

係ははっきりしなかった。 $\%DLco$  のみの低下は SSc において肺血管障害を示しており(7)、血清中 NT 値と $\%DLco$  との逆相関は SSc において ONOO-によって引き起こされた酸化障害が肺血管障害に関与している可能性が示唆された。よってこの結果より血清 NT 値は SSc 患者において $\%DLco$  に加え肺血管のダメージをさぐる有用なマーカーとして利用できるものと考えられた。

今回の結果より ONOO-は SSc の臨床症状特に肺血管障害において重要な役割を果たしている可能性が考えられた。SSc 成立段階においてラジカルによる組織障害は重要な機序と考えられており特に NO は重要である。SSc の肺疾患において呼気 NO 濃度の上昇が報告されているが、その起源として肺病変のマクロファージ、上皮細胞、浸潤細胞など種々の細胞が候補としてあがってきている(8, 9)。SSc 硬化皮膚よりの培養線維芽細胞により NO が産生されたとの報告もあり(10)、NO は肺における種々の細胞即ち線維芽細胞、上皮細胞、炎症細胞などにより産生されている可能性が考えられ SSc 患者血清の NT 上昇につながっていると思われる。

今回の研究で血清 NT の上昇は IgG, IgA と関連していた。ONOO-は免疫グロブリン内のチロシンの窒化を起し、その結果 ONOO-処理された IgG は活性低下を示すとの報告がなされている(11, 12)。SSc においては過剰に産生されている ONOO-が免疫グロブリン内のアミノ酸の窒化を起し、その結果免疫グロブリンの活性低下が引き起こされていると考えられる。そこに何らかのネガティブフィ

ードバックがかかり免疫グロブリンの産生刺激が起こり SSc の特徴の一つである高ガンマグロブリン血症に繋がるものと推定される。

一方抗 agalactosyl IgG 抗体は関節リウマチと同様に SSc 患者の血清中に同定される自己抗体である(13,14)。agalactosyl IgG は IgG の glycoform であり正常人においても全 IgG に比例して認められる。またリウマトイド因子は agalactosyl IgG により結合する事が示されている。血清中 NT と抗 agalactosyl IgG 抗体との関連は酸化により引き起こされた障害が自己抗体産生において重要な役割を果たしている可能性を示していた。よって抗 agalactosyl IgG 抗体の産生は酸化障害による IgG の修飾と関係していると考えられる。

## E. 結 論

血清 NT 値は SSc 患者において有意に上昇しており $\%DLco$  と逆相関を示していた。この結果より ONOO-が SSc における肺血管障害に関与している可能性が考えられた。よって血清 NT 値の測定は有用なマーカーと考えられ、現状の検査にこの測定を加える事でより鋭敏で詳細な診療が可能になると考えられる。

## F. 文 献

- 1 Moncada, S., Palmer, R.M. and Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109.
- 2 Matucci Cerinic, M. and Kahaleh, M.B. 2002. Beauty and the beast. The nitric oxide paradox in systemic sclerosis.

- Rheumatology (Oxford) 41:843.
- 3 Good, P.F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C.W. and Perl, D.P. 1996. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 149:21.
  - 4 Romero, L.I., Zhang, D.N., Cooke, J.P., Ho, H.K., Avalos, E., Herrera, R., et al. 2000. Differential expression of nitric oxide by dermal microvascular endothelial cells from patients with scleroderma. *Vasc. Med.* 5:147.
  - 5 Girgis, R.E., Gugnani, M.K., Abrams, J. and Mayes, M.D. 2002. Partitioning of alveolar and conducting airway nitric oxide in scleroderma lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 165:1587.
  - 6 Abramson, M.J., Barnett, A.J., Littlejohn, G.O., Smith, M.M. and Hall, S. 1991. Lung function abnormalities and decline of spirometry in scleroderma: an overrated danger? *Postgrad Med. J.* 67:632.
  - 7 Silver, R.M. 1996. Scleroderma. Clinical problems. The lungs. *Rheum Dis Clin North Am.* 22:825.
  - 8 Fajac, I., Kahan, A., Menkes, C.J., Dessanges, J.F., Dall'Ava-Santucci, J. and Dinh-Xuan, A.T. 1998. Increased nitric oxide in exhaled air in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 16:547.
  - 9 Rolla, G., Colagrandem P., Scappaticci, E., Chiavassa, G., Dutto, L., Cannizzo, S. et al. 2000. Exhaled nitric oxide in systemic sclerosis: relationships with lung involvement and pulmonary hypertension. *J. Rheumatol.* 27:1693.
  - 10 Takagi, K., Kawaguchi Y, Hara M., Sugiura, T., Harigai, M. and Kamatani, N. 2003. Serum nitric oxide (NO) levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clinical features. *Clin Exp Immunol.* 134:538.
  - 11 McCall, M.N. and Easterbrook-Smith, S.B. 1989. Comparison of the role of tyrosine residues in human IgG and rabbit IgG in binding of complement subcomponent C1q. *Biochem J.* 257:845.
  - 12 Uesugi, M., Yoshida, K. and Jasin, H.E. 2000. Inflammatory properties of IgG modified by oxygen radicals and peroxynitrite. *J. Immunol.* 165:6532.
  - 13 Mizuochi, T. 1994. Significance of measurement of rheumatoid factor oligosaccharide for early rheumatoid arthritis. *Rheumati Ka.* 12:337.
  - 14 Nishijima, C., Sato, S. and Takehara, K. 2001. Anti-agalactosyl IgG antibodies in sera from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 28:1847.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

投稿中

### 2. 学会発表

Shimizu K, Ogawa F, Sato S (Nagasaki Univ): Peroxynitrite oxidation in scleroderma. 35th

## II. 知的所有権・出願登録状況

無し

Table 1. 強皮症における血清 Nitrotyrosine 値と臨床所見との相関

	血清 NT 高値群 (n=11)	血清 NT 正常値群 (n=36)
発症年齢(yr) (means ± SD)	37.3 ± 18.6	45.4 ± 17.3
性 (男: 女)	1:10	4:32
罹病期間 (yr) (means ± SD)	10.4 ± 12.1	5.1 ± 5.6
臨床所見:		
dSSc	64	50
lSSc	36	50
指尖部潰瘍	55	39
手指屈曲拘縮	64	39
臓器病変:		
肺	55	36
%VC (means ± SD)	78.8 ± 18.3	97.3 ± 25.6
%DLco (means ± SD)	47.5 ± 12.9**	62.8 ± 13.9
食道	60	74
心	18	14
腎	0	3
関節	27	19
筋肉	18	25
自己抗体:		
抗 topoisomerase I Ab	45	44
抗 centromere Ab	36	36
免疫グロブリン:		
IgG (means ± SD)	2034.5 ± 657.1*	1590.7 ± 521.6
IgA (means ± SD)	421.5 ± 213.0*	276.0 ± 81.7
IgM (means ± SD)	242.5 ± 106.2	181.1 ± 88.4

