

P=0.003)。一方、腎を含む個々の臓器病変の頻度に有意な差はなかった。

4) 抗 RNAPIII 抗体価の推移と臨床症状

図 1 に経時的に抗 RNAPIII 抗体価を検討し得た 6 例の経過を示す。Case#6 を除く全例で、抗 RNAPIII 抗体価とスキンスコアが相関した。Case#6 ではスキンスコアが改善するにもかかわらず抗 RNAPIII 抗体価が高値であったが、経過中に進行性の肺線維症を認めた。Case#4 と Case#5 は経過中に強皮症腎を発症したが、いずれも抗 RNAPIII 抗体価が急速に上昇する時期であった。

D. 考案

抗 RNAP III 抗体 ELISA の有用性を様々な民族背景を有する強皮症患者多数例を用いて検討した。その結果、抗 RNAPI/III 抗体検出法の gold standard の免疫沈降法と比較し、特異度 99%、感度 91%、陽性適中度 96%、陰性適中度 97%と良好な結果を示した。また、対照疾患における偽陽性の頻度も 1%程度であり、ELISA は抗 RNAPIII 抗体を正確に評価できるアッセイであることが確認された。したがって、我々が開発した抗 RNAPIII 抗体 ELISA は煩雑な免疫沈降法に代わる簡便な検出法としてきわめて有用と考えられた。

ELISA を用いる長所のひとつに定量的な結果が得られることがある。今回の検討で、抗 RNAPIII 抗体価高値例は皮膚、腱病変が重症な症例が多いことが明らかとなった。ただし、抗 RNAPI/III 抗体の特徴である強皮症腎の頻度は関連なかった。一方、経時的な抗体価の推移を調べると、症例数は少ないものの抗体価の上昇は皮膚硬化の進行や強皮症腎の発症と関連する可能性が示された。今後、多数例を用いた前向

き試験により確認する必要がある。

E. 結論

抗 RNAPIII 抗体 ELISA は免疫沈降法に代わる正確なアッセイ法であることが確認された。また、ELISA による抗 RNAPIII 抗体価は重症度や疾患活動性の評価に有用な可能性が示された。

F. 文献

1. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M: Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;37:75-83.
2. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M: Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1993;91: 1399-1404.
3. Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Tojo T, Medsger TA Jr: Racial differences in the distribution of systemic sclerosis-related serum antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1994;37: 902-906.
4. Kuwana M, Kimura K, Kawakami Y: Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera: application to enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum* 2002;46:2742-2747.
5. Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA Jr, Altman RD, D'Angelo WA, Fries JF, et al: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*

1980;23:581-590.

桑名正隆：強皮症における世界の最新治療。第
55 回日本皮膚科学会中部支部学術大会(金沢).
2004. 9.

G. 研究発表

1. 論文発表

桑名正隆: 抗 RNA ポリメラーゼ抗体と強皮症.
炎症と免疫 2004; 12: 48-55.

2. 学会発表

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表 1. 強皮症における抗 RNAPIII 抗体 ELISA の感度、特異性、陽性適中度、陰性適中度

施設、国	解析血清数	感度 (%)	特異度 (%)	陽性適中度 (%)	陰性適中度 (%)
慶應義塾大学、日本	265	100	99	85	100
サウスカロライナ大学、アメリカ	196	93	99	97	99
ピッツバーグ大学、アメリカ	73*	88	—	—	—
合計	534	91	99	96	97

*全て抗 RNAPIII 抗体陽性例。

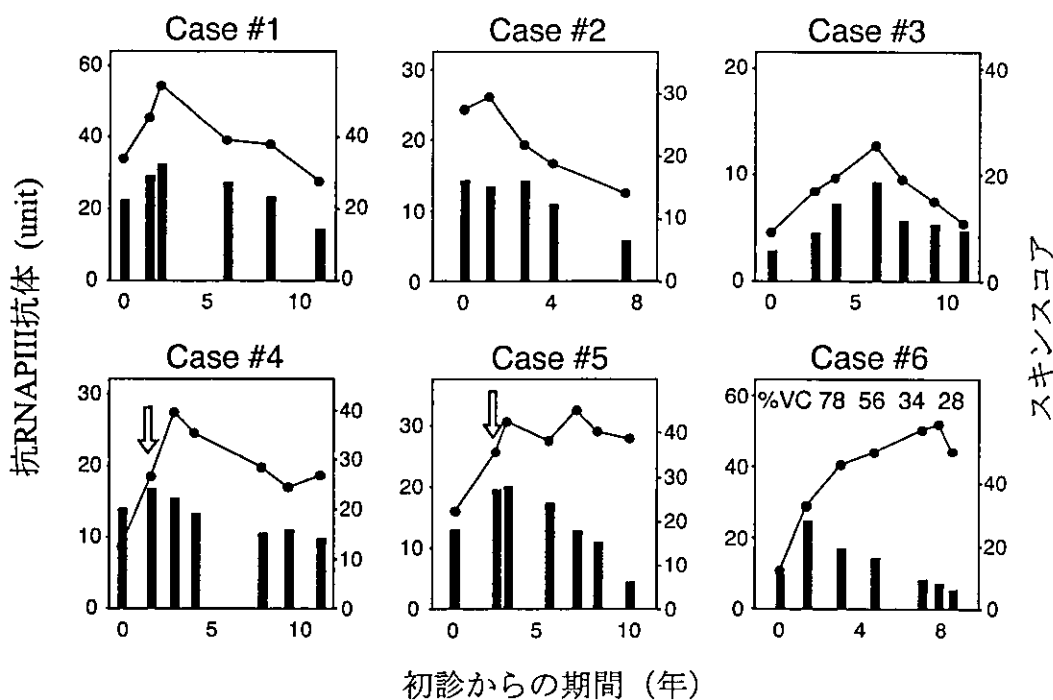


図 1 : 強皮症 6 例における ELISA による抗 RNAPIII 抗体価の経時的変化。折れ線は抗 RNAPIII 抗体価 (左)、バーはスキンスコア (右)、Case#4 と Case#5 における矢印は強皮症腎の発症を示す。

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 U1 RNP 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 5 U/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、下肢ベノグラフィー、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、指尖部陥凹性瘰癧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ビ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.

