝子変異が報告された³⁾。BMPR-II と ALK-1 はいずれも血管内皮細胞に選択的に発現される TGF- β 受容体スーパーファミリーに属す

る膜表面分子で、リガンドとの結合により細胞内にシグナルを伝える。肺高血圧症患者でみられる BMPR-II、ALK-1 の遺伝子変異の多くは受容体の機能や発現の低下を介してシグナル伝達に影響を及ぼす。その結果として血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の分化、増殖、アポトーシス感受性が変化し、肺高血圧症の発症につながる可能性が指摘されている²⁾。

膠原病の中で肺高血圧症を合併しやすいのは強皮症関連疾患であり、日本人では特に混合性結合組織病（MCTD）に分類される症例に頻度が高い。MCTD に伴う肺高血圧症と PPH は臨床経過、病理組織像、治療反応性がきわめて類似することから、MCTD に伴う肺高血圧症の病

態にも BMPR-II や ALK-1 を介したシグナルの異常が関与する可能性がある。しかし、肺高血圧症を合併した強皮症関連疾患 24 例 (MCTD も含む) を対象とした欧米での遺伝子解析では、BMPR-II の遺伝子変異を認めていない⁴⁾。膠原病患者では様々な自己抗原に対する自己抗体が検出されることから、私たちは BMPR-II または ALK-1 の機能を抑制する自己抗体が肺高血圧症の発症に関与する可能性を想定した。そこで、本研究では肺高血圧症を伴う MCTD 患者を対象として BMPR-II および ALK-1 に対する自己抗体の検索を試みた。

B. 研究方法

1) 対象

厚生省基準⁵⁾を満たす MCTD 患者 40 例を対象とした。そのうち 20 例は WHO 分類を満たす肺高血圧症合併例であった。また、健常人 10 例を対照として用いた。

2) 全長 BMPR-II、ALK-1 をコードする cDNA

哺乳動物発現ベクターに組み込んだ BMPR-II と ALK-1 全長 cDNA は東京大学分子病理学講座の宮園浩平先生から供与を受けた⁶⁾。これらベクターからリコンビナント蛋白を発現させると BMPR-II の C 末端には FLAG タグ (BMPR-II-FLAG)、ALK-1 の C 末端には HA タグ (ALK-1-HA) が付加される。

3) in vitro で転写/翻訳したリコンビナント蛋白を用いた免疫沈降法

BMPR-II-FLAG または ALK-1-HA プラスミドから ³⁵S 標識メチオニン存在下で Single Tube Protein™ System, T7 kit (Novagen, Madison, WI, USA) を用いて ³⁵S 標識リコンビナント蛋白を発現させた⁷⁾。それぞれのリコンビナント蛋白は患者および健常人血清中の IgG に結合させ

たプロテイン G セファロースと反応させた。得られた免疫沈降物は 6% (BMPR-II) または 8.5% (ALK-1) ポリアクリルアミド-SDS ゲル電気泳動で分画後、オートラジオグラフィーにより抗体により沈降された ³⁵S 標識蛋白を検出した。BMPR-II-FLAG の陽性コントロールとして抗 BMPR-II 抗体 (Beckton-Dickinson, San Jose, CA, USA) と抗 FLAG 抗体 (Sigma, St. Louis, MO, USA)、ALK-1-HA の陽性コントロールとして抗 HA 抗体 (Roshe, Mannheim, Germany) を用いた。

4) BMPR-II/Fc chimera リコンビナント蛋白を用いた免疫沈降/免疫プロット法

ヒト BMPR-II 細胞外ドメインの C 末端側にヒト IgG-Fc 領域と His タグを付加した BMPR-II/Fc キメラ蛋白は R&D systems (Minneapolis, MN, USA) より購入した。患者および健常人血清中の IgG と結合させたプロテイン A セファロースを BMPR-II/Fc キメラ蛋白と反応させた。BMPR-II/Fc キメラ蛋白の Fc 部分に対するプロテイン A の結合は過剰量のウシ胎児血清 (60%) 存在下で反応させることにより抑制した。得られた免疫沈降物は 8.5% ポリアクリルアミド-SDS ゲル電気泳動で分画し、ニトロセルロース膜に転写し、ヤギ抗 BMPR-II 抗体 (R&D systems) と反応させた。アルカリフォスファターゼ結合抗ヤギ IgG 抗体 (Sigma) と反応後、NBT/BCIP を基質とした発色反応により免疫沈降された BMPR-II/Fc キメラ蛋白を検出した。陽性コントロールとして抗 BMPR-II 抗体および抗 His 抗体 (Amersham, Uppsala, Sweden) を用いた。

5) BMPR-II または ALK-1 遺伝子導入細胞を用いた間接蛍光抗体法

BMPR-II-FLAG または ALK-1-HA 遺伝子を

Effecten (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて COS-7 細胞に導入した。遺伝子導入 COS-7 細胞はメタノール/アセトンで固定し、HiTrap™ プロテイン G カラム (Amersham) を用いて血清から精製した IgG 分画、Alexa Fluor488 ウサギ抗ヒト IgG 抗体と反応させた。さらに、BMPR-II-FLAG の検出にはビオチン標識抗 FLAG 抗体と AlexaFluor568 ストレプトアビジン、ALK-1-HA の検出にはラット抗 HA 抗体と AlexaFluor568 ヤギ抗ラット IgG 抗体を用いた。また、BMPR-II 遺伝子導入細胞の陽性コントロールとして、精製ヒト IgG の代わりに抗 BMPR-II 抗体、Alexa Fluor488 ヤギ抗マウス IgG 抗体を反応させた。TO-PRO-3 により核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

C. 研究結果

in vitro で転写/翻訳させた BMPR-II-FLAG、ALK-1-HA リコンビナント蛋白は、それぞれ塩基配列から予測される 135、55kDa の分子量を有していた。これらリコンビナント蛋白を用いた免疫沈降法では、陽性コントロールの抗 BMPR-II 抗体と抗 FLAG 抗体は BMPR-II-FLAG を沈降し、抗 HA 抗体は ALK-1-HA を沈降した。しかし、MCTD、健常人血清はいずれのリコンビナント蛋白とも反応しなかった。

