

表 3 Clinical and laboratory features of SSc patients positive for IgG anti-LPL Ab.

	IgG anti-LPL Ab (+) n = 31	A. IgG anti-LPL Ab (-) n = 99
Sex (male: female)	6 : 25	10 : 89
Age (mean \pm SD years)	42.0 \pm 17.3	46.9 \pm 14.8
Disease duration (mean \pm SD years)	7.0 \pm 9.7	6.9 \pm 8.7
Modified Rodnan TSS (mean \pm SD)	13.7 \pm 12.7*	9.7 \pm 7.5
Digital pitting scars/ulcers	44	31
<i>Organ involvement</i>		
Pulmonary fibrosis	68**	31
Pulmonary hypertension	11	11
Esophagus	80	68
Heart	35*	15
Kidney	8	1
Joint	28	24
Muscle	20	16
<i>Laboratory findings</i>		
Elevated serum triglyceride	48	35
Elevated serum total cholesterol	35	30
Anti-topoisomerase I Ab	52*	24
Anticentromere Ab	19*	47

Unless noted otherwise, values are percentages.

*p < 0.05; **p < 0.005 vs. patients without IgG anti-LPL Ab.

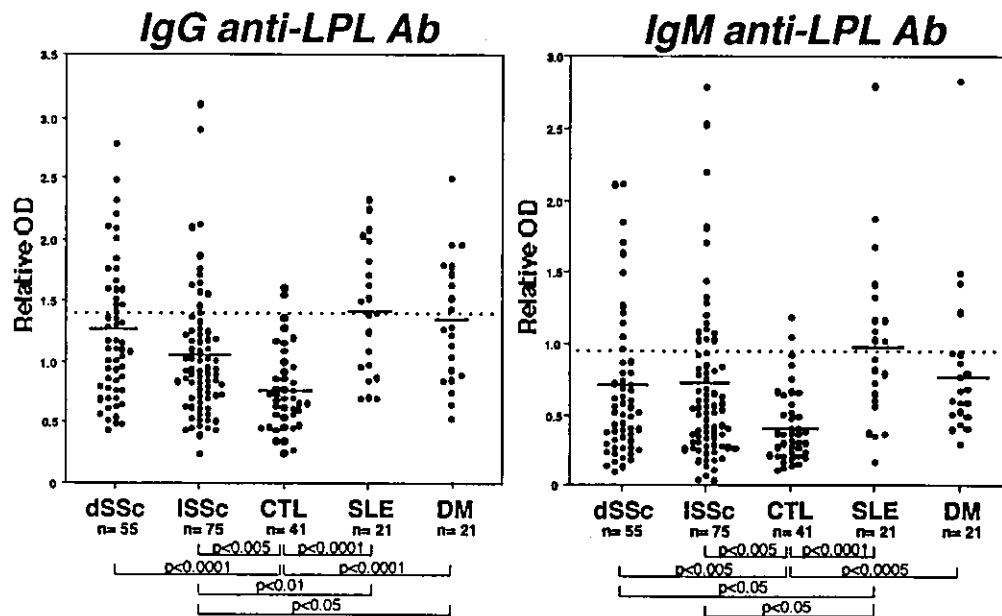


図1 SSc、SLE、DM患者および健常人における血清中の抗LPL抗体価

IgG および IgM 抗 LPL 抗体価は ELISA にて測定した。図中の各群内の短横線はそれぞれの群の平均値を示す。破線は健常人コントロールの平均値+2SD すなわち cut off 値を示す。

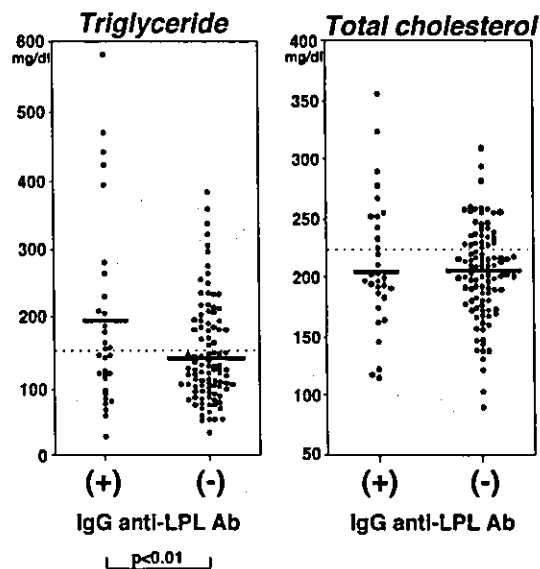


図2 SSc患者におけるIgG抗LPL抗体の有無による血清中の中性脂肪値、総コレステロール値の比較

図中の各群内の短横線はそれぞれの群の平均値を示す。破線は正常上限値を示す。

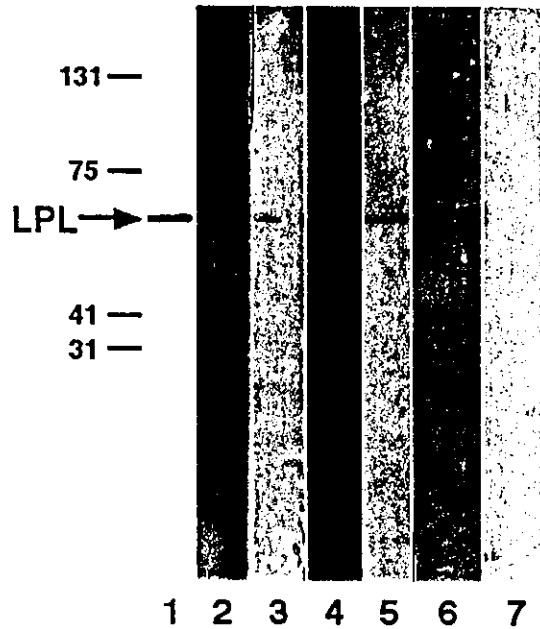


図3 IgG 抗 LPL 抗体陽性 SSc 患者血清を用いた免疫ブロット法による検討

SSc 患者および健常人血清と精製 LPL を用いて免疫ブロットを施行した。レーン 1 は colloidal gold 染色、レーン 2～5 は ELISA にて IgG 抗 LPL 抗体陽性 SSc 患者血清、レーン 6 は IgG 抗 LPL 抗体陰性 SSc 患者血清、レーン 7 は健常人血清を示す。分子量 (kDa) は左側に示す。

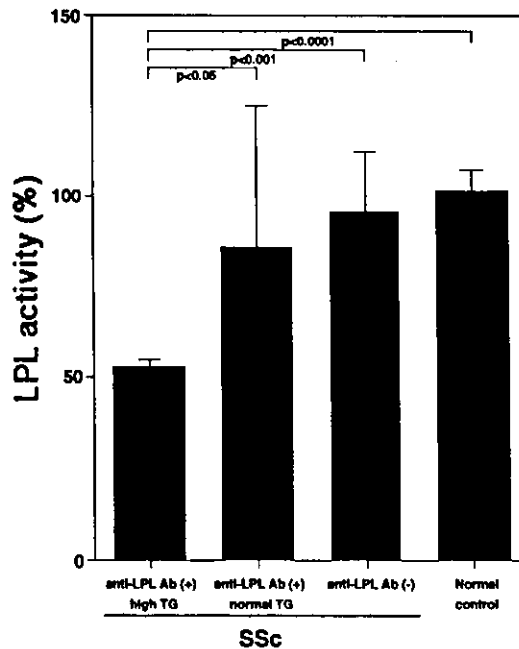


図4 SSc 患者血清より精製した IgG による LPL 活性の抑制

ELISA にて IgG 抗 LPL 抗体陽性かつ高 TG 血症を認める SSc 患者 (anti-LPL Ab(+), high TG)、IgG 抗 LPL 抗体陽性であるが TG 正常値の SSc 患者 (anti-LPL Ab(+), normal TG)、IgG 抗 LPL 抗体陰性の SSc 患者 (anti-LPL Ab(-)、健常人のそれぞれより IgG を精製した。LPL 活性は精製 LPL 単独で IgG を添加しない場合の活性を 100%とし、各群 10 人の活性をパーセンテージで示す。それぞれの群のヒストグラムは平均値および SD を示す。