表中の数字は特に示さない限り%を表す。

\*P<0.05 or \*\*P<0.01 vs SSc (血清 NT 値が正常の SSc 患者に対して)

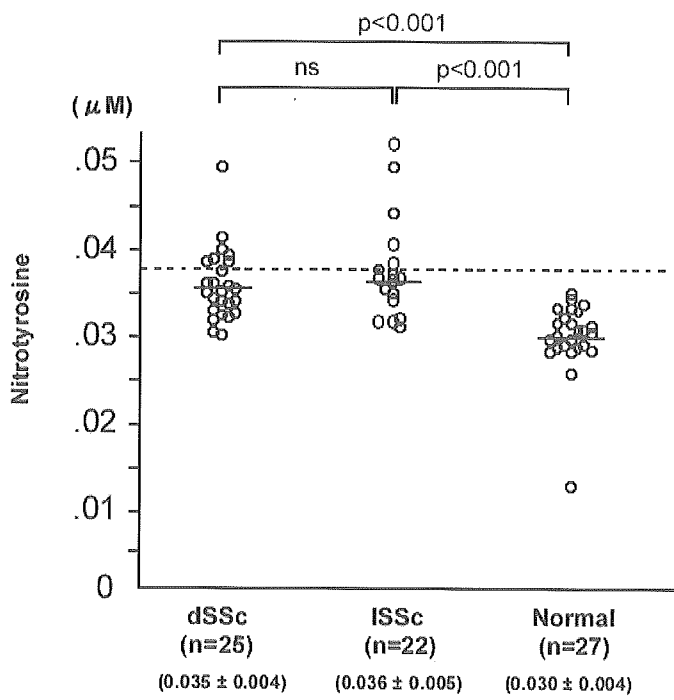


Fig. 1. dSSc, ISSc および健常人 (Normal) における血清中 Nitrotyrosine 値。括弧内は平均±SD。点線は健常人の平均値+2SD に競って利したカットオフ値を示す。

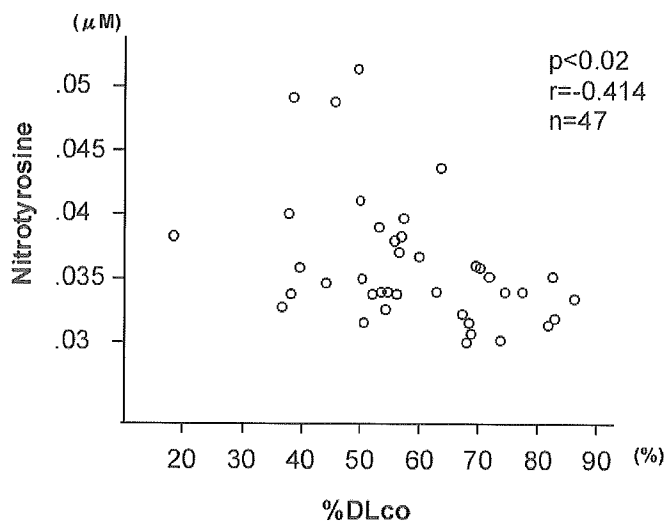


Fig. 2. SSc における初診時の血清 Nitrotyrosine 値と%DLco 値との相関

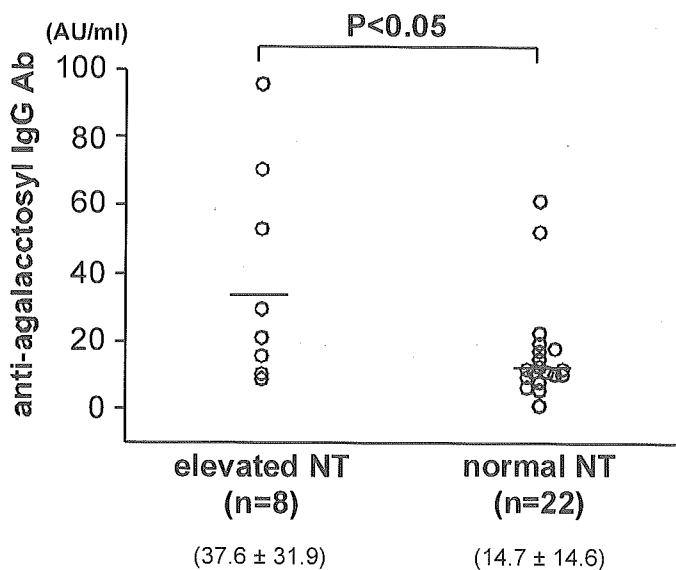


Fig. 3. 初診時血清 NT 値が高値であった SSc 患者(elevated NT)と正常値内であった SSc 患者(normal NT) における抗agalactosyl IgG 抗体値の分布を示す。括弧内は平均±SD。

## 全身性強皮症における血清 COMP 測定 of 臨床的有用性

分担研究者	高橋裕樹	札幌医科大学医学部第一内科講師
協力者	山本元久	札幌医科大学医学部第一内科
	鈴木知佐子	札幌医科大学医学部第一内科
	嵯峨賢次	札幌医科大学医学部皮膚科助教授

### 研究要旨

血清 COMP (cartilage oligomeric matrix protein) は関節軟骨損傷を反映し、関節リウマチなどの関節疾患での新しい関節破壊マーカーとして注目されている。関節症状（関節痛・関節炎）は強皮症の自覚症状の中でも高頻度に認められるものの一つであり、また強皮症において関節症状が前面に立つ場合、しばしば関節リウマチとの鑑別に苦慮することがあることから、強皮症患者における血清 COMP 測定 of 臨床的有用性について検討した。血清 COMP 濃度は強皮症で  $14.7 \pm 6.8$  IU/ml, 関節リウマチで  $10.9 \pm 5.6$  IU/ml とむしろ強皮症で有意に高く、また強皮症では関節症状との相関もみられなかった。次に強皮症患者および非強皮症皮膚病患者の皮膚組織を用い、抗 COMP 抗体による免疫染色を施行したところ、強皮症皮膚組織の細胞外基質に、非強皮症組織では認められない COMP の蛋白レベルでの発現を確認した。強皮症患者における血清 COMP 濃度上昇は、関節破壊を反映したものではなく、皮膚でのコラーゲン増加に起因する可能性が高く、その解釈には慎重を要するが、今後皮膚硬化の血清マーカーとしての血清 COMP 測定 of 有用性が示唆された。

### A. 研究目的

cartilage oligomeric matrix protein (COMP) は thrombospondin gene family に分類されている分子量 82 kDa のポリペプチドで、ジスルフィド結合によって 5 量体を形成し、軟骨マトリックスの主要成分である II 型コラーゲンと結合することから、コラーゲンネットワークの安定化機能に関与していると考えられている (1)。COMP の発現には組織特異性があると報告されており、主に関節軟骨