さらに、抗 BMPR-II 抗体の検出のため BMPR-II/Fc キメラ蛋白を用いた免疫沈降/免疫プロット法を行った。陽性コントロールの抗 BMPR-II 抗体と抗 His 抗体は 65kDa の BMPR-II/Fc キメラ蛋白を沈降したが、MCTD および健常人血清は BMPR-II/Fc キメラ蛋白に相当する蛋白を沈降しなかった。

BMPR-II および ALK-1 は本来膜蛋白であるが、上述の方法で発現させたリコンビナント蛋

白は細胞膜に結合していないことから生理的な分子構造を有していない可能性がある。そこで、BMPR-II および ALK-1 遺伝子を培養細胞に強制発現させ、それらに対する患者血清由来 IgG の結合を間接蛍光抗体法により検索した。COS-7 における遺伝子導入効率は BMPR-II で約 10%、ALK-1 で約 20%であった。BMPR-II 遺伝子導入細胞を用いた検討では、抗 BMPR-II 抗体と抗 FLAG 抗体は細胞質と細胞膜のほぼ同一部位を染色した。抗 BMPR-II 抗体の代わりに MCTD および健常人由来の IgG を用いると、抗 FLAG 抗体で染色された部位に一致する染色はみられなかった。さらに、ALK-1 遺伝子導入細胞を用いて同様の解析を行なったが、陽性コントロールの抗 HA 抗体と一致する染色は MCTD 患者血清由来 IgG で検出できなかった。

D. 考案

MCTD 患者血清中の BMPR-II と ALK-1 に対する自己抗体の検索を行なったが、肺高血圧症の有無にかかわらずこれら膜蛋白に対する自己抗体は検出できなかった。PPH の発症に遺伝子異常に起因する BMPR-II、ALK-1 の機能障害の関与が考えられていることから、本研究では生理的条件下でこれら分子の細胞外ドメインに結合する自己抗体の検索を目標とした。そのため、哺乳細胞発現システムを用いて作製したりコンビナント蛋白および遺伝子導入による強制発現細胞を用いて、native な高次構造を有する分子を抗原とした。

本研究結果が膠原病に伴う肺高血圧症として BMPR-II や ALK-1 の機能異常の関連を否定するものではない。血管は生体内で最大の臓器で、血管内皮は 10^{13} 以上の細胞により覆われ、その総面積は 7m^2 に達する。したがって、BMPR-II

や ALK-1 に対する自己抗体が存在しても、そのほとんどが血管内皮に結合した状態で存在し、血清中に非結合状態で存在しない可能性がある。また、肺高血圧症を伴う強皮症関連疾患における BMPR-II 遺伝子変異の検討もエクソン領域しか検討されていない⁹⁾。PPH にみられる遺伝子異常はイントロンやプロモーター領域にも検出されており、さらに BMPR-II ゲノム全体に渡る検索が必要である。

PPH と膠原病に伴う肺高血圧症は進行性の臨床像や叢状病変を有する病理組織など類似する点は多くあり、共通する病態が推測されてきた。しかし、叢状病変における内皮細胞増殖が PPH では単クローン性、膠原病に伴う肺高血圧症では多クローン性とする報告もある⁸⁾。したがって、PPH と膠原病に伴う肺高血圧症は最終的な病像は類似するが、その病態は異なる可能性も考えられる。PPH 患者由来の肺組織では健常肺組織に比べて BMPR-II 蛋白の発現の低下が見られるが⁹⁾、BMPR の発現は angiopoietin-1 など他の因子により制御されている¹⁰⁾。つまり、BMPR-II や ALK-1 そのものに異常がなくとも、それらの発現を調節している上流因子に異常が存在する可能性も否定できない。そのため、肺動脈血管内皮における TGF- β /BMP シグナル伝達経路の制御機構の追究が肺高血圧症の病態解明に必要と考えられる。

E. 結論

肺高血圧症合併 MCTD 患者血清中には BMPR-II、ALK-1 に対する自己抗体は検出されず、自己抗体によるこれら受容体の機能障害が肺高血圧症の発症に関連する可能性は低いと考えられた。

F. 文献

1. Deng Z, Morse JH, Slager SL, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 737-44.
2. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, et al. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet* 2000; 37: 741-5.
3. Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, et al. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2001; 345: 325-34.
4. Morse J, Barst R, Horn E, Cuervo N, Deng Z, Knowles J. Pulmonary hypertension in scleroderma spectrum of disease: lack of bone morphogenetic protein receptor 2 mutations. *J Rheumatol* 2002; 29: 2379-81.
5. 東條 毅、鳥飼勝隆、ほか (編)、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、混合性結合組織病の治療方針、1996、p4-9.
6. Kawabata M, Inoue H, Hanyu A, Imamura T, Miyazono K. Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO J* 1998; 17: 4056-65.
7. Kuwana M, Kimura K, Hirakata M, Kawakami Y, Ikeda Y. Differences in autoantibody response to Th/To between systemic sclerosis and other autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:

- 842-6.
8. Lee SD, Shroyer KR, Markham NE, Cool CD, Voelkel NF, Tudor RM. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 1998; 101: 927-34.
 9. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, et al. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 2002; 105: 1672-8.
 10. Du L, Sullivan CC, Chu D, et al. Signaling

molecules in non-familial pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2003; 348: 500-9.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

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

全身性強皮症における phosphatidylserine-prothrombin

複合体に対する自己抗体の検討

分担研究者 佐藤 伸一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
協力者 長谷川 稔 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
協力者 山崎 雅英 金沢大学大学院医学系研究科血液内科助手
主任研究者 竹原 和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