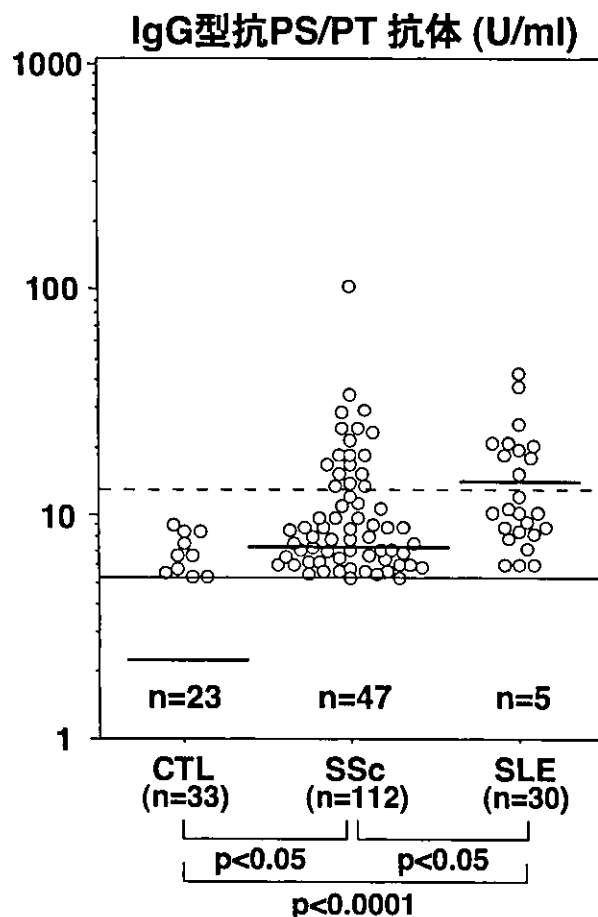


図1 SSc患者、SLE患者、健常人(CTL)血清中の抗PS/PT抗体

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 (+) ^a (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U1RNP抗体	6	7
ESR亢進	33	24
CRP上昇	22	12

^a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

全身性強皮症における肺線維症の臨床評価における
血清 SP-D, KL-6 値の比較的研究

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 築場広一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学特別研究生
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

全身性強皮症 42 例を対象として、血清 SP-D 値と KL-6 値を ELISA 法で測定し、比較検討した。初診時における血清 SP-D 値、KL-6 値は共に全身性強皮症において高値であり、特に肺線維症を合併した群においてより高値を示した。SP-D 値は KL-6 値に比して %DLco、%VC とより強い相関を示した。更に SP-D 値は KL-6 値より感度が高い反面、特異度では劣る傾向が見られた。経時的には、SP-D 値は KL-6 値より鋭敏に肺線維症の活動を反映する傾向が見られた。以上より、全身性強皮症において SP-D と KL-6 を併せて経時的に測定することにより、肺線維症をより正確に評価できると考えられた。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis: SSc) には、約半数以上において肺線維症 (pulmonary fibrosis: PF) を合併し、また死因として最も高率であるため、その評価は臨床的に極めて重要である。PF を評価する方法としては気管支肺胞洗浄、高解像度 CT (high resolution computed tomography: HRCT) 等が用いられているが、簡便性、侵襲において問題がある。よって簡便で非侵襲的かつ鋭敏な血清学的指標が確立されれば、SSc における PF の活動性を把握していく上で大きな助けになると考えられる。

SP-D は主に II 型肺胞上皮細胞、クララ細胞より分泌される肺サーファクタント特異的アポ蛋白である¹。SP-D は特発性間質性肺炎、肺胞蛋白症、膠原病に伴う間質性肺炎等の間質性肺疾患の患者血清中で増加していることが知られている^{2,3}。更に SSc においては血清 SP-D 値の上昇が PF の存在と相関していると報告されている⁴。

KL-6 は Kohno らによって同定された糖蛋白抗原であり、主に II 型肺胞上皮細胞、呼吸細気管支上皮細胞に発現している⁵。KL-6 はまた特発性間質性肺炎、過敏性肺臓炎、放射線肺臓炎、膠原病に伴う間質性肺炎

等の間質性肺疾患の患者血清中で増加していることが見いだされており、これらの疾患の診断上有用な血清学的指標と考えられている⁶⁻⁸。最近の研究では、血清 KL-6 値は PF を伴う SSc 患者で、PF を伴わない SSc 患者に比べて有意に上昇していることが示されている⁹。更に急速な KL-6 値の上昇が PF の発症、増悪と相関していることが報告されている¹⁰。

このように血清 SP-D、KL-6 値は間質性肺疾患において上昇することが多々報告されているものの SP-D と KL-6 を同時に測定し検討した報告は少ない。今回の研究では SSc 患者において血清 SP-D、KL-6 値が PF とそれぞれどのように相関しており、両者にどのような違いがあるかを検討した。