に存在すると考えられている。何らかの機序で関節軟骨が損傷されると、COMP は II 型コラーゲンの破壊に先行して分解され、関節液に流出し、血中に放出されることになる。従って、関節液および血清中の COMP 濃度は関節軟骨破壊を反映しているものと想定される。特に、1993 年以降、ELISA 法による COMP の測定が確立されてから、複数の臨床検討が行われており、関節リウマチ (RA) や変形性関節症 (OA) など、関節破壊を来す疾患において血清

中の COMP が高値となることが報告されている。さらに RA の疾患活動性や関節破壊の予後因子となりうる可能性も示唆されている(2, 3)。

関節症状（関節痛・関節炎）は全身性強皮症（systemic sclerosis; SSc）の自覚症状の中でも高頻度に認められるものの一つであり、また SSc において関節症状が前面に立つ場合、しばしば RA との鑑別に苦慮することがある。そこで、SSc 患者における血清 COMP 測定の臨床的な有用性について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象は札幌医科大学附属病院第一内科にて診療中の SSc 25 例、RA 20 例と、健常コントロール (HC) 10 例である。

SSc は、男性 3 例、女性 22 例で、平均年齢は 55.1 歳、臨床症状として、骨変化を 2 例、関節症状を 13 例、皮膚潰瘍を 2 例に認めた。臓器特異的自己抗体としては抗セントロメア抗体が 12 例、抗 Scl-70 抗体が 2 例で陽性であった。臓器病変は間質性肺炎を 7 例、麻痺性イレウスを 1 例、強皮症腎を 1 例、原発性胆汁性肝硬変を 2 例に認めた。

RA は男性 8 例、女性 12 例で、平均年齢は 65.6 歳、健常コントロールは、男性 6 例、女性 4 例で、平均年齢は 62.3 歳だった。

### 2) 測定

血清中の COMP 濃度は ELISA キット (MBL 社製 COMP®ELISA) を用いて測定し、統計学的検討を行った。

## C. 研究結果

### 1) SSc・RA における血清 COMP 濃度

血清 COMP 濃度は、健常人 ( $5.9 \pm 4.8$  U/l) と比較して、SSc 患者 ( $14.7 \pm 6.8$  U/l)、RA 患者 ( $10.9 \pm 5.6$  U/l) で有意に上昇していた (図 1)。また SSc 患者は RA 患者よりも有意に高値であった。

### 2) SSc における血清 COMP 濃度と各種因子との関連

SSc 患者における臨床病型や自己抗体、関節症状、関節レントゲン写真上の骨変化の有無などと血清 COMP 濃度との関連を検討した (図 2)。血清 COMP 濃度は、関節裂隙の狭小化、および OA 相当の変化を示し、骨変化ありと分類した 2 例よりも、骨変化なしの患者で有意に高く、また、SSc 患者の関節症状の有無との関連は認められなかった。また、自己抗体や臓器病変などの臨床因子と血清 COMP 濃度の間に統計学的な関連は認められなかった。

### 3) SSc 皮膚組織における COMP の発現

SSc 患者 2 例、および非強皮症患者の健常と思われる前腕皮膚組織を用い、モノクローナル抗 COMP 抗体にて免疫染色を施行した。SSc 症例 (図 3 A・B) では、真皮の細胞外基質に陽性所見を認めたが、正常皮膚組織では COMP の発現は観察されなかった (図 3 C)。

## D. 考 按

COMP の生体内での機能はまだ十分には明らかにされていないが、偽性軟骨無形成症では原因遺伝子であることが報告されており、少

なくとも関節軟骨の基質形成には必要不可欠な糖蛋白質と想定されている。コラーゲンネットワークの安定化機能を有することから、COMPの発現は生体内のコラーゲン発現部位に一致した局在が予測されるが、特に関節に特異性が高いとされていた。in vitroのmRNAレベルの検討でも、関節軟骨や滑膜由来の培養細胞に発現がみられるものの、皮膚や肺由来の培養線維芽細胞では検出されなかったと報告されている(4)。

しかしながら、今回の検討では、SSc患者において骨変化や関節症状と関連しない血清COMP濃度の上昇を認め、しかもRA患者よりも高値を示していたことから、SSc患者で観察される血清COMP上昇は関節軟骨破壊に起因するものではないと推測された。そこで関節以外、特にSScの主病変である皮膚でのCOMP発現の可能性について検索したところ、Dodgeらは、軟骨細胞以外にも、皮膚線維芽細胞を含めた複数の間葉系細胞において、蛋白質レベルでCOMPの発現が認められると報告しており、COMPの組織特異性に関してはまだ検討の余地があるものと思われた(5)。また、SScでのCOMP発現に関して、Filemonらは、DNAマイクロアレイによる検討で、SSc患者由来の皮膚線維芽細胞では、コントロール群よりもCOMP遺伝子の発現が有意に高かったと報告している(6)。以上を踏まえて、皮膚線維芽細胞、特に強皮症の皮膚においてCOMPが発現しており、血清COMP上昇を来した機序を想定し、今回、皮膚組織の免疫染色により、COMPの発現状況を検討した。非SSc患者由来の皮膚組織には免疫染色では検出可能なレベルのCOMP発現はみられ

なかった。一方、SSc患者皮膚組織では真皮の細胞外基質に陽性像を認め、皮膚硬化部でのCOMPの発現増加が確認されたことから、血清COMP濃度の上昇は皮膚由来である可能性が示唆された。

ただし、今回の検討では各症例の皮膚硬化の程度と血清COMP濃度との間に有意な相関は認められなかったが、これは今回のSScの対象症例に抗セントロメア抗体陽性のlimited型が多く、全般に皮膚硬化範囲が比較的狭いことが影響していたと推測される。今後、diffuse型のSSc症例を増やすことや、modified Rodnan total skin thickness scoreで評価した皮膚硬化度との相関、あるいは経時的な観察により、両者の関連性を検討するとともに、SSc患者由来の皮膚線維芽細胞におけるCOMP発現の調節因子、特にSScで増加が報告されているTGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) やCTGF (connective tissue growth factor) などのサイトカインの影響についても検討を進める予定である。

血清COMP濃度は臨床的にはRAや変形性関節症患者における関節軟骨変性マーカーとしての評価が固まりつつあり、また関節破壊や人工関節置換術の必要性を予測する予後因子としても期待されている。しかしながら、今回の検討より、少なくともSSc患者における血清COMP濃度上昇は関節破壊由来ではなく、皮膚硬化に起因している可能性が示唆され、その解釈には慎重を要するものと思われた。今後、SSc患者において、血清COMP濃度が診断、および治療効果の判定に有用なバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

## E. 結 論

SSc患者において血清COMP濃度の有意な上昇を認めたが、関節破壊・関節症状とは必ずしも相関しておらず、SScにおける皮膚硬化、特に細胞外基質の増加に由来するものと想定された。今後、血清COMPが皮膚硬化の血清マーカーとして利用できる可能性が示唆された。

## F. 文 献

1. Oldberg A: COMP is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem* 267: 22346, 1992.
2. Saxne T, Heinegard D: Cartilage oligomeric matrix protein; a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol* 31: 583, 1992.
3. Wislowska M, Jablonska B: Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 24: 278, 2005.
4. Recklies AD, Baillargeon L, White C: Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 41: 997, 1998.
5. Dodge GR, Hawkins D, Boesler E, Sakai L, Jimenez A: Production of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by cultured human dermal and synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 6: 435, 1998.