全身性強皮症 (SSc) における phosphatidylserine-prothrombin 複合体に対する自己抗体 (抗 PS/PT 抗体) の頻度と臨床症状との関連について検討した。112例のSSc患者において、血清中のIgG型の抗PS/PT抗体をELISAにて測定した。33例の健常人と30例の全身性エリテマトーデスについてもコントロールとして抗PS/PT抗体を測定した。IgG型の抗PS/PT抗体は健常人では検出されなかったが、16%のSSc患者に検出され、末梢虚血や肺病変(間質性肺炎と肺高血圧症)の存在と相関した。2名のSSc患者では、ループス抗凝固因子や抗cardiolipin- β_2 glycoprotein I複合体が陰性にも関わらず、抗PS/PT抗体が陽性で血栓症が認められた。抗PS/PT抗体はSScにおける血栓症の危険性や臨床症状の把握に有用と考えられた。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis:SSc) は皮膚や肺などの内臓における線維化、血管障害を特徴とする自己免疫疾患である。血管障害に関しては、経過中に血管の閉塞、血栓症、末梢虚血などの多様な病態が認められる。ループス抗凝固因子 (LA) や抗cardiolipin- β_2 glycoprotein I複合体 (抗CL/ β_2 GPI抗体) などの抗リン脂質抗体は、血栓症などの抗リン脂質抗体症候群に関与していると考えられている¹。抗CL/ β_2 GPI抗体は、SScの10%に検出され、肺高血圧症と有意に相関することが報告されている²。最近、抗prothrombin抗体 (抗PT抗体) ではなく、抗phosphatidylserine-prothrombin複合体に対する自己抗体 (抗PS/PT抗体) がLAの主要な構成因子であると考えられている^{3,4}。しかしながら、SScにおける抗PS/PT抗体の頻度や臨床的意義は不明である。我々はSSc患者において抗PS/PT抗体の頻度を検討し、臨床症状との相関を検証した。

B. 研究方法

1) 患者と血清

対象患者はSSc 112例 (女性 99例、男性 13例) であり、年齢は40 \pm 19歳であった。40例は抗topoisomerase I抗体、41例は抗セントロメア抗体、10例は抗RNA polymerase I/III抗体、8例は抗U1RNP抗体が陽性であった。罹病期間は5.4 \pm 7.2年であった。30例の全身性エリテマトーデス(SLE)患者と健常人33例をコントロールとして使用した。これらの患者より血清を採取して、実験に使用した。

2) ELISA

抗PS/PT抗体は、ELISA (医学生物学研究所、名古屋) を使用して、プロトコールに従って施行した。血清を1:101に希釈して、PS/PTを固層化した、96穴のELISAプレートに添加し、20 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。洗浄後、結合した抗体をペロキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体で検出した。その後、3,3',5,5'-teramethylbenzidineと過酸化水素により発色し、450nmでプレートの吸光度を測定した。検出限界は5U/mlであった。抗CL/ β_2 GPI抗体についてもELISAキット (ヤマサ、東京) を使用して測定し

た。LA は Subcommittee on Lupus anticoagulant/Phospholipid Dependent Antibodies によるガイドラインにもとづき、測定した。

C. 研究成果

1) SSc における抗 PS/PT 抗体

SSc 患者の IgG 型の抗 PS/PT 抗体価は SLE 患者より低いものの (7.1 ± 11.8 vs. 12.5 ± 10.4 U/ml, $p < 0.05$)、正常コントロール(CTL)に比べて有意に上昇していた (7.1 ± 11.8 vs. 2.1 ± 3.3 U/ml, $p < 0.05$, 図 1)。正常コントロールの平均+3SD を超える場合に陽性と判定した場合、正常コントロールでは 1 例も抗 PS/PT 抗体は陽性に検出されなかったが、SSc の 16% と SLE の 33% は陽性であった。このように、抗 PS/PT 抗体は SSc 患者の一部に検出された。

2) APS を合併した SSc 患者における抗 PS/PT 抗体

表 1 に抗 PS/PT 抗体、LA、抗 CL/ β_2 GPI 抗体のいずれかが陽性であった SSc 患者の一覧を示す。112 例の SSc 患者のうち、81 例で LA を、60 例で抗 CL/ β_2 GPI 抗体を測定した。LA は SSc の 25%、抗 CL/ β_2 GPI 抗体は 7% に検出された。抗 PS/PT 抗体が陽性の 18 例のうち、1 例は LA と抗 CL/ β_2 GPI 抗体の両方が陽性であり、8 例は LA のみ陽性であった。抗 PS/PT 抗体陽性のうち 6 例は、LA と抗 CL/ β_2 GPI 抗体のいずれも陰性であった。

抗 PS/PT 抗体、LA、抗 CL/ β_2 GPI 抗体のいずれかが陽性であった 30 例において、頭部 MRI、下肢ペノグラフィ、肺血流スキャン、心筋スキャン、心エコーにより血栓症の検索を施行した。妊娠不育症の既往、血栓の明らかな臨床症状は 1 例もみられなかった。30 例中 9 例に検査で血栓症が認められた。抗 PS/PT 抗体陽性の 18 例では 6 例 (33%) に血栓症が認められた。これらの 6 例は、抗 PS/PT 抗体が 19 U/ml 以上の抗体価の高い症例であった。注目すべきことに、深部静脈血栓のみられた 2 例(症例 1 と 9) では、LA や抗 CL/ β_2 GPI 抗体が陰性であるにも関わらず、抗 PS/PT 抗体が陽性であった。

3) 抗 PS/PT 抗体と臨床症状との相関

抗 PS/PT 抗体陽性の SSc 患者群では、指尖部陥凹性瘡痕や指尖潰瘍の頻度が抗体陰性群に比べて有意に高率であった (表 2)。さらに、抗体陽性群では間質性肺炎や原発性肺高血圧症などの肺病変が陰性群よりも有意に高率に認められた。呼吸機能

の %VC、%DLco の低下は、抗体陽性群で有意に高率に認められた。一方、抗体陽性群と陰性群で皮膚硬化の指標である modified Rodnan total skin thickness score に差はみられなかった。このように、抗 PS/PT 抗体は末梢の虚血や肺病変と有意な相関が認められた。