B. 研究方法

1. 対象患者

対象患者は SSc 42 例（女性 36 例、男性 6 例）であり、年齢は 49 ± 18 歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc) が 14 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 28 例であった。自己抗体別では抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 27 例、抗セントロメア抗体陽性例が 11 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 3 例、自己抗体陰性例 1 例であった。コントロールとして健常人 30 例、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) 患者 20 例について検討した。経時的検討では、SSc 6 例からの 83 検体を用いてレトロスペクティブに行った。観察期間は 2.9 ± 1.5 年であった。

2 ELISA

血清 SP-D 値は市販されている ELISA キットを用いて測定した (SP-D kit, Yamasa, Chiba, Japan)。カットオフ値は 110ng/ml である。血清 KL-6 値は市販されている ELISA キットを用いて検出した (Eitest KL-6, Eisai, Tokyo, Japan)。カットオフ値は 500U/ml である。

C. 研究結果

1. 初診時における血清 SP-D、KL-6 値

我々はまず初診時における血清 SP-D、KL-6 値について検討した (図 1)。SSc における血清 SP-D 値は、健常人、SLE と比較して有意に高値であった。PF を伴う SSc では、PF を伴わない SSc に比べて有意に高値を示した。PF を伴わない SSc、SLE と健常人との間には有意差は見られなかった。さらに SP-D 値は %VC、%DLco と有意に逆相関していた (図 2)。血清 SP-D 値での SSc 患者における PF 診断の感度は 91% (21/23) であり、特異度は 88% (21/24) であった。

SSc における血清 KL-6 値は、健常人、SLE と比較して有意に高値であった。PF を伴う SSc では、PF を伴わない SSc に比べて有意に高値を示した。PF を伴わない SSc、SLE と健常人との間には有意差は見られなかった。さらに、KL-6 値は %VC、%DLco と有意に逆相関していた (図 2)。また、血清 KL-6 値は SP-D 値と正の相関が見られた。血清 KL-6 値での SSc 患者における PF の診断の感度は 39% (9/23) であり、特異度は 100% (9/9) であった。このように、血清 SP-D、

KL-6 値の上昇は SSc における PF の存在を示唆しており、さらに重症度とも相関していることが分かった。加えて、SP-D は KL-6 に比べてより感度が高い反面、KL-6 は SP-D より特異度が高いことが分かった。これらの結果から、血清 SP-D、KL-6 を同時に測定することにより SSc における PF をより正確に評価できるものと考えられた。

2. SSc における血清 SP-D 値と KL-6 値の臨床的および血清学的相関

血清 SP-D、KL-6 値と SSc の臨床症状、血清学的変化との相関を調べるために、SSc 42 例を以下の 3 群に分けた (表)。最初の群は SP-D、KL-6 が共に正常値であった群であり、18 例がこれに含まれた (A)。次は SP-D は高値を示したものの KL-6 は正常値であった群であり、15 例がこれに含まれた (B)。最後が SP-D、KL-6 共に上昇していた群であり、9 例がこれに含まれた (C)。SP-D は正常値を示しながら KL-6 が上昇していた例はこの研究の対象からは見られなかった。PF は A 群に比べ B、C 群で有意に高率に合併していた。同様に %VC、%DLco の低下は A 群に比べ B、C 群で有意に高率に観察された。さらに、B、C 群では A 群より抗トポイソメラーゼ抗体陽性例が有意に多く存在していた。B、C 群間には有意な相違は見られなかったものの、PF や肺機能障害の合併において C 群が B 群より高率となる傾向がみられた。

3. 血清 SP-D、KL-6 値の経時的検討

血清 SP-D、KL-6 値が PF の発症や増悪と相関しているかどうかを検討するために、6 例の SSc 患者から採取した血清 83 検体を

用いてレトロスペクティブに経時的検討を行った (図 4)。

症例 1 は初診時、SP-D 256ng/ml と上昇していたが KL-6 は 55U/ml と正常値を示しており、胸部 CT にて PF は認められず呼吸機能も正常であった。皮膚硬化に対しプレドニゾン 20mg/日による治療を開始したが 6 か月後に KL-6 値が 956U/ml と急激に上昇すると共に、胸部 CT 上で両下肺野にスリガラス状陰影、網状陰影が出現した。その間 SP-D は初診時から大きな変化を見せず 250-300ng/ml で推移していた。呼吸機能は %VC 56、%DLco 39 と著明に低下していた。その後 PF の進行は止まったが、SP-D、KL-6 共に高値を維持していた。初診から 5 年後になって SP-D は徐々に低下し始め、KL-6 も SP-D にやや遅れながら低下し始めた。

症例 2 は初診時には軽度の KL-6 高値 (554U/ml) と SP-D の著明な上昇を示していた (210ng/ml)。胸部 CT 上では軽度の PF を認めた。当初皮膚硬化に対してプレドニゾン 15mg/日による治療を行っていたが、4 か月後に KL-6 値が 1,463U/ml と急激に上昇すると共に、胸部 CT で両中下肺野にかけてスリガラス状陰影と共に網状陰影が出現したため PF の亜急性増悪と考えた。SP-D は 205ng/ml とほぼ初診時のままの値であった。ステロイドパルス療法を行ったところ SP-D はやや低下し、KL-6 もやや安定したかに見えたが PF の進行は止まらず、初診から 32 か月後に死亡した。