6. Filemon KT, Hildebrand BA, Lester MS, Stivers DN, Pounds S, Zhou X, Wallis DD, Milewicz DM, Reveille JD, Mayes MD, Jin L, Arnett FC: Classification analysis of the transcriptome of nonlesional cultured dermal fibroblasts from systemic sclerosis patients with early disease. *Arthritis Rheum* 52: 865, 2005.

## 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



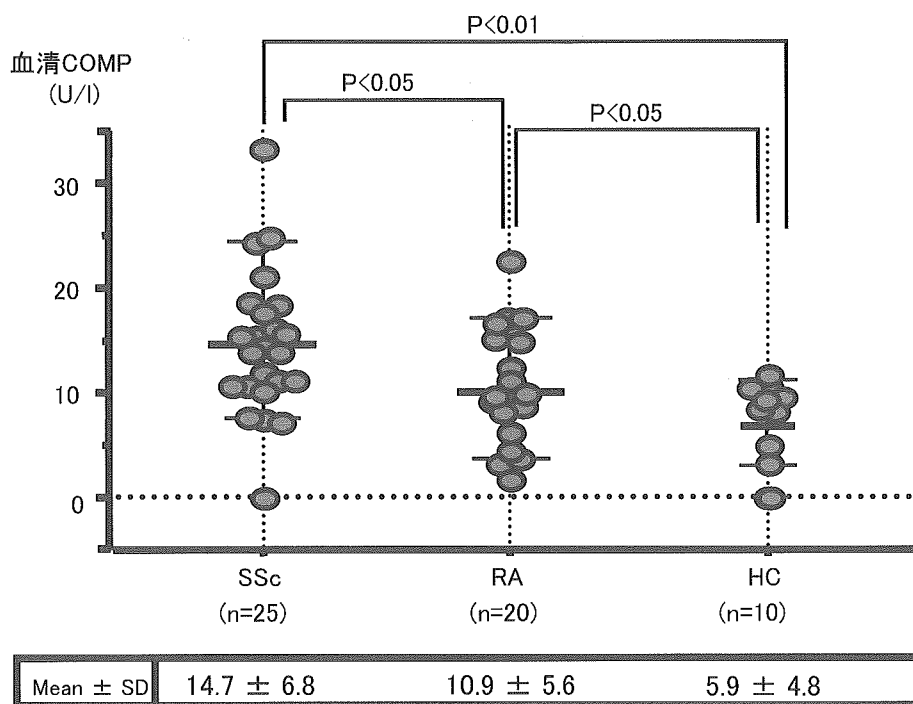


図1 膠原病における血清COMP値  
SSc：強皮症，RA：関節リウマチ，HC：健常人

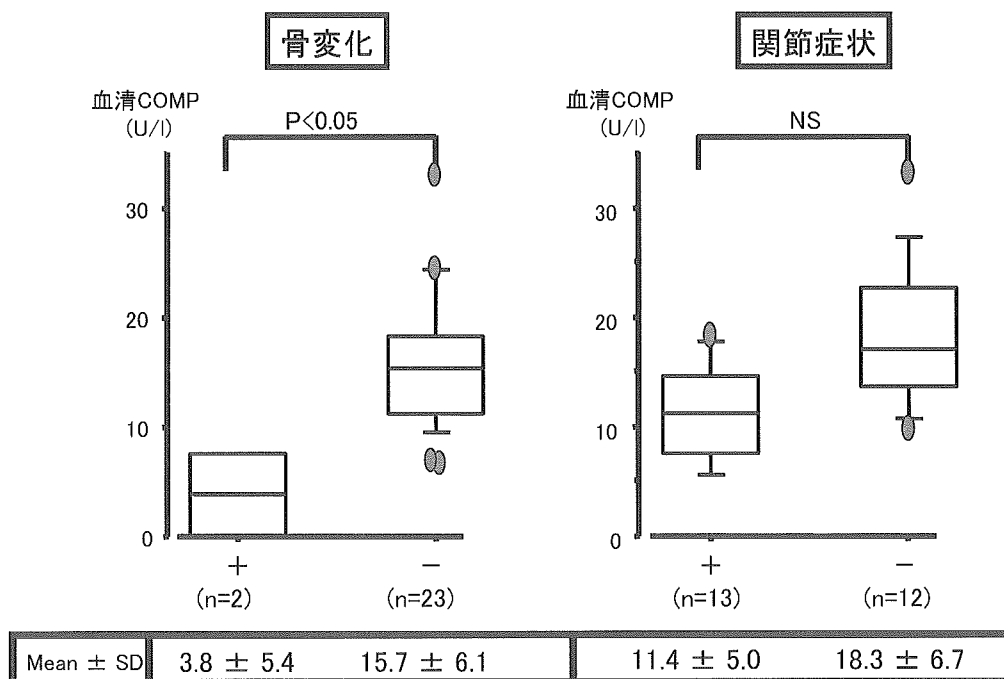


図2 強皮症における骨変化・関節症状の有無と血清COMP値

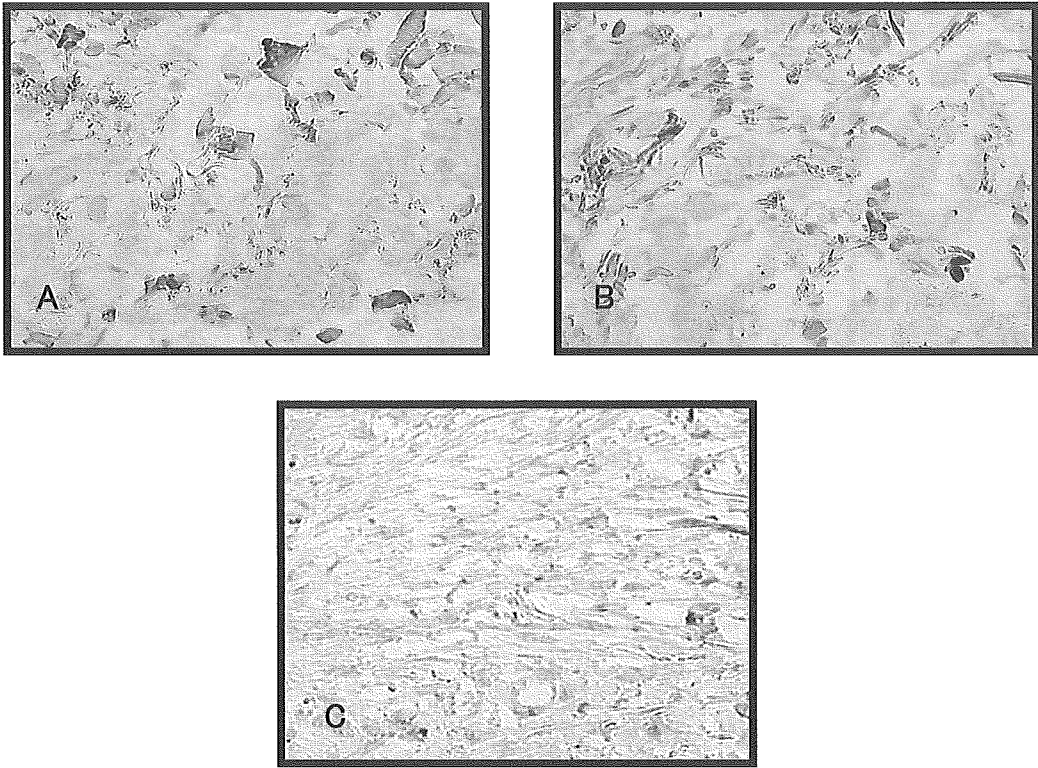


図3 皮膚組織におけるCOMPの発現（抗COMP抗体による免疫染色）  
強皮症患者の真皮間質に一致してCOMPの発現を認める（A・B，各x400）．  
一方，非強皮症患者の健常と思われる真皮間質にはCOMPの発現はみられない（C，x400）．

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

ヒト prothrombin 特異的 phosphatidylserine 依存性  
抗 prothrombin 抗体測定法の開発とその臨床的意義

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  
分担研究者 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

ループスアンチコアグラント(lupus anticoagulant, LA)の本体の1つと考えられる phosphatidylserine 依存性抗 prothrombin 抗体(aPS/PT)は2社より測定キットが市販されているが、強皮症などでは測定値に乖離がみられ、その臨床的意義の評価も定まっていない。aPS/PT には種特異性があることから、市販キットを改良しヒト prothrombin とのみ結合する aPS/PT を測定することにより強皮症症例においても血栓症と関連する aPS/PT の測定が可能となるものと考えられた。

A. 研究目的

自己免疫性血栓症の1つである抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome, APS)は抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibodies, aPL)の存在により反復性血栓症、不育症を来す<sup>1)</sup>。aPL は  $\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ -GP I)依存性抗カルジオリピン抗体(aCL/ $\beta_2$ -GP I)とLAが大部分を占めることが知られており<sup>1)</sup>、aCL/ $\beta_2$ -GP I は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)により測定され、その臨床的意義がほぼ確立している<sup>1)</sup>。一方 LA は APS において血栓症の危険因子であることが確立しているものの<sup>1)</sup>、凝固時間法により測定される定性検査であり、測定方法・検体処理方法も煩雑なため、長い間その定量化が待たれていた。近年 LA の本体は aCL/ $\beta_2$ -GP I, aPS/PT, 陰性リン脂質そのものに対す