D. 考案

今回の検討で、SSc 患者の 16% に IgG 型抗 PS/PT 抗体が認められた。抗体陽性例の 33% は、LA や抗 CL/ β_2 GPI 抗体の有無に関わらず血栓症を伴っていた (表 1)。抗 PS/PT 抗体が血栓症を引き起こす機序は不明であるが、血管内皮細胞からのトロンピンを介したプロスタサイクリンの産生を抑制したり、プロテイン C の活性化を阻害することが推察されている。また、抗体が血管内皮細胞上の陰性荷電したリン脂質に結合して、PT を介した凝固を促進する可能性も考えられている。最近の研究では、抗 PS/PT 抗体は LA 活性を有し、LA とよく相関することが報告されており、抗 PS/PT 抗体は抗 CL/ β_2 GPI 抗体とともに LA の主要な構成因子と考えられている³⁴。しかしながら、本研究での血栓症のみられた抗 PS/PT 抗体陽性の 6 例のうち、2 例は LA と抗 CL/ β_2 GPI 抗体のいずれも陰性であった。このことから、少なくとも LA や抗 CL/ β_2 GPI 抗体が陰性の症例では、APS のスクリーニングに抗 PS/PT 抗体を加えることが有用かもしれない。

SSc 患者において、抗 PS/PT 抗体と末梢虚血や肺病変との間に有意な相関がみられた。European Phospholipid Project Group の大規模な臨床研究において、APS 患者の数%にみられる臨床症状の中に原発性肺高血圧症、間質性肺炎、皮膚潰瘍や指端壊疽などの末梢虚血などがあげられている⁵。本研究は、虚血に続発する微小血栓や血管内皮細胞に対する免疫を介した機序により、SSc の末梢虚血や肺病変などに抗 PS/PT 抗体が関与していることを示唆しているかもしれない。

E. 結論

LA や抗 CL/ β_2 GPI 抗体に加えて抗 PS/PT 抗体を測定することは、SSc における APS や臨床症状をより把握するために有用と考えられる。

F. 文献

1. Harris EN, Chan JK, Asherson RA, Aber VR, Gharavi AE, Hughes GR: Thrombosis, recurrent fetal loss, and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Intern Med* 1986, 146:2153-2156
2. Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Kikuchi K, Igarashi A, Soma Y, Tamaki K, Takehara K: Measurement of anticardiolipin antibodies by ELISA using β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1996, 105:475-479
3. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, Koike T: Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000, 43:1982-1993
4. Amengual O, Atsumi T, Koike T: Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum* 2003, 48:886-895
5. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, Lakos G, Tincani A, Kontopoulou-Griva I, Galeazzi M,

Meroni PL, Derksen RH, de Groot PG, Gromnica-Ihle E, Baleva M, Mosca M, Bombardieri S, Houssiau F, Gris JC, Quere I, Hachulla E, Vasconcelos C, Roch B, Fernandez-Nebro A, Boffa MC, Hughes GR, Ingelmo M: Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum* 2002, 46:1019-1027

G. 研究発表

1.学会発表

Hasegawa M, Sato S, Takehara K: Antibodies against phosphatidylserine-prothrombin complex in patients with systemic sclerosis. *American College of Rheumatology 67th Annual Scientific Meeting*, Oct.2003, Orland.

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表1. 抗リン脂質抗体陽性の全身性強皮症症例

症例	血栓症	抗 PS/PT 抗体 (U/ml)	ループス 抗凝固因子	抗 CL/ β_2 GPI 抗体
1.	+(DVT)	+(104)	-	-
2.	+(DVT)	+(35.2)	+	-
3.	-	+(29.5)	+	-
4.	-	+(29)	-	-
5.	+(心臓)	+(24.5)	+	-
6.	-	+(24.5)	ND	ND
7.	+(頭部)	+(22)	+	-
8.	+(頭部)	+(19.3)	+	+
9.	+(DVT)	+(19.1)	-	-
10.	-	+(18.2)	+	-
11.	-	+(17)	-	-
12.	-	+(17)	+	-
13.	-	+(15.4)	ND	ND
14.	-	+(15.1)	-	-
15.	-	+(14)	-	-
16.	-	+(13.3)	+	-
17.	-	+(13.2)	+	-
18.	-	+(13)	ND	ND
19.	-	-(9.1)	+	+
20.	+(心臓)	-(8.8)	+	-
21.	+(DVT)	-(8.8)	+	+
22.	-	-(8.1)	+	-
23.	-	-(7.6)	+	+
24.	-	-(6.8)	+	-
25.	+(DVT)	-(6.2)	+	-
26.	-	-(<5)	+	-
27.	-	-(<5)	+	ND
28.	-	-(<5)	+	-
29.	-	-(<5)	+	-
30.	-	-(<5)	+	-

DVT, 深部静脈血栓症; ND, not done.

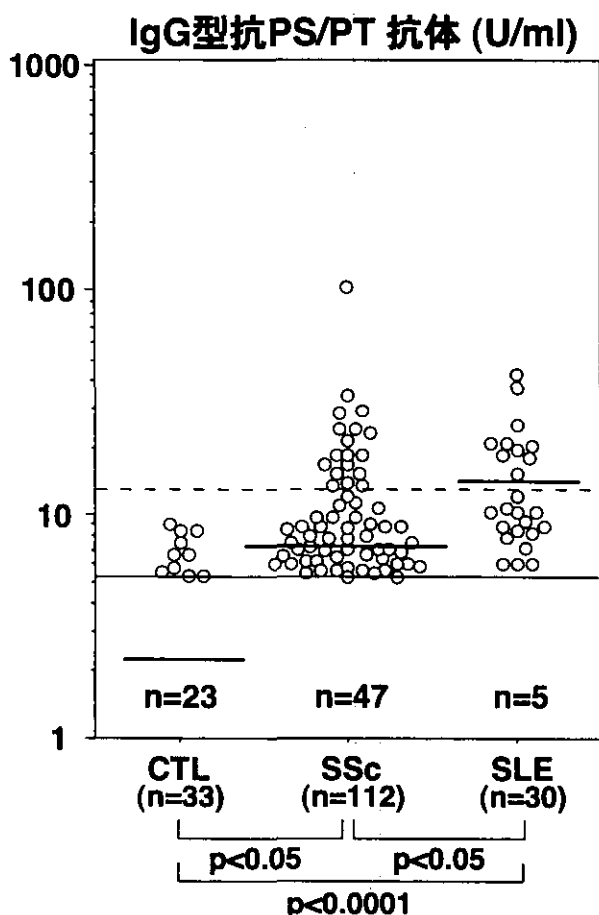


図1 SSc患者、SLE患者、健常人(CTL)血清中の抗PS/PT抗体

抗PS/PT抗体をELISAにて測定した。横線は検出限界(5 U/ml)で、横線の下方の数字は検出限界未満の症例数を示す。点線はCTLの平均値 \pm 3SDから算出したcut-off値を示す。短い横線は各群の平均値を示す。