症例 3 は、初診時には SP-D が 139ng/ml

とやや高値を示していたものの KL-6 は 368U/ml と正常値であり、胸部 CT にも異常陰影は見られなかった。皮膚硬化に対し、プレドニゾン 20mg/日による治療を開始したが、初診から 2 か月後に突如 KL-6 が 886U/ml に、SP-D も 198ng/ml と上昇し、胸部 CT では両下肺野にスリガラス状陰影が出現した。初診から 8 か月後には SP-D 236ng/ml、KL-6 1,311U/ml と更に上昇し、胸部 CT 上スリガラス陰影はさらに増悪したため、シクロフォスファミドパルス療法を 6 クール施行したところパルス療法中は SP-D、KL-6 共に横ばいとなり呼吸機能の悪化も止まった。しかしながら、パルス療法が終了すると共に再び両値の上昇が見られた。

症例 4 は初診時すでに SP-D 233ng/ml、KL-6 908U/ml と高値を示していた。胸部 CT では両下肺野に網状陰影が存在し呼吸機能の低下も見られた。PF の増悪を防ぐためにプレドニゾンを 30mg/日 に増加すると共に、計 6 クールのシクロフォスファミドパルス療法を施行した。パルス療法の間、呼吸機能は安定し、胸部 CT 上も PF の進行は見られなかった。KL-6 はほぼ初診時と同じ値で推移していたが、SP-D は初診時より低値を示していた。

症例 5 は初診時 SP-D 231ng/ml、KL-6 930U/ml と上昇していた。胸部 CT では両下肺野にスリガラス様陰影、網状陰影が見られ、%DLco も軽度低下していた。初診 1 ヶ月後より PF に対してシクロフォスファミドパルス療法を開始したところ 2 ヶ月後には SP-D が低下し始め、SP-D より 3 ヶ月ほど

遅れて KL-6 も低下した。合計 6 クールのパルス療法を施行したところ、CT 上間質影の改善が見られた。

症例 6 では、初診時 SP-D 186ng/ml、KL-6 1009U/ml と著明な高値を示していた。胸部 CT では両下肺野スリガラス陰影、網状陰影を認め、呼吸機能も低下していた。その後空咳、呼吸困難が増悪したため、PF の増悪を考えシクロフォスファミドパルス療法を開始した。計 3 クール行うも CT 上の間質影の増加、呼吸器症状の増悪がさらに進行を見せると同時に SP-D、KL-6 の上昇も続いた。この症例に対してシクロフォスファミドパルス療法は無効と考えステロイドパルス療法を行うと共にシクロスポリンの投与を開始したところ SP-D、KL-6 共に減少すると共に呼吸器症状の改善、CT 上のスリガラス陰影の改善が見られた。以上より、血清 SP-D、KL-6 値は SSc における PF を反映すると共に、SP-D は KL-6 に比してやや早く変化を見せると考えられた。

D. 考案

今回の研究では、血清 SP-D、KL-6 値が SSc、特に PF を伴う SSc において高値を示していた。SP-D、KL-6 値は PF の合併を反映し、呼吸機能低下と関連していた。さらに SP-D 値は KL-6 値と強い正の相関を示した。SP-D は KL-6 より鋭敏に PF を反映する反面、KL-6 は SP-D より高い特異度を示した。これらの結果から、SP-D、KL-6 は共に SSc に伴う PF の合併と重症度を反映すると考えられた。さらに SP-D は感度の高い

PF の血清学的指標になりうるが、偽陽性に注意する必要がある、一方 KL-6 は PF の特異的な指標であるが、偽陰性に注意する必要があると考えられた。以上より、血清 SP-D、KL-6 値を同時に測定することで、どちらか一方を測定するよりより正確に PF を評価できると考えられた。

SP-D は 43kDa の肺サーファクタント特異的アポ蛋白である¹。血清 SP-D 値の上昇は肺胞上皮の破壊と血中への流入によって引き起こされるため、肺胞上皮の障害の程度を反映しているものと考えられる。一方 KL-6 は 200kDa と、SP-D に比べると大きいムチン様糖脂質である³。KL-6 は間質性肺疾患における再生、増殖した II 型肺胞上皮細胞において、正常の II 型肺胞上皮細胞よりも強く発現していたと報告されている^{5,6}。更に気管支肺胞洗浄液中の KL-6 値は間質性肺疾患において上昇しており、気管支肺胞洗浄液中の KL-6 値は血清 KL-6 値と有意に相関していた^{6,7}。これらの結果から、間質性肺疾患では増殖した再生 II 型肺胞上皮細胞が大量の KL-6 を産生し、それが血液中に流入することによって血清 KL-6 値の上昇を引き起こしていると考えられる。以上より、血清 SP-D 値の上昇は肺胞上皮の破壊を反映し、一方血清 KL-6 値の上昇は肺胞の再生と増殖を反映していると推測される。さらに SP-D は KL-6 より小型なため KL-6 より容易に漏出するものと考えられる。今研究で経時的検討を行った 2 例（症例 1、3）は初診時すでに PF を伴っており、SP-D は高値を示していた。当初 KL-6 は正常値であったが、数ヶ

月後になり KL-6 は上昇し始めた。症例 2 では KL-6 は SP-D より数ヶ月遅れて上昇する傾向が見られた。さらに症例 1、5、6 では KL-6 は SP-D より数ヶ月遅れて減少した。これらの結果から、SP-D は KL-6 より鋭敏に PF の活動性を反映すると考えられた。

E. 結論

血清 SP-D、KL-6 値は SSc において PF の重症度と共に活動性を反映しており、両者を同時に測定し経過観察していくことにより PF をより正確に評価できると考えられた。血清 SP-D、KL-6 値の測定は非常に簡便であり非侵襲的であることから、発症早期の SSc において定期的に測定し PF の評価を行っていくことが重要であると考えられた。