る抗体(antiphosphatidylserine antibody, aPS)の3種類の抗体が主体であることが報告され<sup>1)</sup>、aPS/PT についても ELISA による定量化が試みられるようになった<sup>2)</sup>。しかし、昨年度の本研究班班会議でも報告したとおり、我が国で開発されている2種類の aPS/PT 測定キットでは、原発性抗リン脂質抗体症候群(primary antiphospholipid syndrome, PAPS)や全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)合併 APS 症例では2社の aPS/PT 測定値に相関をみとめるとともに血栓陽性例で有意に高値を示すことから本抗体が血栓発症の危険因子であると考えられたものの、強皮症(systemic scleroderma, SSc)症例では2社 aPS/PT 測定値に乖離が見られるとともにいずれの抗体価も血栓との関連は認められなかった<sup>3,4)</sup>。

これまでの我々の検討では、aPS/PT にはヒト prothrombin ( hF II ) のみと結合する抗体 (aPS/hPT)とヒトのみならずウシ prothrombin(bF II)とも結合しうる抗体(aPS/bPT)が存在し、血栓と関連するのは前者であること<sup>5)</sup>、SLE や PAPS 症例では aPS/hPT が大部分を占めるのに対し、SSc 症例では aPS/bPT もかなりの頻度で検出されること<sup>5)</sup>を報告してきた。

現在市販されている 2 社の aPS/PT 測定キットではともに抗原として hF II を用いているものの、種特異性はなくヒトのみならずウシ prothrombin とともに結合しうる aPS/PT(aPS/bPT) を検出している可能性がある<sup>4)</sup>。

今回我々は、phosphatidylserine (PS) が固相化された ELISA プレートに preincubation する prothrombin において、hF II と bF II の各々を加えた上で患者検体を添加し、その差を算出することにより、hF II とのみ特異的に結合する aPS/hPT を測定する測定系を考案し、その臨床的意義につき検討したので報告する。

## 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 77 例(男性 12 例, 女性 65 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。すなわち、患者診療録の記載より、頭部 MRI による脳梗塞の有無、眼底検査による網膜中心動・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、皮膚科受診による皮膚潰瘍を含む皮膚血栓症

の有無について確認した。

aPS/PT はコスミックコーポレーション社(東京)より市販されている ELISA キットを用いて測定した。本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(aPS/PT-1)を測定するものである。本キットにおいて hF II に代わり bF II を  $Ca^{2+}$  とともに添加した場合の aPS/PT 抗体価を aPS/bPT(aPS/PT-2)とした。aPS/PT-1 値が 10 U/mL 以上、かつ aPS/PT-1 値が aPS/PT-2 値を上回った場合、aPS/hPT 陽性とした。

## C. 研究結果

### 1) 強皮症における抗リン脂質抗体陽性率(表 1)

SSc 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。77 例中 52 例(67.5%)の症例で何らかの抗リン脂質抗体が検出された。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 27 例(35.1%)であった。コスミック社製キットによる aPS/PT 陽性率は 21 例(27.3%)であった。

### 2) 強皮症における血栓症発症頻度(表 1)

動脈血栓症は 22 例(男性 3 例, 女性 19 例)で認められ、心筋梗塞が 2 例、そのほかの 20 例では脳梗塞(lacunar 梗塞を含む)であった。静脈血栓症は 15 例(男性 2 例, 女性 13 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。動静脈とも血栓症が認められた症例は 8 例であった。

### 3) 強皮症における aPS/hPT 陽性率(図 1, 表 3)

aPS/PT 陽性 SSc 症例 21 例のうち, aPS/hPT 陽性例 (aPS/PT-1 >10 U/mL かつ aPS/PT-1 >aPS/PT-2 例) は 9 例 (11.7%) であった.