表2. 抗PS/PT抗体陽性の全身性強皮症患者の臨床症状

	抗PS/PT抗体 (+)* (n=18)	抗PS/PT抗体 (-) (n=94)
発症年齢(年), mean \pm SD	41 \pm 20	46 \pm 15
性, 男:女	4:14	9:85
罹病期間(年), mean \pm SD	5.4 \pm 5.6	5.3 \pm 7.0
皮膚		
mTSS	14.7 \pm 12.0	10.7 \pm 9.3
指尖陥凹性瘡痕	72**	32
皮膚潰瘍	39*	17
肺		
間質性肺炎	78**	36
原発性肺高圧症	56**	18
%VCの低下	61**	24
%DLcoの低下	89**	54
食道	89	63
心臓	39	20
腎臓	17	3
関節	44	22
筋肉	11	14
検査所見		
抗topoisomerase I抗体	56	32
抗セントロメア抗体	22	39
抗RNA polymerase抗体	11	9
抗UIRNP抗体	6	7
ESR亢進	33	24
CRP上昇	22	12

*値は%を示す。mTSS, modified Rodnan total skin thickness score.

**P<0.01, *p<0.05, vs. 抗PS/PT抗体陰性患者群。

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

強皮症におけるフォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン
抗体の陽性率と臨床症状との関連

研究協力者 山崎雅英 金沢大学大学院医学系研究科血液内科 助手
協力者 河嶋洋平 金沢大学大学院医学系研究科臨床検査医学
大学院生（修士課程）
協力者 長谷川稔 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 講師
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授

研究要旨

抗リン脂質抗体の主要抗体の1つと考えられる抗プロトロンビンの強皮症における陽性率と臨床症状の関連につきELISAによる2種類のキットを用いて検討した。強皮症症例において何らかの抗リン脂質抗体を有することは有意な血栓症発症の危険因子であった。強皮症症例についてもフォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)は20.2～31.3%と高率に陽性であることが判明した。IgG型aPS/PT抗体は強皮症における血栓症の危険因子である可能性が示唆されたが、2社のaPS/PTは相関せず、異なった抗体を見ているものと考えられ、aPS/PT抗体測定においては注意を要するものと考えられた。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome, APS)は反復性動・静脈血栓症または不育症を主症状とする自己免疫疾患と考えられている¹⁾。APSは全身性エリテマトーデス(SLE)をはじめとする各種自己免疫疾患に合併することが知られているが、強皮症における合併頻度と臨床所見との関連に関する報告は少ない²⁾。平成14年度の本班会議においてわれわれは強皮症に何らかの抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibodies, aPL)が陽性となる頻度は52.8%と高率であり、aPL、特にループスアンチコアグラント(lupus anticoagulant, LA)陽性例では血栓症の発症危険度が高くなることを報告した²⁾。

LAは凝固時間法を用いた定性的検査であり、その測定・解釈には様々な問題がある。近年、

LAの主要抗原は陰性荷電リン脂質、 β_2 -glycoprotein I (β_2 -GP I)、ヒトプロトロンビン(human prothrombin, hF II)であり、後者2種類に対する抗体が血栓症の危険因子であることが明らかとなってきた¹⁾。さらに、SLEや基礎疾患を有さない原発性抗リン脂質抗体症候群(primary APS, PAPS)では抗プロトロンビン抗体のうち、hF IIそのものに結合する抗プロトロンビン抗体(anti-prothrombin antibody, aPT)は血栓症との関連性は低く、陰性荷電リン脂質であるフォスファチジルセリン(phosphatidylserine, PS)、 Ca^{2+} イオン存在下でヒトプロトロンビンと結合するPS依存性aPT(aPS/PT)が血栓症と強く相関することが報告されている³⁾。

そこで、本年度はこのaPS/PTが測定可能な2社のenzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA)キットを用いて、強皮症とaPS/PT抗体陽性頻度を検討するとともに、強皮症における臨床症状との関連性につき検討した。

B. 研究方法

【対象および方法】金沢大学医学部附属病院皮膚科通院中の強皮症症例 99 例(男性 12 例, 女性 87 例, 年齢 12-78 歳, 中央値 54 歳)を対象とした。臨床所見は診療録・画像検査結果より retrospective に評価した。

aPS/PT は 2 社より市販されている ELISA キットを用いて測定した。A 社のキットはプレートにあらかじめ PS がコートされており, まず hF II および Ca^{2+} を添加して PS/PT complex を形成させ, その後, 検体を添加して洗浄し POX 標識抗ヒト IgG 抗体を加えることで IgG 型 aPS/PT を測定するものである。B 社のキットでは同様にプレートに PS があらかじめコートされているが, hF II またはバッファーを Ca^{2+} イオンとともに添加した後に検体を添加し, 洗浄後に POX 標識抗ヒト IgG または IgM 抗体を加えるキットである。したがって, B 社のキットでは IgG 型, IgM 型の aPS/PT を測定することが可能であるとともに, バッファーを添加した場合にはフォスファチルセリンそのものに対する抗体(anti-phosphatidylserine antibody, aPS)を測定することが可能である。