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抗 MMP-3 抗体

分担研究者	佐藤伸一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚病態学分野教授
協力者	西島千博	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助手
協力者	松下貴史	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
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

ヒト組み換え MMP-3 を抗原として用いた ELISA 法では IgG 型抗 MMP-3 抗体は、SSc 患者で有意に高値を示したが、SLE 患者および DM 患者では高値を示さなかった。また、IgG 型抗 MMP-3 抗体および IgM 型抗 MMP-3 抗体は dSSc で ISSc に比較して有意に高値であった。IgG 型あるいは IgM 型抗 MMP-3 抗体は SSc 患者の 52% で陽性であり、病型別には、dSSc 患者では 71% に陽性、ISSc 患者では 33% に陽性であった。その他、SLE では 23%、DM では 21%、健常人では 8% に陽性であった。また、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、皮膚・肺・腎臓の血管における線維化の程度と、IgM 型抗 MMP-3 抗体価は皮膚硬化の程度と相関した。IgG 型抗 MMP-3 抗体が検出された患者血清を用いて、MMP-3 を抗原とした免疫プロット法を施行し、抗 MMP-3 抗体の存在が確認された。また、IgG 型が陽性をした SSc 患者血清から抽出した IgG は、MMP-3 活性を阻害した。RT-PCR 法で、SSc 患者皮膚における MMP-3 の発現を測定したが、陽性率および発現量とも、健常人、抗 MMP-3 抗体陽性 SSc 患者、抗 MMP-3 抗体陰性 SSc 患者で有意差を認めなかった。以上により、抗 MMP-3 抗体が MMP-3 活性を阻害することによって ECM のターンオーバーが減少し、線維化に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症(SSc)は、皮膚、肺臓、腎臓、食道、心臓など多臓器に線維化を来す、自己免疫疾患である。SSc では、I 型 III 型コラーゲンを中心とした細胞質外マトリックス(extracellular matrix: ECM)の過剰集積が認められる(1-3)。V 型 VI 型 VII 型コラーゲン、

フィブロネクチン、グルコサミノグリカン、デコリンの発現が、SSc の組織中あるいは培養線維芽細胞で発現が亢進していることも報告されている(4-6)。マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metallo proteinase:MMP)は Zn を活性部位にもつエンドペプチダーゼであり、細胞質外

マトリックス(extracellular matrix:ECM)の分解に中心的役割を担っている。MMP-1 は I,II,III,VII,VIII,X,XI 型コラーゲンのほかフィブロネクチン、ラミニン、テネイシン、ピトロネクチンを分解する。MMP-3 (ストロメライシン-1) は、III,IV,V,VII,IX 型コラーゲン、デコリン、エラスチン、フィブリリン、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン、ピトロネクチン、オステオネクチン、pro-MMP-1, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13 を含む、さらに広範囲の基質を分解することができる(8)。MMP-3 は線維芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージに発現している。MMP は生成された後細胞内から細胞質外へプロエンザイムとして分泌され、プラスミンなどのプロテアーゼにより分解されて活性型に変換される(8)。MMP の活性は、TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinases)により特異的に 1:1 で結合して阻害される(9)。MMP の不活化が SSc において重要な役割を担っている可能性がある(10)。

自己免疫は SSc の中心的特徴のひとつであり、90%以上の SSc 患者に自己抗体が検出される(11)。自己抗体の病因への関与は不明であるが、自己抗体と組織障害の関連は指摘されてきている。すなわち、抗 topoisomerase-I 抗体の抗体価は、SSc の病勢や活動性と相関することが報告されている(12)。さらに、SSc モデルマウスであるタイトスキンマウスでは、自己抗体産生の除去により、皮膚の線維化抑制が認められた(13)。

また、SSc 患者に抗 MMP-1 抗体が検出され、当抗体は MMP-1 の酵素活性を阻害したことを報告した(10)。しかし、V 型コラーゲン、デコリン、オステオネクチン、エラスチン、フィブリリンのような、SSc に関連した線維化に必要な ECM は、MMP-3 では分解されるが、MMP-1 では分解されない。そこで、MMP-3 に対する自己抗体が産生されている可能性があるとして仮説を立て、抗 MMP-3 抗体の陽性率および抗体価について、臨床症状との相関、抗体の機能について評価した。

B.研究方法

1) 対象患者

対象患者は ACR の診断基準(14)を満たす SSc 58 例(女性 54 例、男性 4 例)であり、年齢は 51 ± 15 歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 30 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 28 例(15)であった。ISSc と dSSc の罹病期間はそれぞれ 9.7 ± 10.0 年、 5.2 ± 6.8 であった。初診時ステロイド、D-ペニシラミン、他の免疫抑制剤にて治療されていた患者は除外した。自己抗体として抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 24 例、抗セントロメア抗体陽性例が 24 例、抗 U1RNP 抗体陽性例が 4 例、抗 Th/To 抗体陽性例が 2 例、抗核抗体陽性であるものの対応抗原不明が 4 例であった。ACR 診断基準(16)を満たす SLE 患者のうち SLEDA(17)により活動性ありとした 22 例、Bohan&Peter 診断基準(18,19)を満たす皮膚筋炎(DM)患者および 24 例の健常人をコントロールとして用いた。

2) ELISA

血清中抗 MMP-3 抗体は、ELISA 法にて検出した。96 穴のマイクロタイタープレートに 1 µg/ml のヒトリコンビナント MMP-3 (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN) でコートし、2%のウシ血清アルブミンと 1%のゼラチンにてブロッキングした後、100 倍に希釈した血清と室温で 90 分反応させた。検出にはアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgM あるいは IgG 抗体を用い、吸光度を測定した。

3) 免疫プロット法

ヒトリコンビナント MMP-3 (0.1 µg/レーン)を 10-20%グラディエントゲルに泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜は 50 倍に希釈した血清と一晚反応させ、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体を用いて発色させた。

4) MMP-3 活性阻害試験

ヒト protein G を表面に結合させたマグネットビーズを用いて、血清から IgG を分離精製した。MMP-3 活性は、stromelysin (MMP-3) 活性測定キット (ヤガイ) を用いた。60ng の MMP-3 を、40 µg の精製した IgG とを 20°C で 20 分反応させた。MMP-3 の酵素活性は蛍光標識されたアセチルカゼインの、MMP-3 による酵素分解による分解産物量で評価した。

5) RT-PCR による MMP-3 の mRNA 発現量の評価

発症早期の dSSc 患者の皮膚病変部位における、MMP-3 mRNA 発現量を real time RT-PCR 法により調べた。そのうち 5 例は

抗 MMP-3 抗体が陽性であり、5 例は陰性であった。また、健常人 6 例についても

>評価した。前腕伸側より施行した生検組織は生検後即時凍結し、-80°C で保存した。

凍結組織から mRNA を Quiagen RNeasy spin column (Quiagen Ltd, Crawley, UK) を用いて抽出し、逆転写反応にて cDNA を合成した。ABI プリズム 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) にて real time PCR を施行した。GAPDH を内在遺伝子とし、MMP-3 mRNA の相対量を算出した。