#### 4) 既知の抗リン脂質抗体と臨床所見との相関 (表2)

既知の抗リン脂質抗体と血栓症の関連を表2に示す. 動脈・静脈血栓症, および血栓症全体の有無による各種抗リン脂質抗体価の有意な相違は見られなかった. 血栓症の有無による LA の陽性率にも有意の相違は認められなかった.

#### 5) aPS/hPT と血栓症の関連 (表3, 図1)

aPS/hPT 陽性例 9 例のうち, 8 例で血栓症が認められた. 血栓の内訳は脳梗塞のみ 3 例, 深部静脈血栓症 + 肺梗塞合併例 1 例, 脳梗塞 + 深部静脈血栓合併例 4 例であった.

aPS/hPT と血栓症の感度・特異度は感度 29.6%, 特異度 97.9% であり, 本抗体の特異度が際立っていた. 血栓発症の危険度は Odds 比 17.9 (95% CI: 2.1 - 152.4,  $p < 0.02$ ) であった.

## D. 考案

aPS/PT は抗リン脂質抗体の1つである LA の主要抗体の1つであり, SLE や PAPS では血栓発症の危険因子であることが報告されている<sup>1)</sup>. しかし, その他の疾患における本抗体の臨床的意義はいまだ確立していない<sup>2)</sup>. また, 本抗体の標準化も進んでおらず, 測定方法も確立していないことから, 我が国でも複数の測定キットが臨床応用されつつある<sup>3,4)</sup>. しかし我々のこれまでの検討では, SSc 症例では測定法の違いにより“aPS/PT”抗体価に乖離があり, また両測定系で測定された“aPS/PT”抗体価はいずれについてもその臨床的意義は認められなかった<sup>3,4)</sup>.

一方, 我々はこれまでの検討で, “aPS/PT”には種特異性があり, ヒト prothrombin (hF II) とのみ結合する“aPS/hPT (aPS/PT-type I)”とウシ prothrombin (bF II) などヒト以外の prothrombin とも結合しうる“aPS/bPT (aPS/PT-type II)”が存在すること<sup>1,5)</sup>, 血栓症などの抗リン脂質抗体症候群の臨床症状と関連するのは前者であること<sup>5)</sup>を見出してきた.

現在我が国で市販されている aPS/PT 測定キットは, phosphatidylserine (PS) と hF II が ELISA プレートに予め固相化されているもの (MBL 社) と PS のみ予め固相化されており, 後から hF II を添加するもの (Cosmic 社) がある<sup>3,4)</sup>. 後者の測定系では hF II の添加/非添加時の抗体価を測定することにより PS と結合する抗体 (aPS) と aPS/PT を測定しその相違を検討することで, 抗リン脂質抗体症候群の臨床症状との関連性が低いと考えられる aPS を誤って“aPS/PT”として測定することがないよう工夫されている<sup>2)</sup>.

しかし, 両測定系ともヒト以外の prothrombin とも結合しうる aPS/bPT (aPS/PT-type II) を除外することはできない. そこで我々は Cosmic 社の測定キットを用い, hF II の代わりに bF II を用いて抗体価を測定し, hF II を添加した場合の“aPS/PT-1”と bF II を添加した場合の抗体価“aPS/PT-2”について, aPS/PT-1 と aPS/PT-2 の差をとることにより, 検体内に hF II とのみ結合する“aPS/hPT”が存在するか検討した.

その結果, 従来法による aPS/PT 陽性例 21 例のうち 9 例で aPS/hPT が存在することが確認された. この 9 例中 8 例で何らかの血栓症が認められ, SSc における本抗体の特異度は 97.9% と極めて高いことが確認された. また血栓発症において本

抗体が陽性であることの危険度は Odds比 17.9,  $p < 0.02$  と有意であった。これらの点は強皮症における本抗体測定の意義を示すものである。

一方、感度は 27.6% と低かった。この原因としては、①強皮症における血栓症の原因は抗リン脂質抗体のみでないこと、②抗リン脂質抗体は一種の抗体ではなく、aCL/ $\beta_2$ GPI や LA など血栓症の危険因子となること<sup>1)</sup>、なども挙げられよう。

今回の検討では SSc のみについて aPS/hPT を測定した。これまでの我々の検討により、SLE や PAPS では 2 社の aPS/PT 測定系で計測される aPS/PT の大部分が aPS/hPT を占めていることを確認しているが、そのほかの疾患における aPS/hPT の頻度、臨床症状との関連を検討することにより本抗体の臨床的意義が定まるものと期待される。

## E. 結論

Phosphatidylserine,  $Ca^{2+}$  存在下でヒト prothrombin とのみ結合する、aPS/hPT の測定系を確立した。本抗体は各種抗リン脂質抗体のうち、強皮症における血栓症発症の危険因子であることが確認された。今後各種疾患における本抗体の頻度・臨床症状との関連を検討することにより本抗体の臨床的意義が定まるものと期待される。

## F. 文献

1. 山崎雅英. 2005. 抗リン脂質抗体症候群. 図説 血栓・止血・血管学 (一瀬白帝 編) 410-421, 中外医学社, 東京, 2005.
2. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, Koike

T. 2000. 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.

3. 山崎 雅英, 河嶋 洋平, 長谷川 稔, 竹原 和彦. 2005. 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抗価の乖離と臨床的意義. 厚生労働省研究費補助金 (難治性疾患克服事業) 「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」平成 16 年度総括・分担研究報告書. 123-132, 2005.
4. 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. 2005. 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. *日本血栓止血学会雑誌*. 16(4): 378-385, 2005.
5. Yamazaki M, Triplett DA. 2000. Relationship between a subtype of antiprothrombin antibodies (anti-PT) and a clinical feature of antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity*, 15: A29. 2000.

## G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) 山崎雅英. 抗リン脂質抗体の発現・血栓症発症における接着分子の関与—接着分子ノックアウトマウスを用いた検討—厚生労働省研究費補助金 (難治性疾患克服事業) 「自己免疫疾患に関する調査研究」平成 16 年度総括・分担研究報告書. 54-59, 2005.
  - 2) 佐藤 伸一, 長谷川 稔, 山崎 雅英, 竹原