C. 研究結果

1) 強皮症における抗リン脂質抗体陽性率

強皮症症例における各種抗リン脂質抗体の陽性率を表 1 に示した。99 例中 66 例(66.7%)の症例で何らかの抗リン脂質抗体が陽性であった。もっとも高率に陽性であった抗体はループスアンチコアグラント(LA)で 34.6%であった。抗 PS/PT 抗体のうち, A 社製測定キットでは 21.4%, B 社製キットでは 20.2%で陽性であった。B 社製キットによる IgM-aPS/PT 陽性例は 31.3%であっ

た。

2) 強皮症における血栓症発症頻度

画像診断がなされていた強皮症症例 48 例のうち, 何らかの血栓症が確認された症例は 15 例(31.2%)であった。動脈血栓症は 9 例で認められ, 心筋梗塞が 1 例, そのほかの 8 例では脳梗塞(lacunar 梗塞を含む)であった。静脈血栓症は 7 例で確認され, いずれも深部静脈血栓症であり, うち 2 例では明らかな肺梗塞も認められた。

血栓症が認められた 15 例中何らかの抗リン脂質抗体陽性であった症例は 12 例, 血栓症が認められない 33 例中抗リン脂質抗体陽性例は 22 例であった。すなわち, 血栓症の有無につき検討しえた強皮症症例 48 例について検討すると抗リン脂質抗体陽性例は 34 例(70.8%), 抗リン脂質抗体症候群合併例は 15 例(31.3%)となる。

3) A, B社間の aPS/PT 値の相関

A, B社測定キットによる IgG-aPS/PT および, B 社製測定キットによる aPS と aPS/PT の相関を検討した。

B 社製 aPS と aPS/PT の間には IgG 型抗体では $r=0.998$, $p<0.001$, IgM 型抗体では $r=0.625$, $p<0.01$ と良好な正の相関が見られた(図 1)。

しかし, A, B両社の IgG-aPS/PT の相関係数は $r=0.089$, A 社 IgG-aPS/PT と B 社 IgG-aPS の相関係数は $r=0.11$ であり, 両抗体間に有意な相関はみられなかった(図 2-a, b)。

4) aPS/PT 抗体と LA の関連

aPS/PT 抗体は aCL/β2GPI と並んで, LA の主要抗体の 1 つと考えられることから, 強皮症症例における aPS/PT 抗体価を LA の有無により比較した。

A 社製測定キットによる IgG-aPS/PT 抗体価は LA 陽性群で LA 陰性群より低値を示したものの, 両群間に有意差はみられなかった(7.3 ± 8.0 U/mL vs. 9.5 ± 17.7 U/mL, NS)。一方, B 社製測定キットでは IgG-aPS, IgG-aPS/PT 抗体価とも

LA陽性群で高値を示したものの、有意差は見られなかった(8.4±13.0 U/mL vs. 6.4±7.6 U/mL, NS; 6.5±11.3 U/mL vs. 4.9±6.3 U/mL, NS, respectively).

B社製測定キットを用いて測定したIgM-aPSおよびIgM-aPS/PT抗体価につきLAの有無と比較した結果、両抗体価ともLA陽性群で高い傾向は見られたものの、有意差は認められなかった(8.7±9.0 U/mL vs. 6.5±6.2 U/mL, NS; 7.2±7.3 U/mL vs. 6.6±6.9 U/mL, NS, respectively).

5) 強皮症における各種抗リン脂質抗体と血栓症の関連

χ^2 二乗検定の結果、強皮症において何らかの抗リン脂質抗体を有することは血栓症・動脈血栓症・静脈血栓症の有意の危険因子であった(OR=5.34, $p<0.001$; OR=10.5, $p<0.0001$; and OR=14.2, $p<0.0001$, respectively).

強皮症症例における各種抗リン脂質抗体価と血栓症の関連を対応のないt検定により検討した。

IgG-aPS/PTと血栓症全体、動脈血栓症の有無についてはA、B社いずれの測定キットにおいても抗体価に有意差は見られなかった。一方、A社製測定キットによるIgG-aPS/PT抗体価は静脈血栓症を有する群で有意に高値を示した(24.5±39.4 U/mL vs. 6.8±8.0 U/mL, $p<0.03$)(図2)。B社製キットにより測定したIgM型aPS、aPS/PT抗体価は血栓症の有る群と無い群で有意な相違はみられなかった。

D. 考察

抗リン脂質抗体は種々の自己免疫疾患や感染症などで陽性となる一方、健康成人の2-3%でも認められることが知られている¹⁾が、強皮症における本抗体の陽性率および血栓症の発症頻度に関する報告は少ない²⁾。

今回の検討で、強皮症においても抗リン脂質

抗体が66.7%と高率に検出されることが明らかとなった。この陽性率はわずかに見られる既報と比較して高率である。これは、抗リン脂質抗体の検出感度によるものと考えられる。すなわち、多くの施設では抗リン脂質抗体のうち、定性検査であるループスアンチコアグラント(LA)を院外検査に頼っていることと関係している。LAは添加するリン脂質濃度を低くすることにより測定感度を高めることができる。したがって、検体を処理する際に血漿中の血小板を完全に除去しないと検体の凍結融解により残存血小板より陰性荷電リン脂質が溶出し、LA検出感度を低くしてしまうことが知られている³⁾。多くの施設では検体処理の際に通常の遠心処理(3000 G×15分、1回冷遠心)しかしていないためかなりの「偽陰性」症例が含まれていることが予想される。また、LAの検出感度は用いる試薬によっても感度が大きく異なるため、PT、APTTが正常であれば、それ以上の精査を行っていない施設が多いことも関与している可能性がある。

一方、抗リン脂質抗体が陽性であっても必ずしも血栓症をきたすわけではない。今回画像検査を含め、血栓症の有無につき検討した強皮症症例48例では抗リン脂質抗体陽性例が34例(70.8%)、抗リン脂質抗体症候群併発例が15例(31.3%)であり、抗リン脂質抗体陽性例中血栓症を認める頻度は44.1%と決して高くない。これは抗リン脂質抗体のサブクラスにより血栓症を発症しやすい抗体と発症しにくい抗体があることを示唆する所見と考えられ、今後の検討課題である。