6) 抗 MMP-1 抗体と抗 MMP-3 抗体の交叉反応について

抗 MMP-3 抗体が陽性で、抗 MMP-1 抗体が陰性の患者 5 例の血清 40 µl より、IgG を抽出した。同じく、抗 MMP-3 抗体が陰性で抗 MMP-1 抗体が陽性の患者 5 名からも血清 40 µl より IgG を抽出した。抽出した IgG は、それぞれ 5 µg のヒトリコンビナント MMP-1, MMP-3 と 30 分間室温で反応させた。抗 MMP-3 抗体および抗 MMP-1 抗体に価を、ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

1) ELISA による抗 MMP-3 抗体

MMP-3 に対する自己抗体のレベルは、ヒトリコンビナント MMP-3 を抗原に用いた ELISA によって測定した (図 1)。SSc 患者全体では、IgG 型抗 MMP-3 抗体は、SLE 患者 ($P < 0.0005$)、DM 患者 ($P < 0.05$)、健常人 ($P < 0.0001$) と比較して有意に高値を示した。IgM 型抗 MMP-3 抗体は、健常人 ($P = 0.054$) に比較すると高い傾向を示したが

SLE、DM 患者とは有意差を示さなかった。病型別には、dSSc では、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、ISSc ($P < 0.001$)、SLE ($P < 0.0001$)、DM ($P < 0.0001$)、健常人 ($P < 0.0001$)と比較して有意に高値を示した。IgM 型抗 MMP-3 抗体価は、dSSc において ISSc ($P < 0.05$)、健常人 ($P < 0.05$)に比較して有意に高値を示した。ISSc では、健常人 ($P < 0.0001$)、SLE ($P < 0.0001$)に比較して有意に高値を示したが、IgM 型抗 MMP-3 抗体価は高値を示さなかった。IgG 型抗 MMP-3 抗体価と、IgM 型抗 MMP-3 抗体価は、正の相関 ($r=0.288$, $P < 0.005$)を示した。しかし、IgG 型および IgM 型抗 MMP-3 抗体価は、抗トポイソメラーゼ I 抗体価、抗セントロメア抗体価との相関は認められなかった。以上により、IgG 型抗 MMP-3 抗体は、SSc で上昇しており、SLE や DM など他の膠原病では上昇していないことが明らかとなった。

2) 抗 MMP-3 抗体と臨床症状との相関

健常人の吸光度の平均 $\pm 2s.d.$ (IgG 型抗 MMP-3 抗体価 0.536、IgM 型抗 MMP-3 抗体価 0.498) を高値とした (図 1)。IgG 型あるいは IgM 型抗 MMP-3 抗体は、SSc 全体の 52% に陽性を示した。また、dSSc の 71%、ISSc 患者の 33% に陽性であった (表 1) 一方、健常人では 2 例のみ (8%) に陽性であった。

抗 MMP-3 抗体価と皮膚硬化、腎血管障害、肺線維症の程度との相関を検討した。IgG 型抗 MMP-3 抗体価 ($P < 0.001$, 図 2a) および IgM 型抗 MMP-3 抗体価 ($P < 0.01$, 図 2b) は、modified Rodnan TSS と正の相関を示した。

同様に、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、ドップラーエコー法による腎血管抵抗の指標である、葉間動脈における pulsatility index 値と正の相関 $P < 0.05$, 図 2c) を示した。さらに、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、%VC 値と負の相関 ($P < 0.05$, 図 2d) を示した。以上により、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、皮膚、肺、腎血管における線維化の程度と相関することが明らかとなった。

3) 免疫プロット法による抗 MMP-1 抗体の検出

抗 MMP-3 抗体の存在を確認するため、ヒトリコンビナント MMP-3 を抗原に用いた免疫プロット法を行った。(図 3) 金コロイドによる蛋白染色では、約 52kDa の MMP-3 によるバンドが認められた (レーン 1)。ELISA にて抗 MMP-3 抗体が陽性であった SSc 血清は、すべて MMP-3 との反応性が観察された (レーン 2-5)。抗トポイソメラーゼ I 抗体あるいは抗セントロメア抗体が陽性あるが、ELISA にて抗 MMP-3 抗体が陰性の SSc 血清では、MMP-3 との反応性は認められなかった (レーン 6)。健常人血清では、MMP-3 のバンドは認められなかった。以上により、SSc における抗 MMP-3 抗体の存在は免疫プロット法にても確認された。

4) 抗 MMP-3 抗体による MMP-3 酵素活性の抑制

抗 MMP-3 抗体が、MMP-3 の酵素活性を抑制しうるかそうかを検討した (図 4)。患者血清より IgG を分離して、それを MMP-3

と反応させた後、MMP-3 の活性を、MMP-3 によって分解された基質量を測定することにより測定した。健常人血清では、MMP 活性は抑制されなかった。それに対して、ELISA において IgG 型抗 MMP-3 抗体が陽性の SSc 患者血清は、MMP-3 の活性を 26%と有意に抑制した($P<0.0005$)。ELISA にて抗 MMP-3 抗体が陰性であり、抗トポイソメラーゼ I 抗体など他の自己抗体が陽性 SSc 血清では、MMP-3 活性の抑制は認められなかったことから、この抑制は抗 MMP-3 抗体以外の自己抗体によるものではないと考えられた。このように、SSc 由来の抗 MMP-3 抗体は、実際に MMP-3 の酵素活性を抑制することが示された。

5) SSc 病変部皮膚における MMP mRNA の発現について

これまでの報告では、早期 SSc 患者の培養線維が細胞は MMP mRNA 発現が亢進していることが報告されている(6)。一方で、他の報告では SSc の皮膚線維芽細胞では、MMP-3 を含むコラゲナーゼ活性が低下しているとも報告されている(20)。そこで、SSc 病変部皮膚における MMP-3 発現を評価するため、RT-PCR によって皮膚の MMP-3 mRNA 発現量を測定した(図 4)。MMP-3 mRNA 量は、抗 MMP-3 抗体陽性の発症早期 dSSc 患者の 40% (2/5) に、抗 MMP-3 抗体陰性の発症早期 dSSc 患者の 40%(2/5) に認められた。同様の結果 50%(3/6)は、健常人皮膚においても認められた。さらに、MMP-3 mRNA 発現量は、dSSc 病変部皮膚 (6.7 ± 14.5)と健常人皮膚(30.5 ± 46.9)の間に

有意差は認められなかった。また、発症早期 dSSc 患者皮膚においては、抗 MMP-3 抗体が陽性(11.1 ± 20.2)と陰性(2.4 ± 4.2)患者の間に、MMP-3 mRNA 発現量の有意差は認められなかった。よって、抗 MMP-3 抗体の有無にかかわらず、SSc の病変部皮膚の MMP-3 mRNA 発現は、正常であることが明らかとなった。