F. 文献

1. Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 646-78.
2. Nagae H, Takahashi H, Kuroki Y, Honda Y, Nagata A, Ogasawara Y, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using F(ab')₂ fragment for the detection of human pulmonary surfactant protein D in sera. *Clin Chim Acta* 1997; 266: 157-71.
3. Ihn H, Asano Y, Kubo M, Yamane K, Jinnin M, Yazawa N, et al. Clinical significance of serum surfactant protein

- D (SP-D) in patients with polymyositis/dermatomyositis: correlation with interstitial lung disease. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 1268-72.
4. Takahashi H, Kuroki Y, Tanaka H, Saito T, Kurokawa K, Chiba H, et al. Serum levels of surfactant protein A and D are useful biomarkers for interstitial lung disease in patients with progressive systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 258-63.
 5. Kohno N, Akiyama M, Kyoizumi S, Hakoda M, Kobuke K, Yamakido M: Detection of soluble tumor-associated antigens in sera and effusions using novel monoclonal antibodies, KL-3 and KL-6, against lung adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 1988; 18: 203-16.
 6. Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. New serum indicator of interstitial pneumonia activity: sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest* 1989; 96:68-73.
 7. Kobayashi J, Kitamura S. KL-6: a serum marker for interstitial pneumonia. *Chest* 1995; 108: 311-5.
 8. Hamada H, Kohno N, Akiyama M, Hiwada K. Monitoring of serum KL-6 antigen in a patients with radiation pneumonia. *Chest* 1992; 101: 858-860.
 9. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Nishijima C, Takehara K. Elevated serum KL-6 levels in patients with systemic sclerosis: association with the severity of pulmonary fibrosis. *Dermatology* 2000; 200: 196-201.
 10. Yanaba K, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum KL-6 levels in patients with systemic sclerosis: association with the activity of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21: 429-36.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
Yanaba K, Hasegawa M, Takehara K, Sato S: Comparative study of serum surfactant protein-D and KL-6 levels in patients with systemic sclerosis as markers for monitoring the activity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol*, in press.
 2. 学会発表
第 67 回日本皮膚科学会東京支部学術大会
「全身性強皮症における肺線維症の臨床評価における血清 SP-D, KL-6 値の比較的研究」
平成 15 年 2 月 15 日
- H. 知的所有権の出願、登録状況**
なし

表 . Correlation of serum SP-D and KL-6 levels with clinical and serologic features in patients with SSc*

	Patients with normal SP-D and normal KL-6 (n = 18)	Patients with elevated SP-D and normal KL-6 (n = 15)	Patients with elevated SP-D and elevated KL-6 (n = 9)
Sex (male: female)	2:16	4:11	0:9
Age (mean years)	44	52	53
Disease duration (mean years)	4.4	4.1	3.7
Organ involvement (%)			
Pulmonary fibrosis	11	80‡	100‡
Decreased %VC	6	53†	67‡
Decreased %DLco	28	87†	100‡
Esophagus	67	60	78
Heart	0	37	11
Kidney	0	7	11
Joint	28	33	0
Muscle	22	27	11
Laboratory findings (%)			
Elevated ESR	17	27	44
Elevated CRP	11	13	22
ANA specificity (%)			
Anti-topo I	33	87†	89†
ACA	56	7†	0†

*Patients were grouped into the following 3 groups: SSc patients with normal KL-6 and SP-D levels, those with normal KL-6 and elevated SP-D levels, and those with elevated KL-6 and SP-D levels.

Unless noted otherwise, values are percentages.

ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein; ANA, antinuclear Abs; Anti-topo I, anti-topoisomerase I Ab; ACA, anticentromere Ab.

† p < 0.01 versus patients with normal SP-D and normal KL-6 levels.

‡ p < 0.001 versus patients with normal SP-D and normal KL-6 levels.

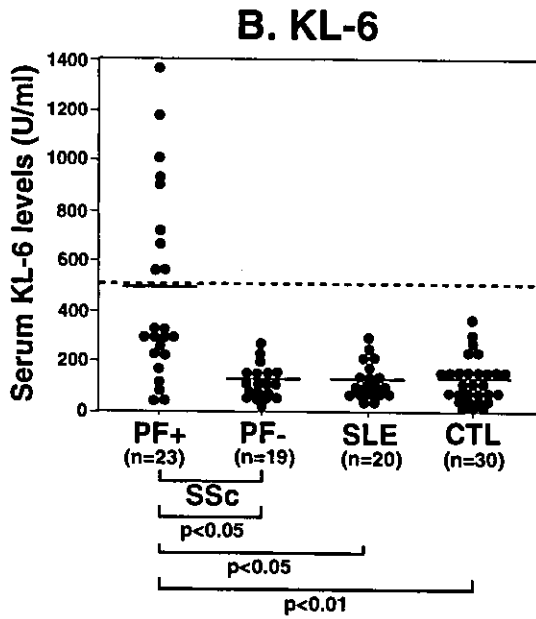
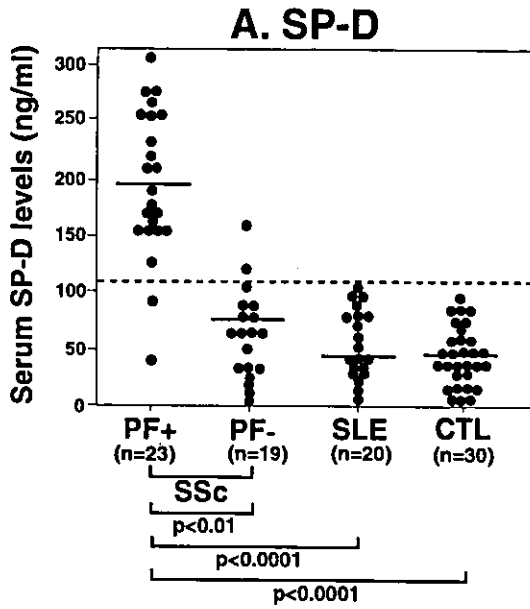