- 和彦. 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. 厚生労働省研究費補助金(難治性疾患克服事業)「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～平成 16 年度総合研究報告書. 115-118, 2005.
- 3) 山崎 雅英, 河嶋 洋平, 長谷川 稔, 竹原 和彦. 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抗価の乖離と臨床的意義. 厚生労働省研究費補助金(難治性疾患克服事業)「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」平成 16 年度総括・分担研究報告書. 123-132, 2005.
- 4) 山崎雅英. SLE に合併した血球貪食症候群 (HPS). 病理と臨床【臨時増刊号】膠原病の病理診断マニュアル. 23: 243-247, 2005.
- 5) 山崎雅英. 劇症型抗リン脂質抗体症候群. 日本臨床免疫学会会誌. 28(6):1-5, 2005.
- 6) 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. 日本血栓止血学会雑誌. 16(4): 378-385, 2005.
- 7) 久保杏奈, 朝倉英策, 表美香, 荒幡昌久, 門平靖子, 前川実生, 御館靖雄, 林朋恵, 山崎雅英, 森下英理子, 吉田知孝, 宮本謙一, 中尾眞二. LPS 誘発 DIC モデルに対する PGI<sub>2</sub> 誘導体の効果—凝血学的マーカー、血中サイトカイン濃度に対する影響—. 日本血栓止血学会雑誌. 16(4): 372-377, 2005.
- 8) Asakura H, Asamura R, Ontachi Y, Hayashi T, Omote M, Arahata M, Kadohita Y, Maekawa M, Yamazaki M, Morishita E, Yoshida T, Miyamoto K, Nakao S. Beneficial effects of urokinase on lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation in rats: focus on organ function and endothelin levels. *Thromb Haemost.* 93(4): 724-728, 2005.
- 9) Ontachi Y, Asakura H, Arahata M, Kadohita Y, Maekawa M, Hayashi T, Yamazaki M, Morishita E, Saito M, Minami S, Nakao S. Effect of combined therapy of danaparoid sodium and tranexamic acid on chronic disseminated intravascular coagulation associated with abdominal aneurysm. *Circ J.* 69(9): 1150-1153, 2005.
- 10) 山崎雅英. 劇症型抗リン脂質抗体症候群の診断と治療. リウマチ・膠原病最新トピックス. 竹原和彦・佐藤伸一・桑名正隆(編), 195-197, 診断と治療社, 東京, 2005.
- 11) 山崎雅英. 血球貪食症候群の病態と治療. リウマチ・膠原病最新トピックス. 竹原和彦・佐藤伸一・桑名正隆(編), 198-200, 診断と治療社, 東京, 2005.
- 12) 山崎雅英. 抗リン脂質抗体症候群. 図説 血栓・止血・血管学, 一瀬白帝(編), 410-421, 中外医学社, 東京, 2005.
- 13) 山崎雅英, 舟田久. 感染症. 酸化ストレスナビゲーター, 倉林正彦, 山岸昌一(編), 282-283, メディカルレビュー社, 東京, 2005
- ## 2. 学会発表
- 1) Yamazaki M, Kawashima K, Kadohira Y, Arahata M, Maekawa M, Ontachi Y, Hayashi T, Asakura H, Morishita E, Nakao S. Roles of Adhesion Molecules in The Development of Antiphospholipid

Syndrome: Key Roles of E-selectin in The Induction of Antiphospholipid Antibodies. The XXth Congress of the International Society on Thrombosis & Haemostasis 2005.8.6-12, Sydney (Australia)

2) Yamazaki M, Asakura H, Nakao S. Roles of Adhesion Molecules in The Development of Antiphospholipid Syndrome: Key Roles of E-selectin in the Induction of Anti-Phospholipid Antibodies, 2<sup>nd</sup> Tutzing Antiphospholipid Conference 2005. 2005.4.18-21, Tutzing (Germany)

3) 山崎雅英, 門平靖子, 前川実生, 荒幡昌久, 御館靖雄, 林朋恵, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二. 難治性抗リン脂質抗体症候群(APS)に対する抗 CD20 抗体 (rituximab)療法の有効性—3 年間の経過観察—, 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会, 2005.9.17-19, パシフィコ横浜(横浜)

4) 山崎雅英, 門平靖子, 前川実生, 荒幡昌久, 御館靖雄, 林朋恵, 森下英理子, 朝倉英策, 和田隆志, 横山仁, 中尾眞二. 劇症型抗リン脂質抗体症候群(CAPS)に対する免疫吸着療法の有効性. 第 28 回日本血栓止血学会学術集会, 2005.11.23-25, 福岡国際会議場(福岡)

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

なし



表1. 対象症例の背景

男性:女性	12:65
動脈血栓症	22/77 (28.6 %) (M:F= 3:19)
静脈血栓症	15/77 (19.5 %) (M:F= 2:13)
aCL	15/56 (26.8 %)
aCL/ $\beta_2$ GP I	4/56 ( 7.1 %)
LA	27/77 (35.1 %)
aPS/PT $\geq$ 10 U/mL (従来法)	21/77 (27.3 %)
何らかのaPL(+)	52/77 (67.5 %)

表2. SScにおける血栓症と各種aPLとの関連

	動脈血栓			静脈血栓			血栓全体		
	あり	なし	p 値	あり	なし	p 値	あり	なし	p 値
aCL	8.8 $\pm$ 8.7	7.6 $\pm$ 7.5	n.s	7.9 $\pm$ 10.5	8.1 $\pm$ 7.1	n.s	8.4 $\pm$ 6.5	7.8 $\pm$ 6.1	n.s
aCL/ LA	1.2 $\pm$ 5.8	1.2 $\pm$ 6.1	n.s	1.2 $\pm$ 3.9	1.2 $\pm$ 6.1	n.s	1.2 $\pm$ 6.4	1.2 $\pm$ 5.1	n.s
LA	7/22	20/55	n.s	5/15	22/62	n.s	8/29	19/48	n.s
aPS/PT (従来法)	11.3 $\pm$ 9.2	9.6 $\pm$ 8.1	n.s	9.3 $\pm$ 6.2	6.1 $\pm$ 6.1	n.s	10.3 $\pm$ 8.9	6.9 $\pm$ 5.9	n.s

表3. 血栓症におけるaPS/hPTの感度・特異度, Odds比

		血栓		
		+	-	計
aPS/hPT	+	8	1	9
	-	21	47	68
	計	29	48	77
Sensitivity		27.6 %		
Specificity		97.9 %		
Odds比		OR = 17.9 (95%CI: 2.1-152.4) (p<0.02)		

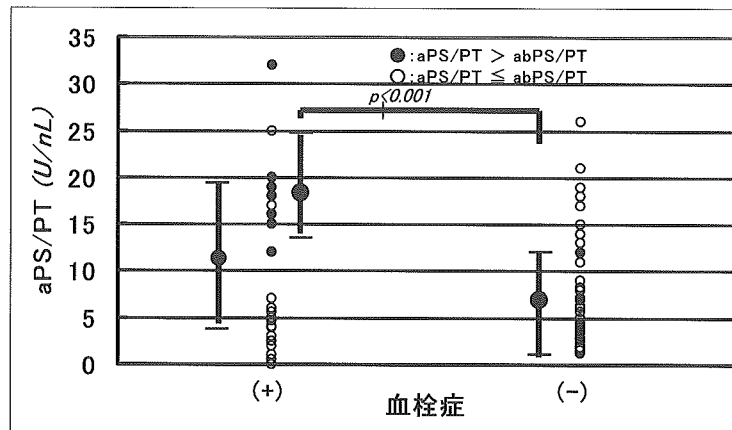


図1. SScにおける血栓症の有無とaPS/hPTとの関連

図1：SScにおける血栓症の有無とaPS/hPTとの関連。

(+)：血栓の既往あり，(-)：血栓の既往なし。●：aPS/PT抗体価10 U/mL以上で、かつaPS/bPT(ヒト prothrombinの代わりにウシ prothrombinをpreincubationした場合の抗体価)を上回った場合，○：aPS/PT抗体価10 U/mL未満またはaPS/PT抗体価がaPS/bPT(ヒト prothrombinの代わりにウシ prothrombinをpreincubationした場合の抗体価)を上回らない場合。aPS/hPT陽性例はSSc77例中9例で陽性であったが、このうち8例で血栓症の既往を認めた。