6) 抗 MMP-3 抗体と抗 MMP-1 抗体の交叉反応について

IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、IgG 型抗 MMP-1 抗体価と正の相関を示した($P<0.001$, 図 6)。同様の相関は、IgM 型抗 MMP-3 抗体価と IgM 型抗 MMP-1 抗体価の間にも認められた($P<0.0001$)。しかし、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、血清から抽出した IgG を MMP-1 と反応させた後(吸光度 0.89 ± 0.27)でも、反応前(0.90 ± 0.19)と比較して有意な低下は認められなかった。また MMP-3 と反応させた後では有意な低下(0.58 ± 0.29)を認めた。同様に、IgG 型抗 MMP-1 抗体価は、IgG を MMP-3 と反応させた後(0.98 ± 0.15)でも、反応前(0.97 ± 0.12)と比較して有意な低下は認められなかった。また MMP-1 と反応させた後では有意な低下(0.59 ± 0.20)を認めた。以上により、抗 MMP-3 抗体と抗 MMP-1 抗体は交叉反応をしないことが明らかになった。

D. 考 案

当研究では、抗 MMP-3 抗体が SSc 患者の約 50%に、特に重症型である dSSc 患者では約 70%に検出された。さらに、IgG 型および IgM 型抗 MMP-3 抗体価は、dSSc で ISSc に比較して高値を示した。また、IgG 型抗 MMP-3 抗体価は、皮膚、肺、腎血管における線維化の程度と相関していた。抗 MMP-3 抗体は免疫ブロット法で確認した。以上により、抗 MMP-3 抗体は、SSc の重症度の指標になる可能性があると考えられる。

SSc で認められる自己抗体の対応抗原は細胞分裂に必須の細胞内分子である。しかも、これらの自己抗体が細胞内に侵入するという根拠はほとんどない。従って、SSc では自己抗体は組織障害を引き起こして病態に直接関与することは考えにくい。我々は抗 MMP-1 抗体が、ECM の分解を減らすことで SSc における ECM 蓄積に関与している可能性を指摘した(10)。しかし、V 型コラーゲン、デコリン、オステオネクチン、エラスチン、フィブリリン増加は、抗 MMP-1 抗体のみでは説明できない。本研究では、SSc 血中の IgG 型抗 MMP-3 抗体は、これらの ECM を分解可能な MMP-3 の酵素活性を阻害することが確認された。抗 MMP-3 抗体価は抗 MMP-1 抗体価と正の相関を示したが、交叉反応は示さなかったことから、抗 MMP-3 抗体と抗 MMP-1 抗体はそれぞれ独立した自己抗体であるといえる。MMP-1 と、MMP-3 は、それぞれ異なる ECM を分解することから、この二つの自己抗体は SSc の線維化に協調して関与している可能性がある。総合的に考え

て、本研究の結果から、抗 MMP-3 抗体は、MMP-3 の MMP-3 の活性を阻害することにより ECM のターンオーバーを減らすことにより線維化に関与している可能性が示唆された。

E. 結 論

本研究により抗 MMP-3 抗体は、SSc の発症における SSc の発症における全身性自己免疫の役割を理解するための鍵となる可能性が示された。

F. 文 献

1. Jimenez SA, Hitraya E, Varga J. Pathogenesis of scleroderma. Collagen. Rheum Dis Clin North Am 1996; 22:647-74.
2. Lovell CR, Nicholls AC, Duance VC, Bailey AJ. Characterization of dermal collagen in systemic sclerosis. Br J Dermatol 1979; 100:359-69.
3. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. J Clin Invest 1974; 54:880-9.
4. Peltonen J, Kahari L, Uitto J, Jimenez SA. Increased expression of type VI collagen genes in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1990;

- 33:1829-35.
5. Xu WD, Leroy EC, Smith EA. Fibronectin release by systemic sclerosis and normal dermal fibroblasts in response to TGF-beta. *J Rheumatol* 1991; 18:241-6.
 6. Kuroda K, Shinkai H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 1997; 289:567-72.
 7. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463-516.
 8. Eeckhout Y, Vaes G. Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J* 1977; 166:21-31.
 9. Apte SS, Olsen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem* 1995; 270:14313-8.
 10. Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2003; 120:542-7.
 11. Okano Y. Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22:709-35.
 12. Sato S, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K. Clinical significance of anti-topoisomerase I antibody levels determined by ELISA in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40:1135-40.
 13. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002; 109:1453-62.
 14. 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.
 15. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger Jr TA, Rowell N, Wollheim F. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification,

- subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15:202-5.
16. Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.
17. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH, theCommitteeonPrognosisStudiesin SLE. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35:630-40.
18. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975; 292:344-8.
19. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 1975; 292:403-7.
20. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994; 103:359-63.
- systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 138:357-363,2004.
2. 学会発表
- Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. 2004 ACR/ARHP annual scientific meeting, San Antonio, Texas. October 16-21, 2004

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishijima C, Hayakawa I, Matsushita T, Komura K, Hasegawa M, Takehara K, Sato S: Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with

Table 1. 膠原病および健常人における抗 MMP-3 抗体陽性率*

	Anti-MMP-3 Ab		
	IgG	IgM	IgG or IgM
SSc (n=58)	25 (43)	12 (21)	30 (52)
ISSc (n=30)	8 (27)	2 (7)	10 (33)
dSSc (n=28)	17 (61)	10 (36)	20 (71)
SLE (n=22)	4 (18)	4 (18)	5 (23)
DM (n=14)	2 (14)	2 (14)	3 (21)
Normal (n=24)	2 (8)	0	2 (8)

* 数値は、ヒトリコンピナント MMP-3 を用いた ELISA 法による、抗 MMP-3 抗体陽性患者数 (%) を示す

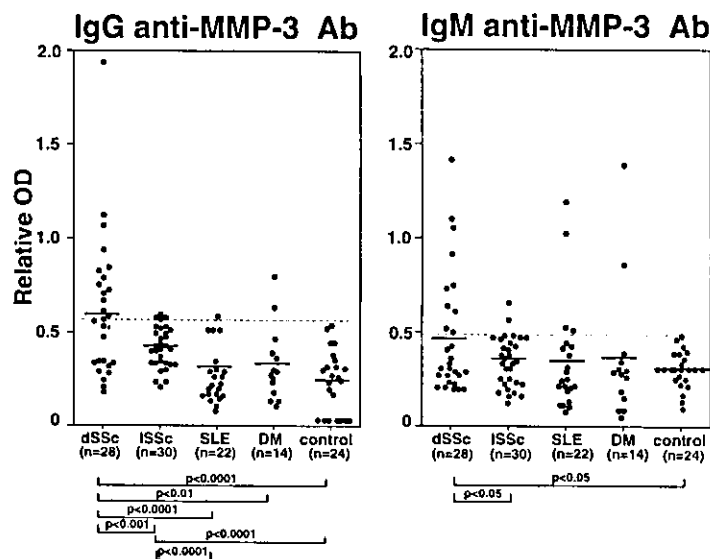


図 1: dSSc, ISSc, SLE, DM, および健常人 (Control) における血清中抗 MMP-3 抗体値。点線は健常人の平均値 + 2SD に設定したカットオフ値を表す。