強皮症における血栓症発症頻度は検索しえた症例に限ると、48症例中15例(31.3%)と高率であり、抗リン脂質抗体陽性例では血栓症発症の危険度が有意に高まることがしめされた。これまでの報告では強皮症に血栓症が合併する頻度は10%前後とする報告が多いが、今回の結果より、強皮症についてもかなりの高率で血栓症が発症

することが確認された。本年度の班会議では強皮症の重症度規定因子は腎・肺・関節・消化管のほか、血管病変が挙げられている。強皮症の血管病変は血管周囲の繊維化による血管径の狭小化が主体とされているが、最終的には血栓により血管閉塞が生じると考えられることから、抗リン脂質抗体の存在は強皮症の血管病変の進展に影響する可能性がある。強皮症においても抗リン脂質抗体の存在の有無を検討するとともに、抗体陽性例では動静脈血栓症の有無を検索し、抗血栓療法を併用することにより血管病変進展を抑制することが可能かもしれない。

抗リン脂質抗体の主要抗体は抗カルジオリピン抗体とループスアンチコアグラントである。このうち、ループスアンチコアグラントの本体は近年、 β 2-glycoprotein I 依存性抗カルジオリピン抗体と抗プロトロンビン抗体であることが明らかとなり¹⁾、抗プロトロンビン抗体測定が行われるようになった。欧米では γ 照射プレートを用いた抗ヒトプロトロンビン抗体(aPT)の測定が行われ、本抗体は抗リン脂質抗体症候群症例における血栓症との関連性は β 2-glycoprotein I 依存性抗カルジオリピン抗体と比して高くない、とする報告が相次いだ⁵⁾。しかし、著者や北海道大学の渥美らは、 Ca^{2+} 存在下で陰性荷電リン脂質(phosphatidylserine; PS)と結合する抗ヒトプロトロンビン抗体(aPS/PT)が抗リン脂質抗体症候群における血栓症発症と強い関連があることを報告し、PSをコートしたプレートに Ca^{2+} とヒトプロトロンビン(PT)を添加することによりPS/PT複合体に対する抗体(aPS/PT)を測定することを提案した³⁾。その結果、SLEや原発性抗リン脂質抗体症候群(PAPS)では、IgG-aPS/PT陽性症例で血栓症発症頻度が高いこと、一方、本抗体はSLEやPAPS以外ではほとんど検出されないことが報告されている³⁾。

今回、強皮症症例でもIgG-aPS/PTはA、B両社のキットとも20%以上の症例で陽性であった。

このことはSLE以外の自己免疫疾患症例においてもaPS/PTが比較的高率に検出されることを示しており、さまざまな疾患で本抗体を測定する意義はあるものと考えられる。

しかし、A、B両社のキットでaPS/PT値は有意の相関を示さなかった(図2)。その原因としては、①添加リン脂質濃度の相違による抗原とのアフィニティー(結合力)の相違、②抗体が認識する抗原エピトープが異なる、ことなどが考えられる。

SLEや原発性APS(PAPS)では両キット間で良好な相関が認められていることから同じaPS/PTでも基礎疾患によりサブタイプがあり、SLE、PAPSで検出されるaPS/PTは比較的均一であるのに対し、特に強皮症ではaPS/PTにも多様性があるのかもしれない。今回の検討で、SLE、PAPSと比較して強皮症でaPS/PTと血栓症との間に有意な相関が認められなかったことも、aPS/PTの多様性を示唆する所見と考えられる。aPS/PTの多様性について今後の検討課題といえよう。

E. 結論

強皮症症例においても抗リン脂質抗体が検出される頻度は66.7%と高く、抗体陽性例では血栓症発症の危険度が高いことが示された。強皮症でも30%前後の症例では血栓症を発症することから、各種画像診断を含む血栓症の有無を検索するとともに特に抗リン脂質抗体陽性症例では予防的抗血栓療法の要否も含め、慎重な経過観察を要するものと考えられた。フォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体は強皮症症例の20%前後で検出されるものの血栓症との関連は明らかでなく、また2種類の検出法でまったく関連しないことから、全身性エリテマトーデスや原発性抗リン脂質抗体症候群における同抗体とは異なるものを検出している可能性があり、その意義を含めて今後の検討課題である。

F. 文献

- 1) 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.
- 2) 山崎雅英, 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.
- 3) Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, Koike T. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 43(9): 1882-1893, 2000.
- 4) 御館靖雄, 朝倉英策, 水谷朋恵, 加藤みのり, 伊藤貴子, 山崎雅英, 森下英理子, 吉田知孝, 斎藤正典, 青島敬二, 南真司, 中尾眞二. ループスアンチコアグラントの検出について—冠攣縮性狭心症から心筋梗塞をきたした 1 例を通じて—. *日本血栓止血学会誌* 12(6): 493-499, 2001.
- 5) Guerin J, Smith O, White B, Sweetman G, Feighery C, Jackson J. Antibodies to prothrombin in antiphospholipid syndrome and inflammatory disorders. *Br J Haematol* 102(4): 896-902, 1998.

G. 健康危険情報

特記すべきことは認めない。

H. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 山崎雅英.: 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) 山崎雅英, 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, 南真司, 中尾眞二.: 上部消化管出血に対するトラ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) 山崎雅英, 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) 山崎雅英: 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 膠原病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:102-107, 2003.
2. 学会発表
- 1) 山崎雅英, 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.
- 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. 19th International ISTH (International Society of Thrombosis and Haemostasis) Congress, July 12-18, 2003, Birmingham, UK
- 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). 19th International ISTH (International Society of Thrombosis and Haemostasis) Congress, July 12-18, 2003, Birmingham, UK
- 4) 山崎雅英. 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.
- 5) 山崎雅英. 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(日本内科専門内科医雑誌, 印刷中)
- 6) 山崎雅英. ループスアンチコアグラント標準化: 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) 山崎雅英, 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). 45th Annual meeting of American Society of Hematology, August 5-10, 2003. San Diego, USA. (Blood 102(11), 806a, 2003 年 12 月)
- I. 知的所有権の出願・登録状況
なし