図1. 肺線維症合併 SSc (PF+)、肺線維症非合併 SSc (PF-)、全身性エリテマトーデス (SLE)、健常人 (CTL) における血清 SP-D 値 (A) および KL-6 値 (B)。破線はカットオフ値 (SP-D: 110ng/ml、KL-6: 500U/ml) を示す。

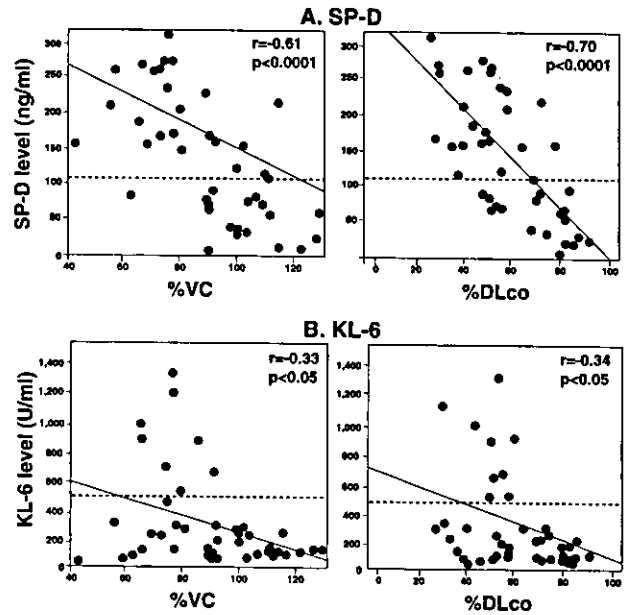


図2. 血清 SP-D 値 (A) および KL-6 値 (B) と %VC、%DLco との相関。破線はカットオフ値を示す。

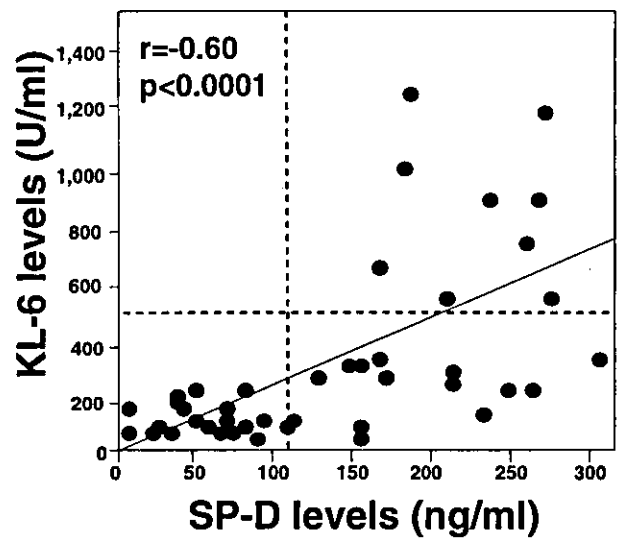


図3. 42 例の SSc における血清 SP-D 値と KL-6 値の相関。破線はカットオフ値を示す。

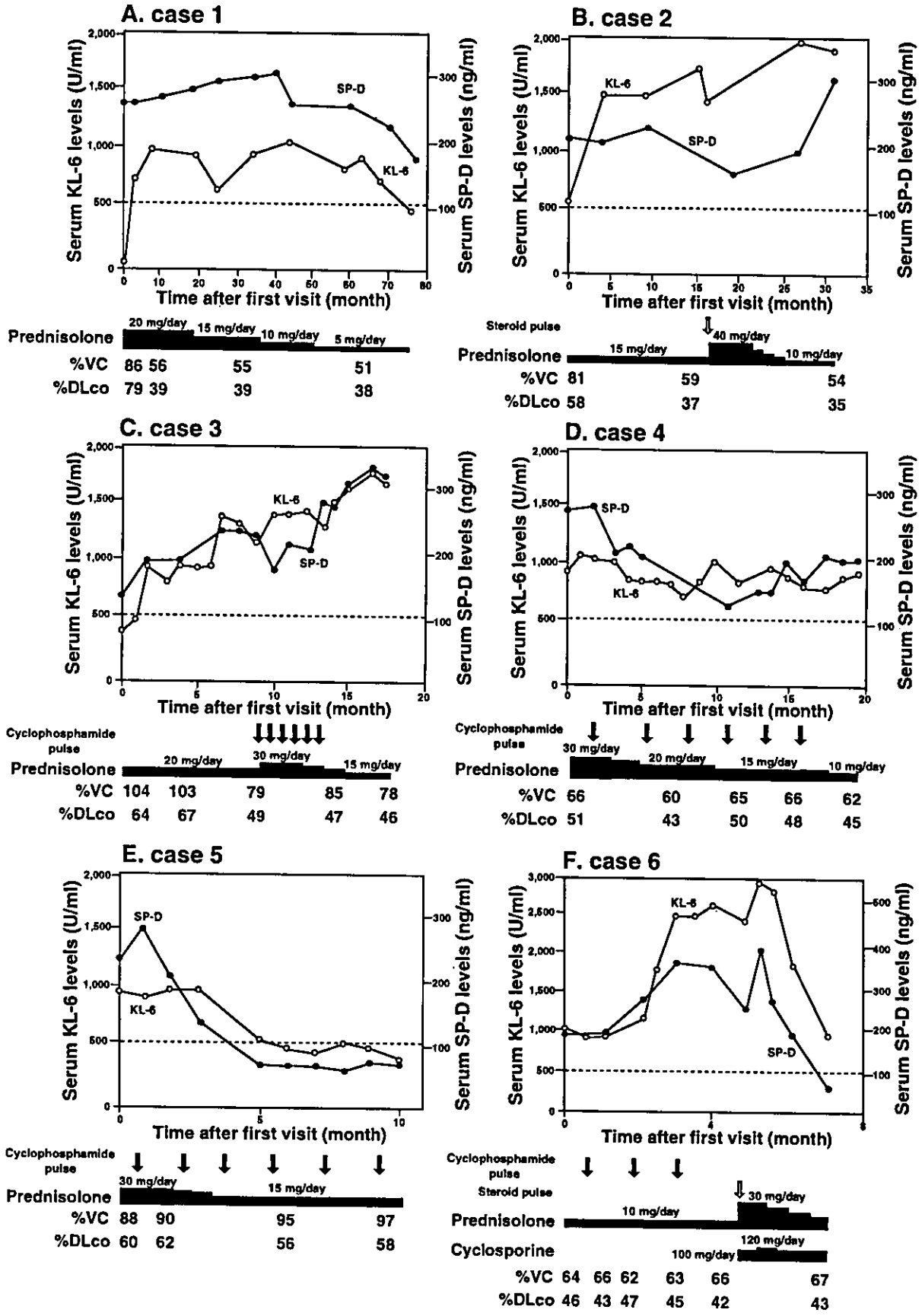


図4. 6例のSScにおける血清SP-D値及びKL-6値の経時的変化。黒点はSP-D値を、白点はKL-6値を示す。破線はカットオフ値を示す。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

全身性強皮症における肺線維症と
血清 KL-6 値の経時的変化に関する研究

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 築場広一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学特別研究生
協力者 濱口儒人 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 39 例の血清 KL-6 値を ELISA で測定し経時的変化を検討した。抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性 4 例で肺線維症（PF）の発症、増悪に伴い急激な上昇を示した。活動性の低い PF を伴った 4 例では、初診時は KL-6 高値を示したものの経過中大きな変化は示さなかった。その他 31 例では正常域内で安定しており PF の発症、増悪は見られなかった。血清 KL-6 値は PF の活動性を反映し、急激な上昇は PF の発症、増悪を表すと考えられた。

A. 研究目的

全身性強皮症（systemic sclerosis: SSc）には、約半数以上において肺線維症（pulmonary fibrosis: PF）を合併し、また死因として最も高率であるため、その評価は臨床的に極めて重要である。PF を評価する方法としては気管支肺胞洗浄、高解像度 CT（high resolution computed tomography: HRCT）等が用いられているが、簡便性、侵襲において問題がある。よって簡便で非侵襲的かつ鋭敏な血清学的

指標が確立されれば、SSc における PF の活動性を把握していく上で大きな助けになると考えられる。