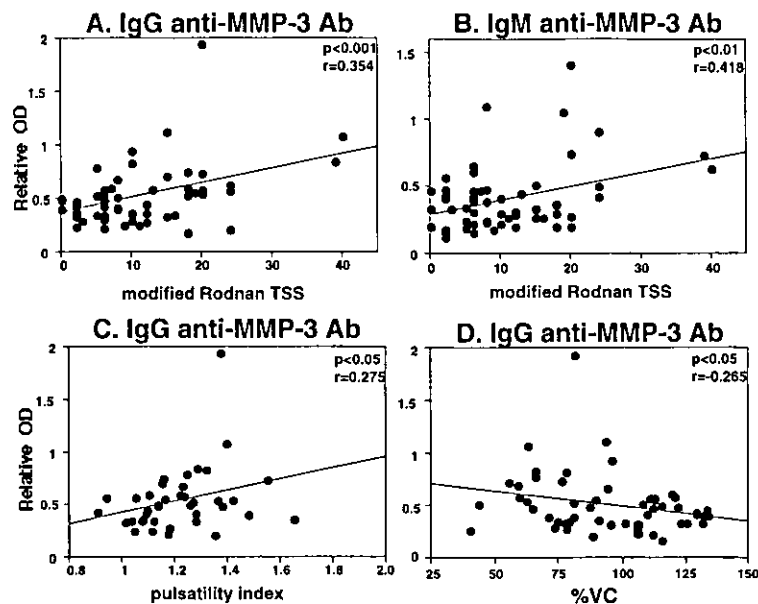


図 2: SSc における、IgG 型(A)および IgM 型(B)抗 MMP-3 抗体価と modified Rodnan total skin thickness score (modified Rodnan TSS) との関連。IgG 型抗 MMP-3 抗体価と Pulsatility index (C), %VC (D) との関連。

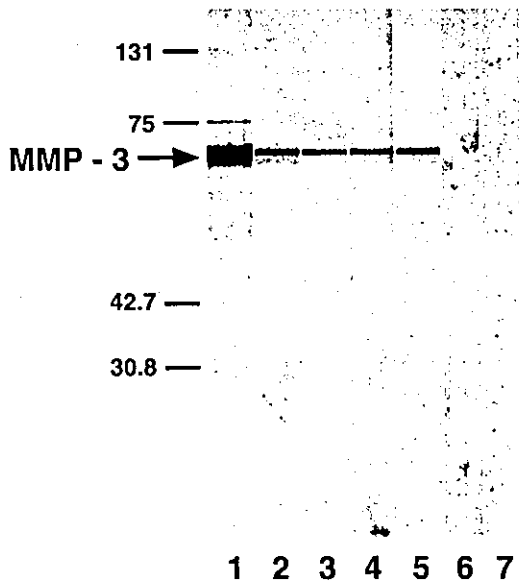


図 3 : ヒトリコンピナント MMP-3 を抗原とした免疫プロット法。金コロイドによる MMP-3 によるバンド (レーン1)、ELISA にて抗 MMP-3 抗体が陽性であった SSc 血清 (レーン2-5)、抗トポイソメラーゼ I 抗体あるいは抗セントロメア抗体が陽性であるが、ELISA にて抗 MMP-3 抗体が陰性の SSc 血清 (レーン6)、健康人血清 (レーン7)。

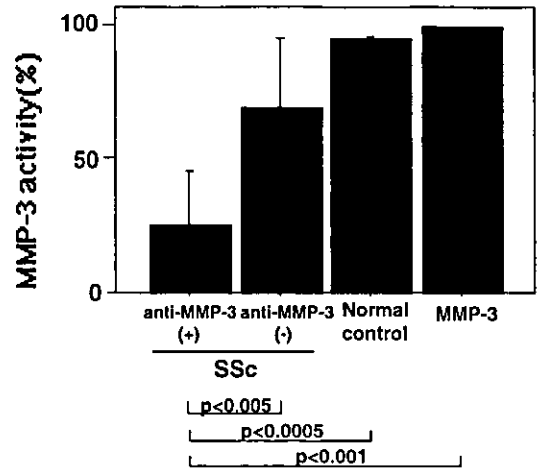


図 4 : SSc 患者血清中の抗 MMP-3 抗体による、MMP-3 活性阻害。

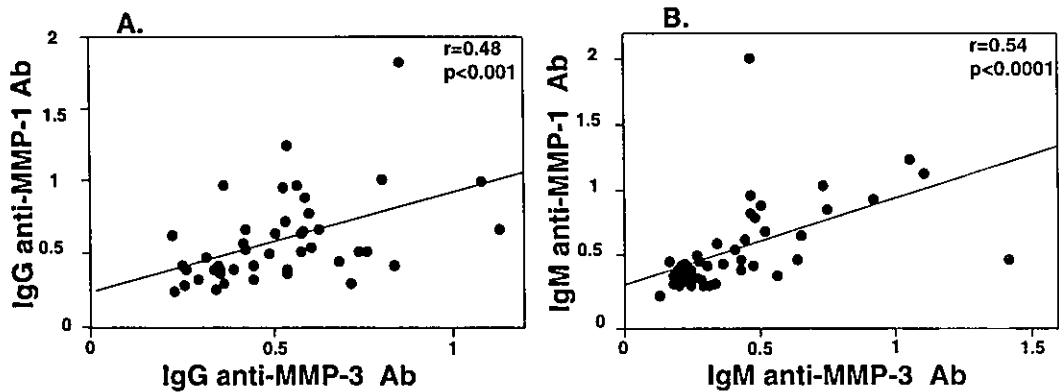


図 5 : 病変部皮膚における MMP-3 mRNA の発現。real-time RT-PCR にて MMP-3 mRNA 発現量を評価した。

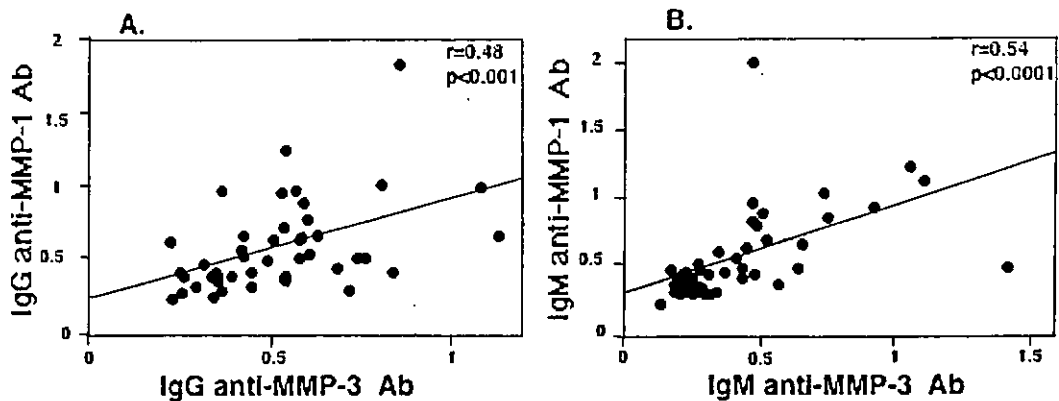


図 6 : IgG 型(A)および IgM 型(B)抗 MMP-1 抗体と抗 MMP-3 抗体の相関。抗体価はそれぞれヒトリコンピナント MMP-1, MMP-3 を用いた ELISA 法により測定した。