表1. 強皮症における各種抗リン脂質抗体の陽性率

抗リン脂質抗体	陽性率
IgG-aPS/PT (A社)	21 / 99 例 (21.4%)
IgG-aPS (B社)	27 / 99 例 (27.3%)
IgG-aPS/PT (B社)	20 / 99 例 (20.2%)
IgM-aPS	20 / 99 例 (20.2%)
IgM-aPS/PT	31 / 99 例 (31.3%)
Lupus anticoagulant	18 / 52 例 (34.6%)
aCL	8 / 32 例 (25.0%)
aCL/ β_2 GPI	2 / 29 例 (7.8%)
いずれかの抗リン脂質抗体陽性例	66 / 99 例 (66.7%)

aPS/PT; フォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体, aPS; 抗フォスファチジルセリン抗体, aCL; 抗カルジオリビン抗体, aCL/ β_2 GPI; β_2 -glycoprotein I 依存性抗カルジオリビン抗体

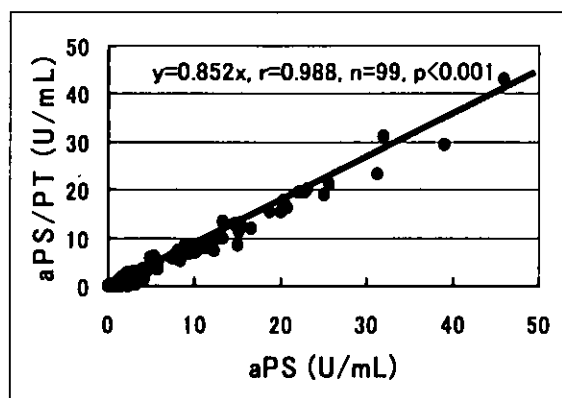


図1. IgG-aPS/PTとIgG-aPSの相関
IgG型aPS/PTとaPSの間には強い有意の正相関が認められる($y=0.852x$, $r=0.988$, $n=99$, $p<0.0001$).

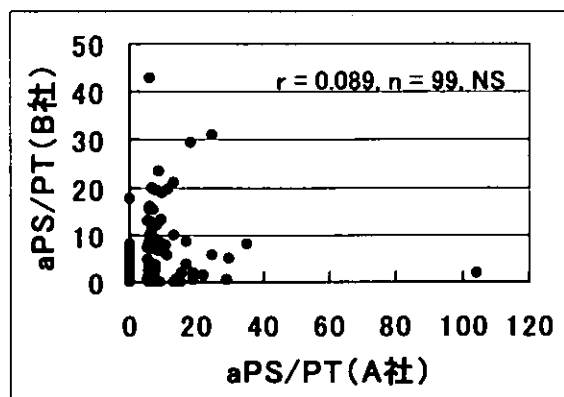


図2-a. A, B両社の測定キットによるIgG型aPS/PTの相関
A, B両社製キットを用いて測定したIgG型aPS/PTの間には有意の相関は見られない($r=0.089$, $n=99$, not significant).

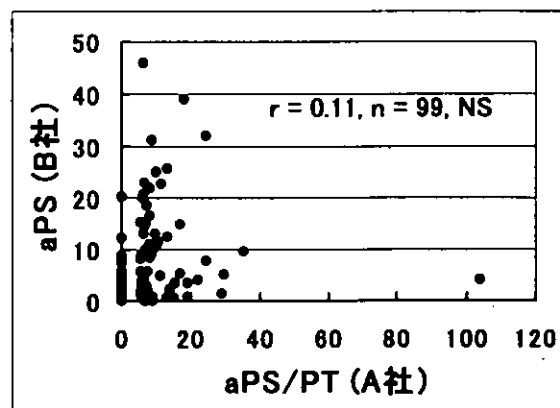


図2-b. A社製測定キットによるIgG型aPS/PTとB社測定キットによるIgG型aPSの相関
両抗体価には有意の相関は認められない($r=0.11$, $n=99$, not significant).

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

全身性強皮症における血液中B細胞ホメオスターシスの異常

分担研究者 佐藤伸一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
分担研究者 藤本 学 国立国際医療センター研究所
細胞組織再生医学研究部室長
協力者 長谷川稔 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

全身性強皮症（SSc）では血液中ナイーブB細胞が増加し、一方、メモリーB細胞や形質細胞前駆細胞は減少していた。SSc由来メモリーB細胞ではCD19、CD80、CD86の発現が増強し、慢性的な活性化が示唆された。さらに、SSc由来メモリーB細胞ではCD95発現増強とアポトーシスの亢進が認められたが、免疫グロブリンの産生は増強していた。このように、SScでは血液中B細胞サブセットの数と機能に内在性の異常が認められた。

A. 研究目的

T細胞ではCD45ROがメモリーT細胞のマーカーとしてよく知られているが、最近、CD27がB細胞におけるメモリー細胞の表面マーカーとして報告された¹⁻³⁾。CD27はメモリーB細胞の他、大部分のT細胞にも発現するtumor necrosis factor受容体ファミリーに属する分子である²⁾。CD27はT細胞上のCD70と結合すると、B細胞内ヘシグナルを伝達し、形質細胞への分化を誘導する。末梢血液をCD19とCD27で二重染色すると、CD27陰性のナイーブB細胞、CD27を中程度発現（CD27^{med}）するメモリーB細胞、およびCD27を高発現（CD27^{hi}）するプラズマプラスト即ち形質細胞前駆細胞が区別できる。

このCD27を用いて、様々な膠原病で末梢血液中のB細胞サブセットの異常が解析されつつある。全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus; SLE）ではCD27^{hi} CD38⁺のプラズマプラストの増加が認められ、その増加は疾患活動性と相関することが報告されている⁴⁻⁶⁾。また、シェーグレン症候群ではメモリーB細胞の減少が報告されている^{7,8)}。このように、各種膠原病ではそれぞれ固有のB細胞ホメオスターシスの異常がみいだされてきた。

全身性強皮症（systemic sclerosis; SSc）は高γ-グロブリン血症や自己抗体産生を特徴とするが、そのB細胞の表現型や機能の異常に関してはほとんど解析されていない。そこで、今回末梢血液中のB細胞サブセットや