## 重症心筋障害合併強皮症の経過観察における 血清心筋マーカー測定の意味

分担研究者	遠藤平仁	北里大学医学部膠原病感染内科学助教授
協力者	星健太	北里大学医学部膠原病感染内科学助手
協力者	西正大	北里大学医学部膠原病感染内科学助手
研究協力者	田中住明	北里大学医学部膠原病感染内科学講師
研究協力者	近藤啓文	北里大学医学部膠原病感染内科学教授

### 研究要旨

重症心筋障害合併強皮症の診断、経過観察における心筋障害血清マーカー(TNT、TNI、ML、H-FABP)を測定の意味について検討した。心筋障害合併時TNT、H-FABPの上昇は並行してみられ心筋 RI スキャンの陽性所見と一致していた。しかし血清心筋障害マーカー、TNT、TNI、ML、H-FABP 間に相関性は認められなかった。心筋障害の診断、経過観察に際して TNT、H-FABP 測定は有用であると考えられた。

### A. 研究目的

強皮症は重篤な心筋障害を合併する。その特徴として心筋層の斑状線維化病変が生じ心不全、不整脈、房室ブロックなど重篤な心合併症を生じることがあり予後は極めて悪い。根本的な治療法やその病因は不明である。近年心筋傷害マーカーは既存のクレアチニンキナーゼ(CK-MB)に変わりトロポニン T(TNT)、トロポニン I(TNI)、ミオシン軽鎖、心筋型脂肪酸結合蛋白(H-FABP)など多くの心筋特異性の高い血清マーカーが報告され急性冠動脈症候群の診断に際してこの TNT や TNI などの測定が必須項目になっている。強皮症の心筋障害は斑状の心筋線維化が主体の病変であるが RI 心筋シンチグラムによる欠損像やドプラー心エコーによる左心機能、Ejection Fraction の低下、Holter 心電図による不整脈の出現などが診断の根拠になっている。しかし時間を追って病状の変化を鋭敏に捉える方

法としてはかならずしも頻回に施行できる方法ではなくより簡便な方法特に血清学的指標が望まれる。強皮症の心筋病変は線維化が主病変であるが形成過程で炎症、心筋変性過程がある。線維化そのものを可逆的に治療方法がない現在、心筋傷害の段階で加療する必要がある。その心筋障害を診断する方法として血清マーカーが有用化につき検討した。

### B. 研究方法

1985 年から 2005 年まで北里大学病院膠原病感染内科を受診した強皮症患者 352 名中重症心筋障害を合併したと診断した 14 症例について解析した。強皮症によると考えられる重症心筋障害の定義は①治療を必要とする心房性、心室性不整脈、②2度以上の房室ブロック、2脚ブロック(特に左脚ブロックを含む)③心エコー上 Ejection fraction50%未満④Holter 心電図 Lawn 基準 grade3 以上⑤RI 心

筋シンチ欠損所見。除外項目として以前から存在する高血圧や心不全、弁膜症による左室機能不全、肺動脈性肺高血圧。血清中心筋傷害マーカー、トロポニン T(TNT)、トロポニン I(TNI)、ミオシン軽鎖(ML)、ヒト心筋型脂肪酸結合蛋白(H-FABP)を測定した。心筋 RI シンチとして  $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{123}\text{I}$ -BMIPP、を測定した。

### C. 研究結果

352 症例中 14 症例(4%)が重症心筋障害を合併していた。14 症例中 10 症例(71%)は TNT が上昇していた。また H-FABP は8症例で陽性であり TNT 上昇例と H-FABP 上昇例は一致していた。しかし上昇例において TNT と H-FABP は正の相関関係はみとめられなかった。上昇例は7症例(78%)死亡しており予後不全の指標であった。TNT、H-FABP 上昇例において心臓合併症発症前の保存血清では全症例陰性であった。TNT、H-FABP 高値症例の予後は悪く、0.3ng/ml 以上(0.1ng/ml)の症例は全例短期間で死亡している。また症例のなかで長期上昇例では晩期になり測定できなくなっている症例が1症例みられた(表)。症例は発症から 3 年のびまん性皮膚硬化型強皮症の 50 歳女性である。500mlの心嚢液貯留と心室頻脈を一過性に発症した。心筋障害マーカーの上昇を経過を追って測定しえた症例が認められるが BNP (Brain type Natriuretic peptide) の上昇と TNT、TNI、ML、H-FABP の上昇は並行して認められたが各指標の値は相関性をみとめなかった(図)。各々強皮症心筋障害の進展の指標として各種心筋障害マーカーの測定は有効である。395 例の長期透析患者は ACS が存在しなくとも心筋トロポニン、とくに cTNT が上

昇することが知られている。石井らは cTNT が慢性透析患者(395 例)の予後予測に有用か検討し 3 年以内の死亡率や心イベント(死亡、血行再建術や心不全悪化による入院)発症率が 4 群に層別化できることを報告した。cTNT が 0.14 を超えると 3 か月以内に心臓イベントは 42%の症例におこり 21%が死亡した。以上のようにリスク評価に cTNT などの心筋傷害マーカーが有用である。強皮症の心筋傷害の診断に心筋マーカーは有用である。

### D. 考察

トロポニンは高い心筋特異性と広い時間的診断期間(Diagnostic Window)を持つため CK(クレアチニンキナーゼ)や CK-MB では見逃されてきた急性冠動脈症候群(ACS:AMIと不安定狭心症をあわせ)の微小心筋傷害(minor myocardial damage)を診断することができる。しかも、微小心筋傷害が存在する ACS は極めて予後が悪い。そのため ACS のリスク評価に役立っている。さらに心不全や慢性腎不全などの ACS 以外の疾患についても潜在的な心筋傷害(Ongoing myocardial damage)が存在し予後との関係が想定されている。強皮症(SSc)における心筋傷害は SSc そのものによるいわゆる Scleroderma heart と間質性肺炎や肺高血圧症による二次的な障害が存在する。しかし明確に心筋障害を動脈硬化や高血圧の二次的な障害と鑑別することは困難である。いわゆる Scleroderma heart と呼ばれる斑状心筋線維化が認められる。この強皮症における心筋傷害の過程で心筋壊死、炎症、線維への置換が起こる。損傷した心筋の血清検査指標の変動は強皮症の心筋傷害で上昇するか。病状の変動に並行し変化するか検討した。