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

異なった疾患におけるフォスファチジルセリン依存性抗プロトロン
ビン抗体価の乖離と臨床的意義

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

現在我が国では、2社((株)MBL社,(株)コスミックコーポレーション社)の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)測定ELISAキットが開発・治験されているが、昨年のわれわれの検討では強皮症では2社のaPS/PT抗体価に乖離が認められた。そこでこれら2社の抗体価と臨床所見との関連につき、全身性ループスエリテマトーデス(SLE)、原発性抗リン脂質抗体症候群(PAPS)、強皮症(SSc)の各疾患群に分けて解析を行った。その結果、SLEおよびPAPS群では2社の測定値間には有意な相関性があり、両キットともループスアンチコアグラント(LA)陽性群、血栓症発症群で有意に高値を示した。一方、SSc群では両キット間で抗体価に相関は見られず、また、両キットともLAの有無、血栓症の有無と関連は見られなかった。抗プロトロンビン抗体にはサブクラスが存在することが報告されているが、今回の結果より2社のaPS/PT測定キットでは基礎疾患により異なったサブクラスを検出している可能性もあり、様々な疾患でaPS/PTを測定する際には注意が必要である。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome, APS)はループスアンチコアグラント(lupus anticoagulant, LA)または抗カルジオリピン抗体(anticardiolipin antibody, aCL)などの抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibody, aPL)の存在により、反復性血栓症・不育症などの臨床症状を来す自己免疫疾患の1つと考えられる。APSは全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)に高頻度で合併することが知られているが、これまでわれわれは全身性強皮症(systemic scleroderma, SSc)の66.7%で何らかのaPLが陽性となり、34%で血栓症などの臨

床症状も併発する、すなわちAPSを合併することを報告してきた。

近年、aPL、特にLAの主要抗体の1つとしてフォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(phosphatidylserine-dependent anti-prothrombin antibody, aPS/PT)の臨床的意義が注目されており、現在わが国でも2社よりaPS/PT測定キットが開発・治験されている。これまでのわれわれの検討では、SLE、原発性抗リン脂質抗体症候群(primary APS, PAPS)では2社の抗体測定値に有意の正相関が見られるものの、SSc症例においては両キット抗体価に相関が見られない。そこで、本抗体の臨床的意義を検討するた

め、SLE, PAPS, SSc症例につき、両測定キットを用いて aPS/PT 抗体価を測定し、LA の有無および血栓症の有無との関連について解析した。

B. 研究方法

1) 対照患者

金沢大学医学部附属病院通院中の全身性ループスエリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)症例 16 例(男性 1 例, 女性 15 例), 原発性抗リン脂質抗体症候群(primary APS; PAPS)症例 7 例(男性 2 例, 女性 5 例), 強皮症(systemic scleroderma; SSc)症例 77 例(男性 12 例, 女性 65 例)を対象とした。患者の臨床的特徴について表 1 に示す。

SLE 症例のうち LA 陽性例 5 例(男性 0 例, 女性 5 例), LA 陰性例 11 例(男性 1 例, 女性 10 例), PAPS 症例は全例 LA 陽性, SSc 症例は LA 陽性例 27 例(男性 5 例, 女性 22 例), LA 陰性例 50 例(男性 7 例, 女性 43 例)であった。また, SLE 症例のうち動脈血栓の既往を有する症例 3 例(男性 0 例, 女性 3 例), 静脈血栓症例 5 例(男性 0 例, 女性 5 例), PAPS 症例では動脈血栓症例 6 例(男性 2 例, 女性 4 例), 静脈血栓症例 7 例(男性 2 例, 女性 5 例), SSc 症例のうち動脈血栓症例 22 例(男性 3 例, 女性 19 例), 静脈血栓症例 15 例(男性 2 例, 女性 13 例)であった。

2) 方法

aPS/PT 測定には(株)MBL 社”aPS/PT-IgG”と(株)コスミックコーポレーション社の”抗ホスファチジルセリン抗体(aPS)”および”aPS/PT-IgG 測定キット”を用い、各疾患群における両社 aPS/PT 測定値の相関性、および各抗体価の LA, 動脈・静脈血栓症の有無との関連につき解析した。

LA はカオリン凝固時間法(Kaolin clotting time, KCT)および希釈ラッセル蛇毒時間法(diluted Russell's viper venom time, dRVVT)を測定し、国際血栓止血学会科学的標準化委員会の指針

に基づき診断した。

血栓症の有無は患者カルテの記載より、頭部 MRI による脳梗塞の有無、眼底検査による網膜中心動脈・静脈血栓症の有無、RI 下肢静脈・肺血流シンチグラフィによる下肢深部静脈血栓症・肺梗塞の有無を評価した。同時に、心電図・心臓超音波検査による心筋梗塞の有無、皮膚科受診により皮膚潰瘍を含む皮膚血栓症の有無について確認した。

3) 両社 aPS/PT キットの相違

MBL 社製 ELISA キット:あらかじめ ELISA プレートにヒトプロトロンビン(human prothrombin; hF II), ホスファチジルセリン(phosphatidylserine; PS), カルシウムイオンが固相化されている。本キットでは aPS/PT 抗体価が 12 U/mL 以上を示す場合、抗体陽性と判断する。

コスミック社製 ELISA キット:あらかじめ固相化されている抗原はホスファチジルセリンのみである。aPS/PT 測定に際しては、あとからヒトプロトロンビン、カルシウムイオンを添加しホスファチジルセリンと反応させ、この複合体と検体とを反応させる。この際、ヒトプロトロンビンの代わりに緩衝液を用いることによりホスファチジルセリンそのものに対する抗体(antiphosphatidylserine antibody; aPS)も測定可能である。aPS, aPS/PT は別々のウェルで測定し、aPS/PT 抗体価が 10 U/mL 以上で、かつ aPS/PT 抗体価が aPS 抗体価を上回った場合に aPS/PT 抗体陽性と判定する。

C. 研究結果

1) 抗体測定値間の相関:SLE

SLE 患者におけるコスミック社 aPS/PT 値とコスミック社 aPS 値の相関を図 1A, コスミック社 aPS/PT 値と MBL 社 aPS/PT 値の相関を図 1B に示す。コスミック社 aPS/PT 値とコスミック社 aPS 値の間には正相関($r = 0.614$, $n = 16$, $p < 0.02$), コスミック社 aPS/PT 値と MBL 社 aPS/PT 値の間

には強い正相関 ($r = 0.988, n = 16, p < 0.001$) が認められた。また、ほとんどの症例ではコスミック社 aPS 抗体価よりもコスミック社 aPS/PT 抗体価が高値を示した。

2) 抗体測定値間の相関:PAPS

PAPS 患者におけるコスミック社 aPS/PT 値とコスミック社 aPS 値の相関を図 1C, コスミック社 aPS/PT 値と MBL 社 aPS/PT 値の相関を図 1D に示す。SLE と同様、コスミック社 aPS/PT 値とコスミック社 aPS の間には正相関 ($r = 0.807, n = 7, p < 0.05$), コスミック社 aPS/PT 値と MBL 社 aPS/PT 値の間には強い正相関 ($r = 0.999, n = 7, p < 0.001$) が認められた。また、ほとんどの症例では SLE 同様、コスミック社 aPS よりもコスミック社 aPS/PT 値の方が高値を示した。以上の結果より、以下の検討では、SLE 患者、PAPS 患者につき、SLE/PAPS 群として同一の疾患群として評価した。

3) 測定値間の相関:SSc

SSc 患者におけるコスミック社 aPS/PT 値とコスミック社 aPS 値の相関を図 1E, コスミック社 aPS/PT 値と MBL 社 aPS/PT 値の相関を図 1F に示す。SLE 群、PAPS 群とは対照的に、コスミック社 aPS/PT 値とコスミック社 aPS 値の間に強い正相関 ($r = 0.987, n = 77, p < 0.001$) が認められた。一方、コスミック社 aPS/PT 値と MBL 社 aPS/PT 値の間には有意の正相関は認められなかった ($r = 0.070, n = 77, p < 0.544$)。また、コスミック社 aPS 値とコスミック社 aPS/PT 値は全例で同等の抗体価を示し、aPS/PT 値が aPS 値より高値を示した症例は認められなかった。