KL-6 は Kohno らによって同定された糖蛋白抗原であり、主に II 型肺胞上皮細胞、呼吸細気管支上皮細胞に発現している¹。KL-6 はまた特発性間質性肺炎、過敏性肺臓炎、放射線肺臓炎、膠原病に伴う間質性肺炎等の間質性肺疾患の患者血清中で増加していることが見いだされており、これらの疾患の診断上有用な血清学的指標と

考えられている^{2,4}。さらに間質性肺疾患では血清 KL-6 値は非活動性の患者に比べ、活動性を有する患者で有意な上昇が見られることが報告されている。以上より、KL-6 は間質性肺疾患の診断のみならず、その活動性の評価にも有用な血清学的指標となる可能性がある。

最近の研究では、血清 KL-6 値は PF を伴う SSc 患者で、PF を伴わない SSc 患者に比べて有意に上昇していることが示されている⁵。しかし長期間にわたって血清 KL-6 値の変化を評価した研究はない。それ故、SSc 患者における血清 KL-6 値が PF の発症や増悪を反映して変化するかどうかは不明である。今回の研究では SSc 患者、特に高率に PF を合併する抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性患者における血清 KL-6 値を経時的に検討し、PF の活動性との相関性について検討した。

B. 研究方法

1. 対象患者

対象患者は SSc 39 例(女性 33 例、男性 6 例)であり、年齢は 49±19 歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc)が 14 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc)が 25 例であった。自己抗体別では抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 25 例、抗セントロメア抗体陽性例が 11 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体

陽性例が 3 例であった。コントロールとして健常人 32 例、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE)患者 20 例について検討した。経時的検討では、SSc 39 例からの 250 検体を用いてレトロスペクティブに行った。観察期間は 2.9±1.5 年であった。

2 ELISA

血清 KL-6 値は市販されている ELISA キットを用いて検出した (Eitest KL-6, Eisai, Tokyo, Japan)。簡潔に述べると、抗 KL-6 抗体にてコートした 96 穴のマイクロプレートにて、200 倍に希釈した血清を 20℃で 2 時間反応させた。検出にはペルオキシダーゼ標識抗マウス KL-6 抗体を用いた。カットオフ値は 500U/ml である。

C. 研究結果

1. 初診時における血清 KL-6 値

我々はまず初診時における血清 KL-6 値について検討した (図 1)。SSc における血清 KL-6 値は、健常人、SLE と比較して有意に高値であった。SLE と健常人との間には有意差は見られなかった。さらに抗トポイソメラーゼ陽性 SSc における血清 KL-6 値は、抗セントロメア抗体陽性 SSc、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性 SSc、SLE、健常人と比較して有意に上昇していた。抗セントロメア抗体陽性 SSc、抗 RNA

ポリメラーゼ抗体陽性 SSc、SLE、健康人との間に有意差は見られなかった。

血清 KL-6 値は PF を伴う抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性 SSc における血清 KL-6 値は、PF を伴わない抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性 SSc に比べて有意に高値を示した。さらに抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性 SSc における血清 KL-6 値は、%VC、%DLco と負の相関を示していた (図 2)。このように血清 KL-6 値は抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性 SSc において、PF の存在とその重症度に比例することが分かった。

2. 血清 KL-6 値の経時的検討

血清 KL-6 値が PF の発症や増悪と相関しているかどうかを検討するために、39 例の SSc 患者から採取した血清 250 検体を用いてレトロスペクティブに経時的検討を行った (図 3)。39 例の SSc 患者のうち 25 例が抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性であり、その他に抗セントロメア抗体陽性 SSc が 11 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性 SSc が 3 例であった。血清 KL-6 値の変動パターンにより抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性 SSc は、3 群に分けることが出来た。最初の群は血清 KL-6 値が急激な変動を示した群であり、4 例が分類された。第 2 群は初診時に KL-6 が高値を示したものの経過中大きな変動を見せなかったもので、4 例が分類

された。残りの 17 例は第 3 群に分類され、初診時からほぼ一定して正常値以下にて推移していた。抗セントロメア抗体陽性 SSc 11 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性 SSc 3 例は第 4 群に分類した。

第 1 群に分類された 4 例はみな経過観察中に急激な血清 KL-6 値の上昇を示しており、4 例すべてが亜急性に PF の増悪を伴った。CASE 1 は初診時には軽度の KL-6 高値 (554U/ml) を示しており、軽度の PF を認めた (図 3A、4A)。当初皮膚硬化に対してプレドニゾロン 15mg/日による治療を行っていたが、4 か月後に KL-6 値が 1,463U/ml と急激に上昇すると共に、PF の亜急性増悪を認めた。胸部 CT では両中下肺野にかけてスリガラス状陰影と共に網状陰影が見られた (図 4A)。ステロイドパルス療法を行ったが PF の進行は止まず、初診から 3.2 か月後に死亡した。CASE 2 は、初診時は 55U/ml と KL-6 は正常値を示しており、胸部 CT にて PF は認められず肺機能も正常であった (図 3A、4B)。皮膚硬化に対しプレドニゾロン 20mg/日による治療を開始したが 6 か月後に KL-6 値が 956U/ml と急激に上昇すると共に、胸部 CT 上で両下肺野にスリガラス状陰影、網状陰影が出現した。肺機能も %VC56、%DLco39

と著明に低下していた。その後 PF の進行は止んだが、3 年後には低酸素血症のため在宅酸素療法の導入が必要となった。CASE 3 は初診時に KL-6 が 1,191U/ml と高値であり、軽度の PF を認めた (図 3A)。%VC 77、%DLco44 と肺機能の低下も見られていた。当初プレドニゾロン 20mg/日による治療を行ったが、6 か月後に KL-6 が 1,693U/ml と急上昇すると共に PF の増悪が見られ、%VC57、%DLco35 と肺機能も著明に低下した。しかし約 1 年後になると PF の進行が止むと共に KL-6 値も低下した。CASE 4 は、初診時には 368U/ml と KL-6 は正常値を示しており、胸部 CT にても異常陰影は見られなかった (図 3A、4C)。皮膚硬化に対し、プレドニゾロン 20mg/日による治療を開始したが、初診から 2 か月後に突如 KL-6 が 886U/ml と上昇すると共に、胸部 CT にて両下肺野にスリガラス状陰影が見られた。初診から 8 か月後には KL-6 は 1,311U/ml と更に上昇し、胸部 CT 上のスリガラス陰影は更に増悪したため、シクロフォスファミドパルス療法を行ったところ、PF の進行が止むと共に KL-6 値も 996U/ml と低下を見せた。このように、急激な KL-6 値の上昇は SSc における PF の増悪と相関を見せていた。

第 2 群に分類した 4 例では KL-6 値は初診時より上昇しており、観察期間中も高値のまま推移した (図 3B)。CASE 5、6 においては KL-6 値は 1,000U/ml を越える高値であったが、これらは罹病期間が 6 年を越えており胸部 CT 上は中等度の PF を伴っているものの honey-comb pattern を示しており活動性は低いものと考えられた。%VC、%DLco も初診時からほとんど変化を見せなかった。CASE 7、8 では KL-6 値は高値ではあるが 1,000U/ml 以下であり、胸部 CT でもごく軽度の活動性のない PF 像を示すのみで、観察期間中もほとんど変化は見られなかった。罹病期間は、CASE 7 では 5.0 年、CASE 8 では 0.4 年であった。

第 3 群の 17 人では観察期間中、KL-6 値はほぼ正常範囲にて推移した (図 3C)。うち 11 人はごく軽度な活動性のない PF を伴っており、6 人は PF を伴っていなかった。肺機能に大きな変化は見られなかった。抗セントロメア抗体陽性例と抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例では、観察期間中 KL-6 は正常範囲内で安定しており、肺機能低下、PF の増悪は見られなかった (図 3D)。

D. 考案

今回の研究では、血清 KL-6 値が SSc、特に抗トポイソメラーゼ I 抗