4) 各疾患群における両キットによる陽性・陰性の相違(表 2&3)

各キットの添付文書に従い aPS/PT の陽性、陰性を判定し、両キット間の一致率を検討した。そ

の結果、SLE、PAPS 群では両キットの陽性・陰性の一致率は 91.3%と高率に一致した。一方、SSc 群では MBL 社キットでは 13 検体が陽性と判定されたのに対し、コスミック社製キットで陽性と判定された検体は 1 例も認められなかった。

5) LA の有無による抗体価の相違

SLE、PAPS 群ではコスミック社 aPS, aPS/PT 値、MBL 社 aPS/PT 値は LA 陽性群で陰性群より有意に高値を示した ($p < 0.001, p = 0.01, \text{ and } p < 0.001, \text{ respectively}$)。一方、SSc 群ではいずれの抗体価についても LA 陽性、陰性の間に有意差は認められなかった(図 2A)

6) 動脈血栓症の有無による抗体価の相違

SLE、PAPS 群ではコスミック社 aPS, aPS/PT 値、MBL 社 aPS/PT 値は動脈血栓症発症群で非発症群より有意に高値を示した ($p < 0.001, p < 0.05, p < 0.001, \text{ respectively}$)。一方、SSc 群ではいずれの抗体価についても動脈血栓の有無との間に有意の相関は認められなかった(図 2B)。

7) 静脈血栓症の有無による抗体価の相違

SLE、PAPS 群ではコスミック社 aPS, aPS/PT 値、MBL 社 aPS/PT 値は動脈血栓症発症群で非発症群より有意に高値を示した ($p < 0.001, p < 0.01, p < 0.001, \text{ respectively}$)。一方、SSc 群ではいずれの抗体価についても動脈血栓の有無との間に有意の相関は認められなかった(図 2B)。

D. 考察

今回の結果より、aPS/PT 測定値は基礎疾患によりキット間で異なる抗体価を示し、陽性・陰性についても異なった判定がなされることがあることが示された。その理由としては両社キット間での hF II, PS, カルシウムなどの濃度の違い、用いられている ELISA プレートの特性の相違などが考えられるが、明らかではない。

コスミック社 aPS/PT キットに対し、MBL 社製 aPS/PT キットでは、あらかじめ hF II, PS, カルシ

ウムイオンのすべてが固相化されている。従って、本キットでは aPS と aPS/PT の両抗体を同時に検出している可能性がある。SLE 群や PAPS 群では両社の aPS/PT 抗体価の間には非常に強い正相関がみられた。また、aPS 抗体価は aPS/PT 抗体価より低値であった。すなわち、SLE、PAPS 群では aPS 抗体価が低いことから、両社の aPS/PT 抗体価がほぼ同程度であったと考えられる。

一方、SSc 群ではコスミック社 aPS 抗体価と同社 aPS/PT 抗体価の間に強い正相関が認められるとともに、MBL 社 aPS/PT 抗体価はコスミック社 aPS/PT 抗体価より高値を示していた。そこで、MBL 社 aPS/PT 値がコスミック社 aPS 抗体と aPS/PT 抗体の両者を測定している可能性を検討するため、MBL 社 aPS/PT 値とコスミック社 aPS 抗体価+同社 aPS/PT 抗体価について相関をみた(図1-G & H)。その結果、SLE/PAPS 群では有意な正相関が認められたが、SSc 群では相関は認められなかった($r=0.982$, $n=22$, $p<0.001$ and $r=0.0893$, $n=77$, $p=0.440$, respectively)。このことは、単に MBL 社 aPS/PT キットではコスミック社 aPS、aPS/PT の両者を測定しているわけではないことを示している。

これまでの我々の検討の結果、aPS/PT には、hF II に対してのみ特異的に結合する Type-I aPS/PT と、hF II のみならず、ウシプロトロンビン (bovine prothrombin; bF II) に対しても結合することかできる、Type-II aPS/PT に分類されることを報告している⁹⁾。また、SLE、PAPS 患者群はこの Type-I aPS/PT が主体を占めるが、SSc 患者群は Type-II aPS/PT を多く含むことも確認している⁹⁾。このことから、今回の結果より、両キットの測定系では基礎疾患により異なったサブタイプを検出している可能性が考えられた。

aPS/PT 測定抗体価と LA の有無との関連についても検討した。SLE/PAPS 患者群においては、

LA 陽性群では陰性群と比較して両社 aPS/PT および aPS 測定値とも有意に高値を示した。しかし SSc 患者群においては、LA 陽性群と陰性群の間には、いずれの抗体価についても有意差は認められなかった。これまでの報告より、LA の本体は①ホスファチジルセリンなどの陰性荷電リン脂質そのものに対する抗体(aPS)、②aPS/PT、③ β_2 -glycoprotein I 依存性抗カルジオリピン抗体(aCL/ β_2 -GPI)の3種類の抗体が主要抗体であると考えられている⁹⁾¹¹⁾。従って、LA 陽性症例では、陰性例と比較して aPS/PT 抗体価が高いことが予想された。実際、SLE/PAPS 群では LA 陽性症例で両キットとも aPS/PT 抗体価が有意に高値を示していた。aPS 抗体価も LA 陽性症例で有意に高値を示していたが、両社製 aPS/PT 抗体価と比較するとその抗体価は低値であった。LA のうち、血栓症など APS の臨床症状と関連する抗体は aPS ではなく、aPS/PT および aCL/ β_2 -GPI であること⁵⁾⁷⁾、抗リン脂質抗体陽性例のうち、臨床症状を伴いやすい基礎疾患は SLE や PAPS であることが知られている¹²⁾。今回の結果はこの知見に一致するものと考えられる。

一方、SSc 患者においては LA の有無と aPS/PT 抗体価の間に相関は見られず、「LA 陽性/aPS/PT 陰性」、または「LA 陰性/aPS/PT 陽性」と判定される検体が多数みられた。すなわち、これら2社の測定系では「aPS/PT 以外の LA 陽性例」、「LA 活性を持たない aPS/PT 抗体陽性例」も存在することを示唆している。これは、SSc において抗リン脂質抗体陽性率が 60%と高値であるもののその3分の2の症例では臨床症状を伴わない、いわゆる「抗リン脂質抗体陽性 SSc 症例」であることと関連しているのかもしれない。

過去の報告では、SLE、PAPS 以外の基礎疾患を有する症例では、aPS/PT 抗体はほとんど検出されない、とされている。しかし、今回の結果より、

SScでもMBL社キットを用いると高率にaPS/PT抗体が検出されることが判明した。一方で、コスミック社キットではaPS/PT抗体価は高いものの、その測定値がaPS抗体価とほぼ同等であることから、同キットの判定基準による「aPS/PT抗体陽性」例はほとんど存在しなかった。しかし、臨床的には血栓症・不育症などの症状を伴う、「抗リン脂質抗体症候群併発SSc症例」が多数存在することも事実であり、基礎疾患に関わらず、臨床的に特異性の高いaPS/PT測定系の開発が必要であろう。

E. 結論

抗リン脂質抗体症候群に疾患特異性の高いとされる、phosphatidylserine依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)を2社の測定キットを用いて検討した。SLEや原発性抗リン脂質抗体症候群では2社のキットとも有用であったものの強皮症では2社の測定結果に乖離が見られるのみならず、臨床的有用度は高いとはいえ、今後基礎疾患に関わらず、臨床的有用性の高い測定法の開発が望まれる。

F. 文献

- 1) Triplett DA : Antiphospholipid-protein antibodies : clinical use of laboratory test results (identification, predictive value, treatment). *Haemostasis* 26 Suppl 4 : 358-367, 1996.
- 2) Galli M, Finazzi G, Barbui T : Antiphospholipid antibodies : predictive value of laboratory tests. *Tromb Haemost.*, 78 : 75-78, 1997.
- 3) Koike T : Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis. *Ann Med* 32 Suppl 1 : 27-31, 2000.

- 4) Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GRV, Triplett DA, Khamashta MA : International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome : report of an international workshop. *Arthritis Rheum.*, 42 : 1309-1311, 1999.
- 5) 渥美達也 : 抗リン脂質抗体症候群, *日本血栓止血学会誌*, 12 : 500-508, 2001.
- 6) 鎌木潤一, 桑名正隆, 池田康夫 : 抗リン脂質抗体, *臨床病理*, 51 : 639-643, 2003.
- 7) Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini MB, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsukawa 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 : 1982-1993, 2000.
- 8) Yamazaki M, Triplett DA : Relationship between a subtype of antiprothrombin antibodies (anti-PT) and a clinical feature of antiphospholipid syndrome (APS). *J Autoimmunol.*, 15 : A20, 2000.
- 9) Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF : Lupus antiticoagulant IgG are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost.*, 66 : 629-632, 1991.
- 10) Amengual O, Atsumi T, Koike T : Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum.*, 48 : 886-895, 2003.
- 11) Matsuda J, Saitoh N, Gotoh M, Kawasugi K,

- Gohchi K, Tsukamoto M : Phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody is exclusive to patients with lupus anticoagulant. *Br J Rheumatol.*, 35 : 589-591, 1996.
- 12) Kaburaki J, Kuwana M, Yamamoto M, Kawai S, Matsuura E, Ikeda Y : Disease distribution of beta 2-glycoproteinI-dependent anticardiolipin antibodies in rheumatic disease. *Lupus 4 Suppl 1* : S27-31, 1995.
- 13) Picillo U, Miglaresi S, Marcialis MR, Ferruzzi AM, Tirri G : Clinical significance of anticardiolipin antibodies in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity*, 20 : 1-7, 1995.
- 14) Atsumi T, Amengual O, Yasuda S, Koike T : Antiprothrombin antibodies - are they worth assaying? *Thrombosis Research.*, 114 : 533-538, 2004.
- 15) Hasegawa M, Sato S, Yanaba K, Komura K, Yamazaki M, Takehara K : Autoantibodies against phosphatidylserine-prothrombin complex in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.*, 63 : 1514-1517, 2004.
- Omote M, Yoshida T, Kaneda M, Yamazaki M, Morishita E, Takami A, Miyamoto SI, Nakao S. Antithrombotic role of nitric oxide in rats under physiological conditions. *Thromb Haemost 91(1)*: 71-5, 2004.
- Hasegawa M, Sato S, Yanaba K, Komura K, Hayakawa I, Hamaguchi Y, Yamazaki M, Takehara K. Autoantibodies against phosphatidylserine-prothrombin complex in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis 63*: 1514-1517, 2004
- Asakura H, Sano Y, Yoshida T, Omote M, Ontachi Y, Mizutani T, Kaneda M, Yamazaki M, Morishita E, Takami A, Miyamoto KI, Nakao S. Beneficial effect of low-molecular-weight heparin against LPS-induced DIC in rats is abolished by co-administration of tranexamic acid. *Intensive Care Med 30*: 1950-1955, 2004.
- Asakura H, Sano Y, Yamazaki M, Morishita E, Miyamoto KI, Nakao S. Role of fibrinolysis in tissue-factor-induced DIC in rats: an effect of tranexamic acid on this model. *Haematologica 89(6)*: 757-758, 2004
- Asakura H, Sano Y, Omote M, Yoshida T, Ontachi Y, Mizutani T, Kaneda M, Yamazaki M, Morishita E, Takami A, Miyamoto KI, Nakao S. Significance of decreased plasma D-dimer levels following lipopolysaccharide-induced DIC in rats. *Int J Hematol 79(4)*: 394-399, 2004.
- Suga Y, Asakura H, Yoshida T, Omote M, Ontachi Y, Mizutani T, Yamazaki M, Morishita E, Nakao S, Miyamoto Ken-ichi. Relationship between endothelin and the pathophysiology of tissue factor-induced and lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation in rats: a study

G. 研究発表

1. 論文発表

河嶋洋平, 山崎雅英, 森下英理子, 朝倉英策, 長谷川稔, 大竹茂樹. 異なる疾患群における IgG 型抗プロトロンビン抗体測定キット 2 社間の測定値の乖離. *日本血栓血栓止血学会雑誌* (印刷中)

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. 永井書店. 241-250, 2004 年 2 月.

Asakura H, Okudaira M, Ontachi Y, Mizutani T,

examining the effect of an endothelin receptor antagonist. *Blood Coagulat Fibrinol.* 15: 593-598, 2004.

山崎雅英, 長谷川稔, 佐藤伸一, 竹原和彦. 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. 厚生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 15 年度総括・分担研究報告書. 63-69, 2004.

山崎雅英. 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. 厚生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 15 年度総括・分担研究報告書. 72-76, 2004.

山崎雅英. 抗リン脂質抗体症候群. インフォームドコンセントのための図説シリーズ 膠原病 3. その他の膠原病, 医薬ジャーナル社. 74-81, 2004.

2. 学会発表

Yamazaki M. Antiphospholipid syndrome. 3rd Congress of Asian-Pacific Thrombosis and Haemostasis. Oct. 2004, Bangkok, Thailand (Invited Speaker, Symposist).

Yamazaki M, Kawashima Y, Asakura H, Nakao S. Rituximab reduces antiphospholipid antibody titers and improves hypercoagulable state without recurrent thromboses: 2-year follow up. 11th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Nov. 2004, Sydney, Australia.

Yamazaki M, Kawashima Y, Asakura H, Nakao S. Roles of adhesion molecules in the development of thrombosis and pregnant morbidity in antiphospholipid syndrome (APS): Studies using APS-model mice deficient of adhesion molecules. 11th International Congress on Antiphospholipid

Antibodies. Nov. 2004, Sydney, Australia.

Kawashima Y, Yamazaki M, Asakura H, Morishita E, Otake S. Clinical significance of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody (aPS/PT) bound only human prothrombin in APS patients with several kinds of collagen disease. 11th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Nov. 2004, Sydney, Australia.

山崎雅英, 河嶋洋平, 荒幡昌久, 門平靖子, 前川実生, 御館靖雄, 林朋恵, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二. 抗リン脂質抗体の誘導・発症における接着分子の意義: 接着分子ノックアウト (KO)マウスを用いた検討. 第 64 回日本血液学会総会・第 44 回日本臨床血液学会総会, 京都. 2004 年 9 月 (ワークショップ)

山崎雅英, 門平靖子, 前川実生, 荒幡昌久, 御館靖雄, 林朋恵, 河嶋洋平, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二. 抗リン脂質抗体陽性不育症に対する少量アスピリン, ヘパリン皮下注射併用療法の有用性. 第 27 回日本血栓止血学会学術集会, 奈良. 2004 年 11 月

河嶋洋平, 山崎雅英, 森下英理子, 朝倉英策, 大竹茂樹. 強皮症および SLE に対する異なる aPS/PT ELISA キットを用いた抗体価測定の臨床的意義. 第 27 回日本血栓止血学会学術集会, 奈良. 2004 年 11 月

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし