

Box 2-1

薬剤アレルギー

■ 定義

薬剤性臓器障害の中には、直接細胞傷害を引き起こすものと薬剤あるいはその成分の一部が抗原となって、それに対する抗体がつけられ、次に薬剤が与えられたときに抗原抗体反応を起こし、その結果として生体に不利な反応が起こることをいう。後者の場合を薬剤アレルギーというが、鑑別は必ずしも容易ではない。

■ 症状と薬剤の関係

① 一般的な場合

薬剤アレルギーの場合、臓器としては、一般に皮膚を標的とすることが多いが、皮膚だけでなく全身臓器でみられる。ここでは以下に主なものとその特徴を列挙する。

- **肝臓**：肝臓は胆汁うっ滞型と肝細胞傷害型に分けられる。
- **腎臓**：急性間質性腎炎が主であり、発熱、発疹、好酸球増多症をみとめる。メチシリンは最も頻度が高い。病理学的には尿細管・間質に病変の主座があり、間質の浮腫や多核白血球・リンパ球・マクロファージなどの浸潤と、尿細管細胞の変性、脱落および尿細管の拡張や萎縮を呈する。
- **肺**：喘息および浸潤反応をみとめる。好酸球性肺炎から急性肺浮腫まで組織は様々である。免疫学的機序による薬剤性肺炎は、抗原抗体反応による過敏性肺炎の様相が強い。
- **脳**：全身痙攣発作、無菌性髄膜炎、視神経炎、末梢神経障害が起こる。
- **血管**：薬剤性アレルギーで知られているのは毛細血管および細動脈、細静脈における白

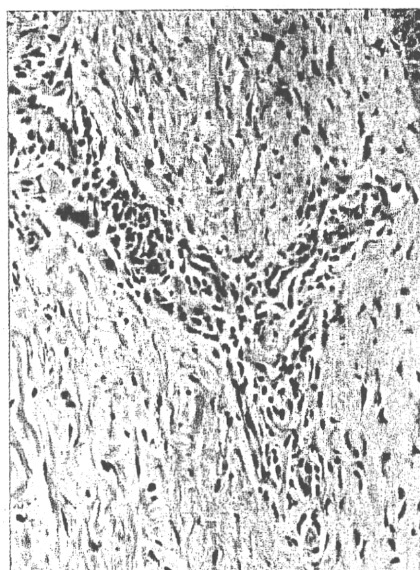


図1 白血球破砕性血管炎
(HE染色、中倍率)
皮膚の小静脈にみられた例。

血球破砕性血管炎 leukocytoclastic vasculitis であり、過敏性あるいはアレルギー性血管炎の範疇に入る。

② 特殊な場合(薬剤性ループス)

プロカインアミドやヒドラジンのような薬物を長期にわたって投与すると、ループスのような症状が生じる。特にプロカインアミドを約6ヵ月以上にわたって投与されると、ほとんどの患者で抗核抗体が産生され、20%の患者でSLE様の症状を発症する。

■ 発症機序

薬剤によるアレルギー反応は Coombs & Gell により I～IV型に分類されているが、薬物ア

アレルギーの機序もこれに従って分けられる。その中で特に知られているのは、以下の3つである。

- 1 ペニシリンなどは、ハプテンとして血球表面に非特異的に反応して完全抗原になり、これに抗体が反応する場合がある。
- 2 キニン、フェナセチンは、抗体と反応して複合体をつくり、赤血球とは補体レセプターで結合してⅢ型アレルギー反応による溶血を起こす場合がある。
- 3 プロカインアミドなどのように核酸が傷害

されて放出され、それに抗体が形成され、免疫複合体を形成する場合もある。

■ 組織所見

白血球破碎性血管炎：薬剤性アレルギーでしばしばみられる。小さな血管(後毛細管小静脈)を中心として核の破片を伴う白血球の浸潤がみられる(図1)。

(澤井高志)



2

免疫・アレルギー疾患

症例 Raynaud 現象

43 歳，女性。レイノー Raynaud 現象で発症，血清中の抗 U1-RNP 抗体高値，抗 Sm 抗体陰性。皮膚は硬化性浮腫の状態が持続し(図 1)，生検では図 1b に示すような所見を呈した。症状はあまり改善せず，嚥下障害もみられ，筋電図でも軽度の異常を指摘された。発症 8 年目ぐらいで動悸，息切れが出現，肺高血圧症と診断され，免疫抑制剤，ステロイド剤などの治療を試みたが，心不全にて死亡。

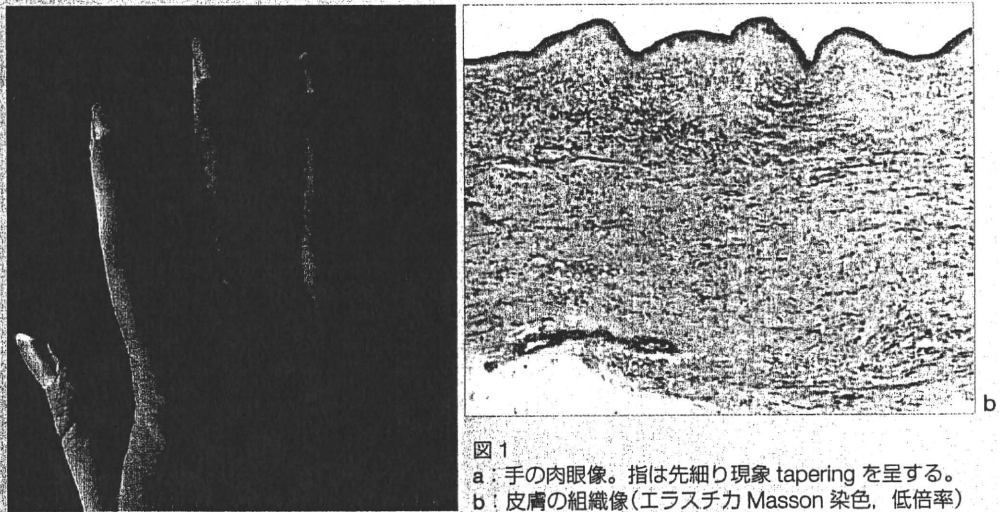


図 1
a: 手の肉眼像。指は先細り現象 tapering を呈する。
b: 皮膚の組織像(エラスチカ Masson 染色，低倍率)

■ 診断

混合性結合組織病

mixed connective tissue disease(MCTD)

■ 定義

1972 年 Gordon Sharp によって提唱された膠原病の 1 つで，SLE，全身性硬化症 systemic sclerosis(SSc)および多発性筋炎/皮膚筋炎 polymyositis/dermatomyositis (PM/DM) の部分症状と Raynaud 現象，さらに血清中の抗 U1-RNP 抗体が高値を示す。この疾患を SSc の亜型として捉え，その独立性について異論をはさむ研究者もいる。なお，1 つの疾患がいくつかの診断基準を満たすときはオーバーラップ症候群 overlap syndrome(OS)，いずれの診断基準も満たさない膠原病の場合は unclassified connective tissue disease(UCTD)とよばれる。

■ 病態生理

原因不明の自己免疫疾患。Raynaud 現象(症例 353 の「Keyword」と「参考」を参照)を特徴として，血清中の抗 U1-RNP 抗体の高値を特徴とし，そのほかに様々な自己抗体が陽性となるが，病態との関係は不明である。死因としては肺血管に高度の病変を伴う肺高血圧症が多い。

■ 病理

肺高血圧症が死因の大きな比重を占めているが，特に線維症がない場合，肺には一見変化が起っていないようにみえる。直接死因となった肺では血管の線維性肥厚をみとめ(図 2a)，肺高血圧症の存在を示唆している。叢状病変 plexiform lesion をみとめる症例もあるが，まれである。太い肺動脈では高血圧の影響で壁のアテローム硬化が目立つ。食道や消化管には平滑筋の萎縮と線維化をみとめ，臨床的な嚥下障害に一致する像であ

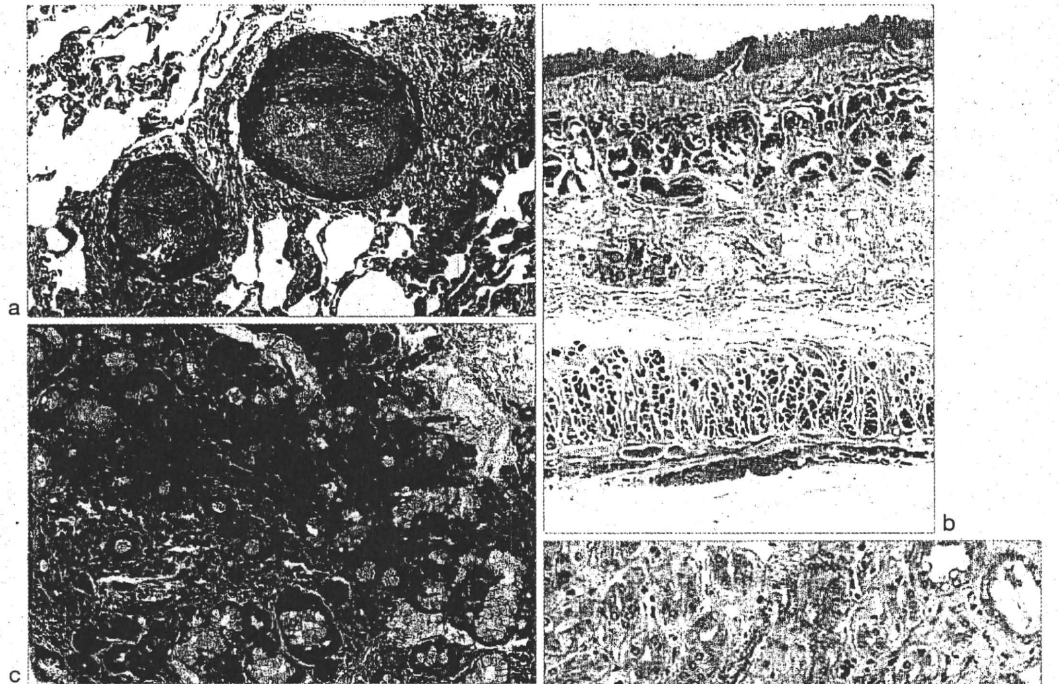


図2 肺中～小動脈の線維性内膜肥厚

- a : 肺：肺高血圧症を伴う動脈病変。動脈の線維性の内膜肥厚を示す(MCTD では肺高血圧症が死亡の大きな原因となる)(エラスチカ Masson 染色, 中倍率)。
- b : 食道：嚥下障害を伴う食道病変も本疾患の大きな特徴であり, 平滑筋線維の変性と線維化による食道壁の硬化がみられる(エラスチカ Masson 染色, 低倍率)。
- c : 唾液腺：唾液腺炎。本疾患ではシェーグレン症候群様の症状がしばしばみられるが, 唾液腺にはリンパ球の浸潤と実質組織の萎縮をみとめる(HE 染色, 低倍率)。
- d : 腎臓：MCTD では比較的腎障害の程度は軽く, 膜性腎症の形をとることが多い。まれに急激に腎機能が悪化して死に至る renal crisis が起こることがあるが, 組織学的には本図のように小葉間動脈の高度の内膜肥厚が急激にみられる(Azan-Mallory 染色, 中倍率)。

る(図2b)。その他, ほとんどの症例で唾液腺は炎症によって高度の萎縮を示している(図2c)。

しかし, よく観察すると太い肺動脈では拡張が認められ, 壁にはアテローム硬化が目立つ。また, 肺の断面では小さな血管の切り口がよく目立つ。肺高血圧症の影響で心臓には右室肥大をみとめ, 肝臓には右心不全の影響によるニクズク肝 nutmeg liver の像をみとめる。食道は硬く, ごわごわした感じであるが, 線維化を反映したものと思われる。また, 唾液腺は萎縮して肉眼的に見分けるのに苦労する場合もある。腎病変は一般に軽度であるが, まれに高度の動脈の内膜肥厚により renal crisis の状態に陥り, 死に至る(図2d)。

■ 鑑別診断

鑑別すべき疾患は全身性硬化症(SSc)である。しかし, 本症の皮膚所見の組織学的な特徴は, SScのように浮腫期, 硬化期, 萎縮期のような変化を示さず, 長期にわたって浮腫性硬化の状態にとどまることである(図1bでは浮腫を伴った線維化もみられる)。また, 死因ともなる, 肺血管病変を伴う肺高血圧症の合併頻度が非常に高い。混合性といわれるとおり, SLE, PM/DM, SScの所見を併せもつものの, 高度なものではなく, 適度にそれぞれの症状を呈しながら, しかも肺高血圧症やU1-RNP抗体高値のように比較的特徴的な所見をも示すというのが本疾患の特徴である。

(澤井高志)

症例 358 発熱，多彩な全身症状

症例 358-1 65 歳，女性。熱発と左側頭部痛で発症。側頭部に触れる索状物を生検したところ，図 1 のような所見がみとめられた。

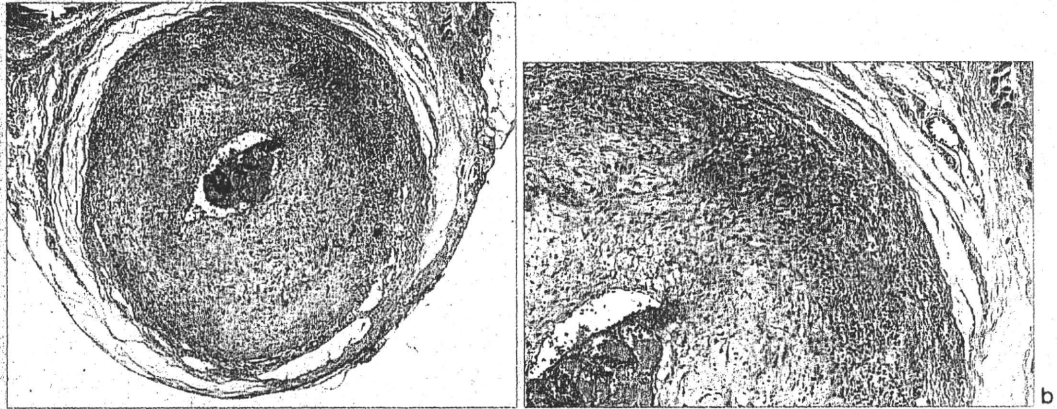


図 1
a：側頭動脈の組織像 (HE 染色，低倍率) b：a の中倍率像。巨細胞がみられる。

症例 358-2 55 歳，男性。多彩な神経症状と熱発で発症。ステロイド治療により症状は改善したが，クモ膜下出血にて死亡した。剖検の結果，全身の臓器に図 2 のような所見がみとめられた。

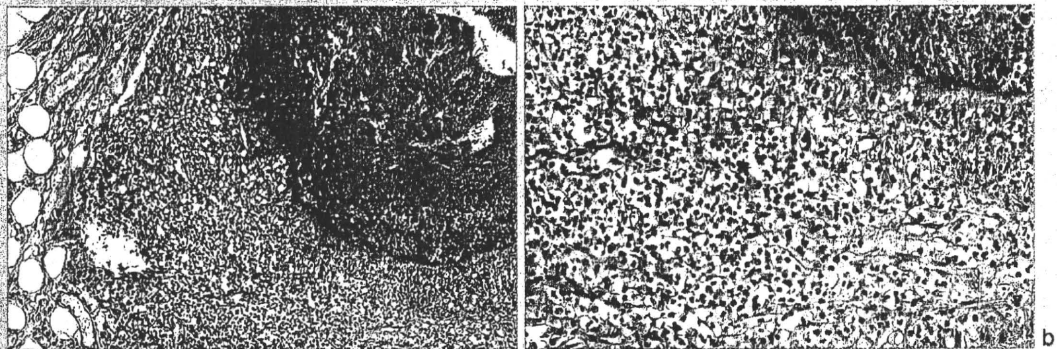


図 2
a：腸間膜内小動脈の組織像 (HE 染色，中倍率) b：a の高倍率像。好酸球浸潤が著しい。

■ 診断

症例 358-1 巨細胞性動脈炎 giant cell arteritis

症例 358-2 アレルギー性肉芽腫性血管炎
allergic granulomatous angiitis (AGA)

巨細胞性動脈炎

■ 定義

側頭動脈炎 temporal arteritis，まれに肉芽腫性動脈炎 granulomatous arteritis ともよばれるが，側頭動脈炎は全身性血管病変の部分症との見解から，巨細胞性動脈炎という用語が用いられる。

に至った。

■ 発症機序・病態生理

病因は未だ不明だが、細胞性免疫の関与が示唆されている。家族集積例や人種差が報告されており、HLA-DR4 との相関も示されている。特に患者の60%が、HLA-DRB1*0401 もしくは*0404/08 アロタイプをもつことが報告されている。自己抗体に関しては、抗エラスチン抗体、抗カルジオリピン抗体、ANCA との関連も想定されているが、確定的な報告はみられない。また発症様式が急性であり、細菌やウイルス感染の関与も想定されるが、ウイルス感染との明らかな相関は知られていない。

■ 病理

肉眼所見：病変の分布は、全身性に中等度径の動脈から大動脈までが侵されうるが、最も傷害を受けるのは、大動脈弓の分枝である。罹患した側頭動脈は、疼痛を伴い赤色で腫脹し、索状物様である。血栓がみられることがあり、しばしば著明な狭窄をみる。大動脈を含む頭蓋外大血管の病変は致死の合併症を引き起こしうる。大動脈瘤、解離性大動脈瘤の合併がみられ、病変が大動脈弁輪に波及すると大動脈弁閉鎖不全に至る。

組織所見：高齢者に発症することから動脈硬化病変を伴うことが多く、それゆえ血管病変は多彩である。炎症の時期によっても異なるが、基本形は内弾性板を中心とする肉芽腫性炎症と著しい内膜肥厚ならびに中膜の萎縮である。この肉芽腫性病変は、内弾性板の断裂と、その中膜側に、内弾性板に接して多核巨細胞がみられるのを特徴とする(図 1a, b)。これに全周性にびまん性の炎症細胞浸潤が加わる。浸潤細胞は多核巨細胞のほか、T細胞主体であり、B細胞や好中球は基本的にみられない。炎症が鎮静化すると、本病変に特徴的とされる多核巨細胞は必ずしもみとめられない。また、外弾性板の破壊は乏しい。さらに、これらの病変は分節状に分布する(skip lesion)。

免疫染色所見：病変部では、免疫グロブリン、補体の沈着がみとめられる。また病変での浸潤T細胞は大部分がCD4細胞であり、オリゴクローナルな増生がみられ、何らかの抗原に対する特異

的反応の可能性が示唆される。

アレルギー性肉芽腫性血管炎

■ 定義

気管支喘息発作、好酸球増多に加え、組織学的に小～中型血管の全身性壊死性血管炎を伴う疾患である。1951年ChurgとStraussにより報告された後、結節性多発動脈炎、顕微鏡的多発血管炎 microscopic polyangiitis (MPA)、ウェゲナー肉芽腫症 Wegener's granulomatosis (WG) などとは異なる独立した疾患として現在に至る。血管炎症状を加えた臨床所見のみで診断基準を満たすものはChurg-Strauss 症候群(CSS)とよばれ、組織学的に好酸球浸潤を伴う血管炎の所見が明らかな場合、アレルギー性肉芽腫性血管炎とよぶ。

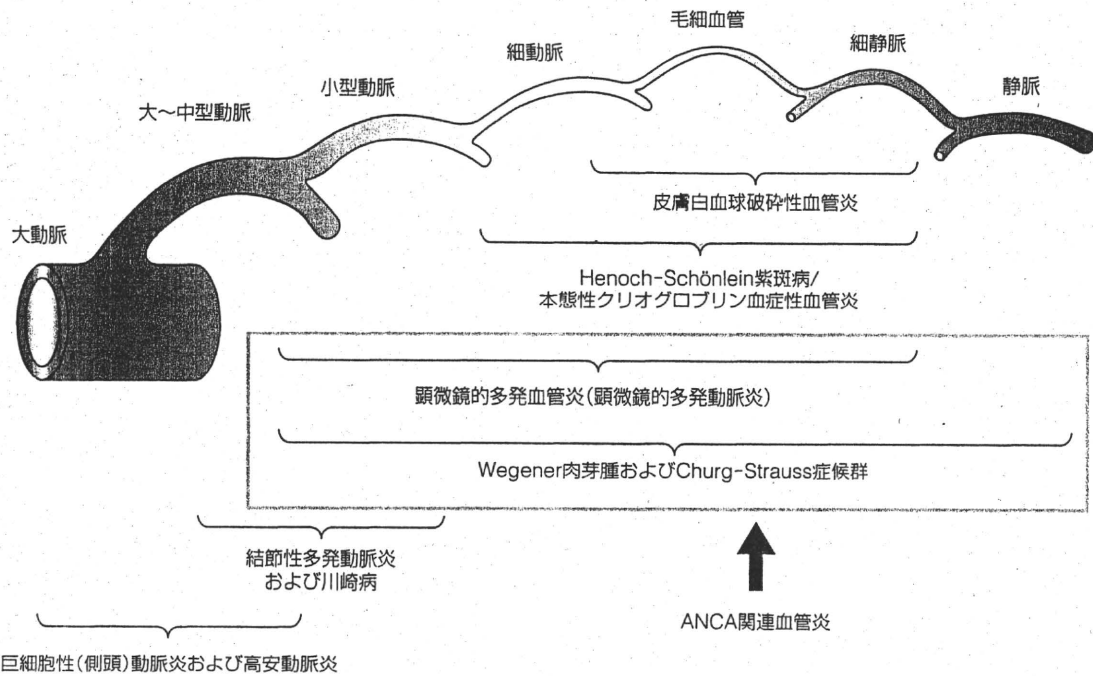
■ 発症機序・病態生理

好酸球増多症がみられることより、何らかのアレルギーの機序の関与が想定されているものの、病因は現在のところ不明である。MPAと同様、核周囲性抗好中球細胞質抗体 perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) の陽性率が高く、顆粒球による内皮傷害の関与も想定されている。血管炎症状として、多発性神経炎、中枢神経障害、消化管出血、呼吸器障害、腎障害等、多彩な臨床症状を呈する。

■ 病理

肉眼所見：血管炎の好発臓器は、心、肺、肝、腎、消化管、皮膚等、全身性である。

組織所見：壊死性、肉芽腫性の血管炎で、小～中型の動静脈が主であるが、細動静脈、毛細血管にも起こる。急性期には、好酸球を主体とする炎症性細胞浸潤をみとめ、血管内皮の膨化、血管内膜や血管周囲組織の浮腫、血栓形成をきたし、さらに中膜にフィブリノイド壊死をきたす(図 2a, b)。次いで内弾性板の破壊や類上皮細胞、多核巨細胞の出現をみとめ、血管を中心とした肉芽腫の形成期に移行する。癒痕期になると、炎症細胞浸潤は好酸球を含めてほとんどみとめられない。なお腎障害を示す症例では、小葉間動脈の壊死性血管炎に加えて、巣状壊死性糸球体腎炎を呈する。



III
2 免疫・アレルギー疾患

図4 血管炎症候群での罹患血管サイズ (文献2より引用)

リン血症性血管炎 essential cryoglobulinemic vasculitis, 皮膚白血球破碎性血管炎 cutaneous leukocytoclastic vasculitis(第二章8, 症例223), 川崎病 Kawasaki disease(本章, 症例360)。

床 16: 246-248, 1998.

- 2) Jennette JC, Falk RJ, et al.: Nomenclature of systemic vasculitides: Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 37: 187-192, 1994.

☐ 参考文献

- 1) 能勢真人: 血管炎症候群分類の時空的視点. 病理と臨

(菅野祐幸)

症例 359 口腔粘膜アフタ性潰瘍，皮疹，下血

44 歳，男性。口腔内アフタ，皮疹がみられ，その後下血をきたした。足関節部皮疹(硬結性紅斑)の生検では図 1 のような所見がみとめられた。

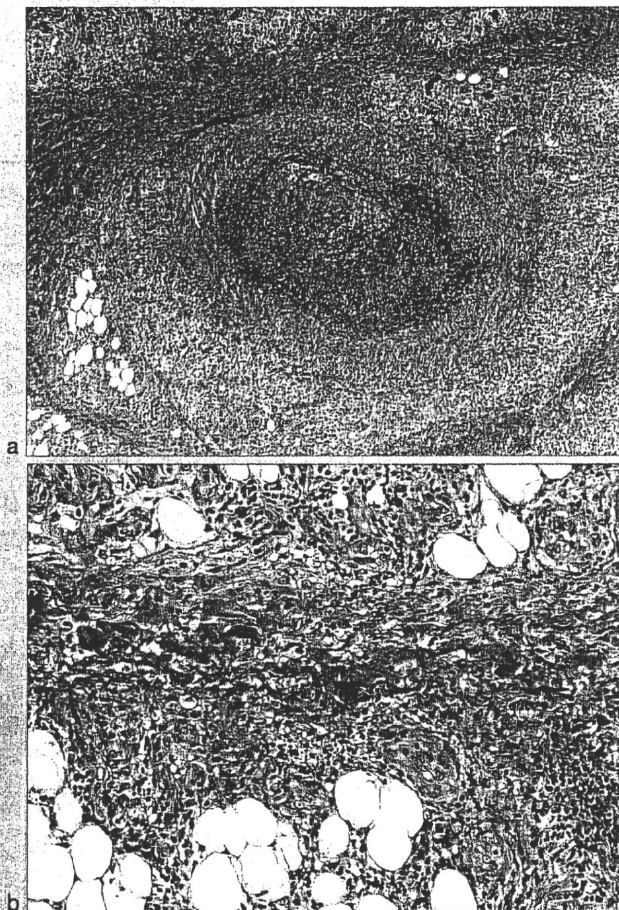


図 1
a : 皮下組織の組織像(HE 染色，低倍率)
b : 皮下組織の組織像(HE 染色，中倍率)

■ 診断

Behçet 病 Behçet disease

■ 定義

1937 年，トルコのベーチェット Behçet により提唱された多臓器侵襲性の難治性疾患。口腔粘膜のアフタ性潰瘍，皮膚症状，眼内炎，外陰部潰瘍を 4 大主症状とする原因不明の炎症性疾患で，全身臓器を障害し，急性の炎症が反復し遷延した

経過をとるのが特徴である。

■ 発症機序・病態生理

原因は不明だが，疾患感受性遺伝子は *HLA-B51*0101* アレル(対立遺伝子)の近傍に絞られている。*HLA-B51* を有する患者の好中球は，生体内で活性化されやすい状態にあることが明らかとなり，*HLA-B51* 遺伝子は好中球の機能制御に関与していることが明らかとなってきた。また，黒

者ではある種の連鎖球菌に対する遅延型過敏反応がみられ、外因性の発症因子の1つとして想定されている。一方、自己および連鎖球菌由来の熱ショック蛋白 heat shock protein (HSP) に対する免疫異常も重要で、これらと反応するTリンパ球から産生される向炎症性サイトカインや好中球誘導性サイトカインが炎症病態の形成に重要と考えられている。

■ 分類

4大主症状のほかに、重篤な臓器障害をきたしうる特殊病型を含む副症状として、一過性の関節炎、再発性の副睾丸炎、回盲部潰瘍で代表される消化管病変(腸管 Behçet)、静脈系に頻度が高く、大静脈主幹分枝の血栓性閉塞が典型的な血管病変(血管 Behçet)、および急性あるいは慢性の神経病変(神経 Behçet)がみられることがあり、主症状4つが揃う完全型と、主症状の1つあるいは2つを欠く一方、副症状を伴う不全型がある。

■ 病理

肉眼所見：口腔粘膜の再発性アフタ性潰瘍はほぼ

必発で、発赤を伴う境界明瞭で白苔付着を伴う小潰瘍である。皮膚症状としては皮下の血栓性静脈炎(図 1a 参照)や結節性紅斑様皮疹で組織学的に中隔性脂肪組織炎(図 1b 参照)を示す場合、また毛嚢炎様ないし座瘡様皮疹を示すものなど、種々の症状がみられる。眼内炎としては、前房蓄膿を呈する虹彩毛様体炎型と眼底の病変を伴う網膜ブドウ膜炎型がある。外陰部潰瘍は陰茎・陰囊・小陰唇・腔壁などに口腔内アフタに類似した潰瘍を生じる。

組織所見：血管 Behçet に加え、皮膚症状、外陰部潰瘍、および消化管病変の潰瘍周辺の粘膜下層および漿膜下層で小血管病変がみとめられる。組織学的には、皮膚病変では血栓性静脈炎に類似した組織像を示し(図 1a)、後二者では小血管の内膜肥厚および血管周囲性炎症細胞浸潤がみられ、一部血管壁の破壊を示す血管炎の像を示す。静脈病変が優位である。

蛍光抗体法所見：病変部小静脈の内壁に沿って、IgM の沈着がみとめられることがある。

(菅野祐幸)

症例 360 発熱，発疹，粘膜の発赤，頸部リンパ節腫脹

1 歳，男児。咳，熱発で発症。その後，全身の発疹，口唇の発赤，頸部リンパ節腫脹，眼球結膜の充血がみられた。全経過 51 日で突然の心停止をきたし死亡した。剖検の結果，心臓に図 1a, b のような所見，腎臓に図 1c のような所見がみとめられた。

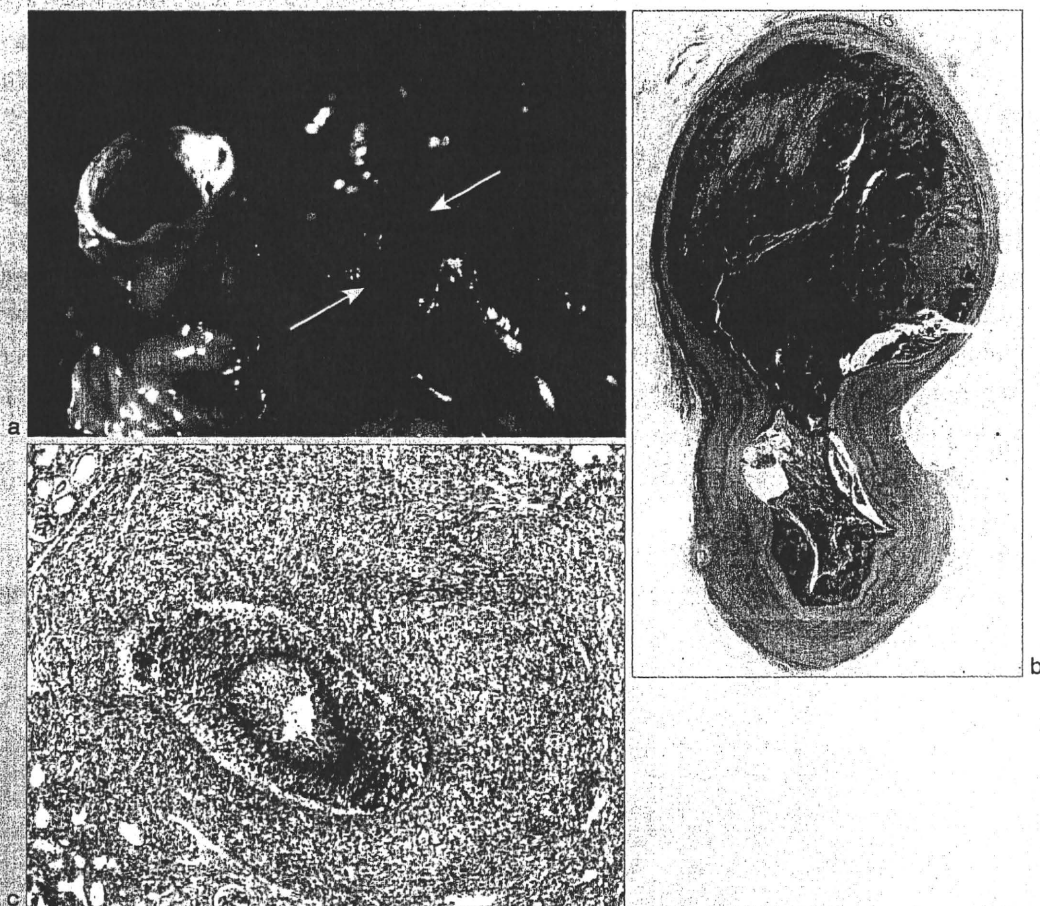


図 1

- a: 冠状動脈動脈瘤の肉眼像。病変部を矢印で示す。
- b: 冠状動脈動脈瘤のルーベ像(HE 染色)
- c: 腎弓状動脈の組織像(HE 染色，中倍率)

■ 診断

川崎病 Kawasaki disease

■ 定義

幼児期に好発する急性炎症性動脈炎で，主として冠状動脈が侵される。1967 年，川崎らにより，日本ではじめて 1 つの疾患カテゴリーとして位

置づけられた。口唇・口腔粘膜の発赤，皮膚の痲性浮腫，頸部リンパ節腫脹を示し，粘膜皮膚リンパ節症候群 muco-cutaneous lymph node syndrome (MCLS)ともよばれる。

■ 発症機序・病態生理

病因は不明だが，何らかの感染が契機になるも

のと想定されている。活性化したT細胞およびマクロファージから産生されるサイトカインが血管内皮細胞を活性化するとともに、著増した活性化好中球による血管内皮の傷害により、血管壁での炎症が惹起されると考えられる。冠状動脈壁破壊後に形成された動脈瘤(図1aの矢印)での血栓形成(図1b)に伴う急性心筋梗塞が突然死の原因となる場合がある。

■ 病理

肉眼所見：主として冠状動脈が侵されるが、大動脈ならびに総腸骨動脈等の主要分枝、また腎、肝、脾、消化管等の内臓血管を含める、大～小型動脈の系統的血管炎である。

組織所見：炎症の過程により4期に分けられているが、罹患部位によりまちまちである。

第1期(初期：第1～2病週)では、細動静脈では浮腫、好中球浸潤を伴う急性炎症像がみられ、中～大型動脈では内膜炎、外膜炎を呈する。

第2期(極期：第2～4病週)には、細動静脈病変は消失し、中～大型動脈での炎症が中膜に波及する汎血管炎となる。動脈壁の浮腫、壊死、単核球浸潤が著しく(図1c)、特に冠状動脈では動脈瘤、血栓形成をみる。この時期、心臓では心筋炎、心内膜炎などもみられる。

第3期(肉芽期：第4～7病週)には、中型動脈での肉芽性病変の形成に移行する。

第4期(瘢痕期：第7病週以降)には、動脈壁の瘢痕化、内膜の線維性肥厚、器質化血栓、狭窄など、非特異的血管炎病変を呈する。動脈瘤は残存する。

■ 鑑別診断

当初は小児型の結節性多発動脈炎との鑑別が問題となったが、フィブリノイド壊死がほとんどみとめられない点が異なる。

(菅野祐幸)

III

2 免疫・アレルギー疾患

混合性結合組織病(MCTD)にともなう肺高血圧(PH)に関連する抗内皮細胞抗体(AECA)に関する研究

研究分担者： 澤井 高志 岩手医科大学医学部 病理学講座・教授
研究協力者： 鎌滝 章央 岩手医科大学医学部 病理学講座・助教
佐々木 信人 岩手医科大学医学部 内科学講座・助教
畠山 明 東北労災病院 リウマチ膠原病科・部長

研究要旨

混合性結合組織病（MCTD）に合併する肺高血圧症（PH）は、MCTD患者の死因の重要な位置を占めるが、その発症機序はいまだ明らかになっていない。PH発症に至る初期変化として肺微小血管内皮細胞傷害が示されているため、本研究では肺微小血管内皮細胞を傷害する要因として、血清因子の一つである自己抗体、特に抗内皮細胞抗体（anti-endothelial cell antibody, AECA）に焦点をあて、研究を行った。肺微小血管内皮細胞のcDNAライブラリーを構築してSEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning)により抗原候補蛋白質の探索をおこなった。

A. 研究目的

混合性結合組織病（MCTD）患者では、他の膠原病患者に比べ高率に発症する肺高血圧症（PH）が死因の重要な位置を占めているが、その発症要因は不明である。本研究の目的はMCTDにおけるPHの発症機序の解明である。本研究室での病理組織学的検討から、臨床的にはPHを示していないMCTD患者でも肺の小血管を中心に血管内皮細胞傷害に起因する病変が発生していることが明らかになっており、小血管の傷害から徐々に進行してPH発症に至ることが示唆されている。また、MCTD患者血清が肺微小血管内皮細胞に対して、高い反応性を示すことも明らかになっている。本研究において、我々は、MCTD患者血清中の抗内皮細胞抗体（anti-endothelial cell antibody, AECA）による肺微小血管内皮細胞の傷害や機能変化がPH発症の原因であると考え、MCTD患者血清中のAECAについて解析した。

B. 研究方法

肺微小血管内皮細胞（HMVEC-L）から調製したRNAからcDNAを合成し、ファージに組込み、cDNAライブラリーを構築した。プレート上に網羅的に組換え蛋白質を発現させ、6名のMCTD患者血清を混合した血清と反応する蛋白質をスクリーニングした

（SEREX、serological identification of antigens by recombinant expression cloning）。得られた候補について、組換え蛋白質を用いたウエスタンブロットで個々の患者の血清の反応性の確認を行った。

（倫理面への配慮）

採血にあたっては、提供者に使用目的やデータ管理について説明し、同意の得られた場合にのみサンプルの提供をうけた。提供者のデータ管理については研究中と研究終了後を問わずに厳密に行い、解析時や発表時には検体番号で扱い、個人名が第三者に知られないように配慮した。

C. 研究結果

ライブラリーを用いたイムノスクリーニングにより（図1）、 3×10^5 スクリーニングした時点で細胞膜にも局在する蛋白質や細胞外蛋白質が19個抗原候補としてあがった。RT-PCRでヒト臍帯静脈血管内皮細胞に比べHMVEC-Lで高く発現していることが確認でき（図2）、スクリーニングの際にも高い反応を示した抗原について患者個々人の血清で反応性を調べたものの、MCTD患者1名でのみ高い反応性が認められた（図3）。

D. 考察

SEREXにより明らかになった抗原蛋白質に細胞外蛋白質などの2Dウエスタンでは検出の難しい蛋白質も含まれていたことから、SEREXの長所が生かされていることが確認できた。抗原候補蛋白質の中にはRNAスプライシングに関連する蛋白質も含まれていた。但し、スクリーニングの結果得られた抗原にUIRNPが含まれなかったため、さらに多くのクローンをスクリーニングする必要があると考えられた。

E. 結論

本研究によりAECAの抗原候補蛋白質を得ることができた。さらなるAECAの抗原探索を行うとともに、これらの蛋白質について詳細に解析することで、PH発症機序の一端の解明につながり新たな治療法や診断法の可能性が開けると期待する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Yamashita M, Iwama N, Date F, Chiba R, Ebina M, Miki H, Yamauchi K, Sawai T, Nose M, Sato S, Takahashi T, Ono M: Characterization of idiopathic diffuse alveolar damage. *Hum Pathol.* 40: 542-551. 2009
- 2) Yoshida W, Uzuki M, Nishida J, Shimamura T, Sawai T: Examination of *in vivo* gelatinolytic activity in rheumatoid arthritis synovial tissue using newly developed *in situ* zymography and image analyzer. *Clin Exp Rheumatol.* 27: 587-593. 2009
- 3) Sato Y, Kurose A, Ogawa A, Ogasawara K, Traganos F, Darzynkiewicz Z and Sawai T: Diversity of DNA damage response of astrocytes and glioblastoma cell lines with various p53 status to treatment with etoposide and temozolomide. *Cancer Biol Ther.* 8: 1-6(2009)
- 4) 鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志：MCTD患者に合併する肺高血圧症の病変とその発症機序の解析。自己抗体と自己免疫2009：31-35. 2009
- 5) 佐々木信人、鎌滝章央、澤井高志：全身性強皮症および類似疾患、肺病理。日本胸部臨床。69: 224-233. 2010

2. 学会発表

- 1) 澤井高志：膠原病にみられる肺高血圧症の病理学的特徴－混合性結合組織病（MCTD）の解析を中心に－。第24回日本臨床リウマチ学会、盛岡、2009年11月
- 2) 鎌滝章央、佐々木信人、畠山 明、澤井高志：混合性結合組織病患者における抗内皮細胞抗体の抗原の探索。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会、東京、2009年4月
- 3) 佐々木信人、山内広平、井上洋西、二宮由香里、鎌滝章央、澤井高志：アレルギー性肉芽腫性血管炎肺血管障害マウスモデルにおけるモンテルカストによる炎症の抑制。第53回日本リウマチ学会総会・学術集会、東京、2009年4月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

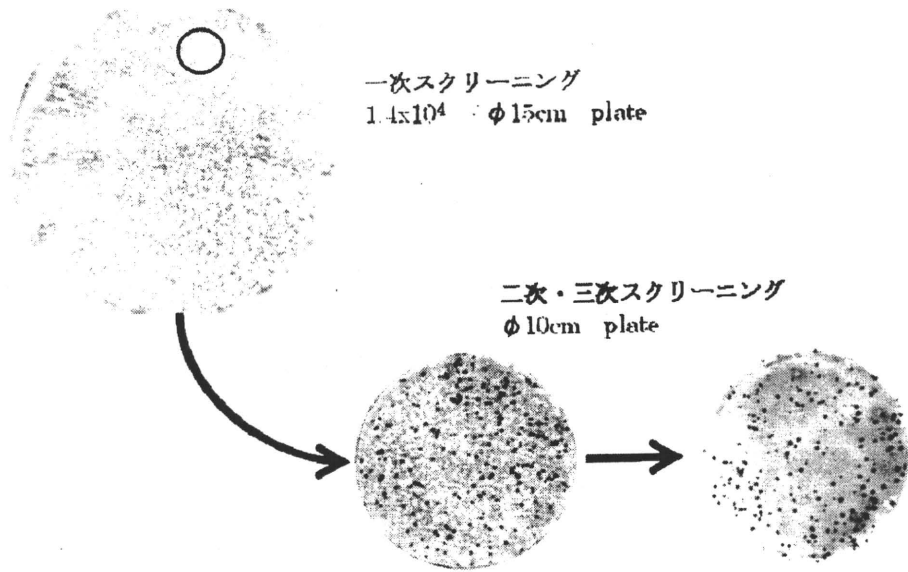


図1. SEREXの概要

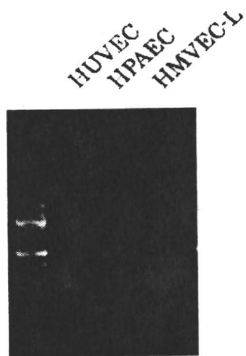


図2. 抗原候補の様々な内皮細胞での発現

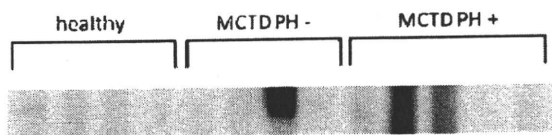
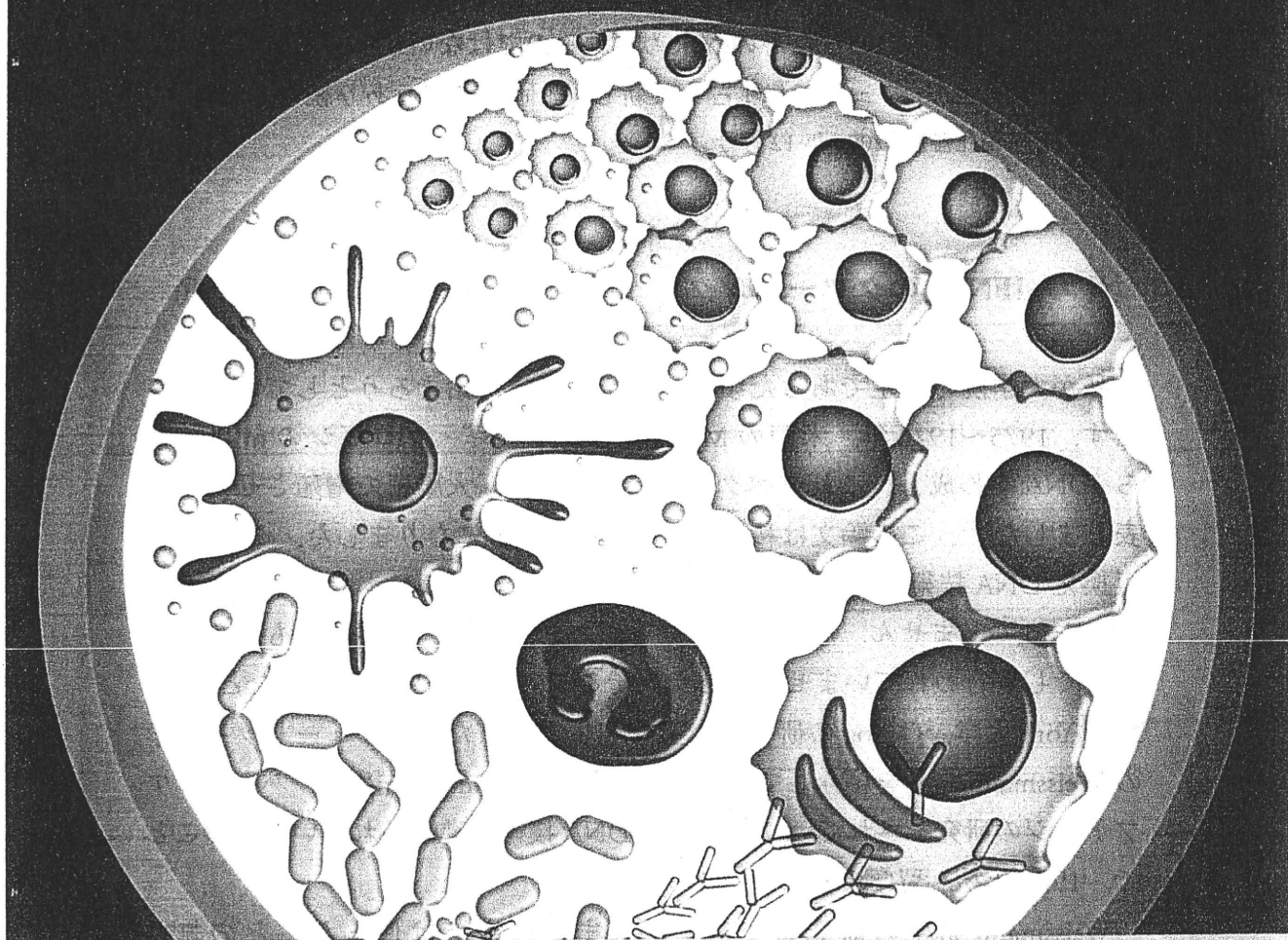


図3. 抗原候補の組換え蛋白質の患者血清との反応性

サイトカインハンティング

—先頭を駆け抜けた日本人研究者たち—

日本インターフェロン・サイトカイン学会 [編]



今だから語れる生命科学の歴史

サイトカインハンティングの歴史を辿ってみると、それはバイオ・免疫学の発展の歴史でもある。サイトカインハンティングを通じてバイオ技術が発展し、その先頭を駆け抜けた研究者たちは、また、免疫学の今の繁栄に貢献した研究者たちでもあった。

京都大学学術出版会

は後者のメカニズムを巧妙に利用する仕組みが判明しており、この細胞による適応免疫系の増強に深く関与している。

実際、過度の IFN 産生、シグナル伝達が免疫寛容の破綻につながる、という報告が最近とくに注目されている。しかしながら、IFN と自己免疫、となるとそのメカニズムは依然としてよく解明されてはいない。IFN を通じて免疫寛容の仕組みがどこまで明らかになるのか、興味深いところであるが、新しいコンセプトといったものが求められるのではないかと思われる。このように、インターフェロンは「古くて新しい」研究課題であり続けている。

初出：『分子消化器病』2006年12月号

4▶▶▶IFN- α のクローニング

長田 重一

私が大学院の学生であった頃は、遺伝子工学が始まろうとしていた時期です。1975～1976年、米国の Maniatis らがウサギ・グロビンの mRNA から cDNA を作成し、これをベクターに組み込み、大腸菌で増殖させたと発表しました^{1,2)}。この論文は私にとって大きな転機になりました。この技術、組換え DNA 技術を習いたいと思いましたが、当時の日本ではどの研究室でもやっていません。危険な技術だと思われていて、世界的にも限られた場所でしか行われていませんでした。そこで、上代先生に相談したところ、New York 大学、Ochoa の研究室で上代先生と同僚だったチューリッヒ大学の Weissmann 先生を紹介して下さいました。Weissmann 先生は、バクテリアファージの研究をされていて、組換え DNA 技術も進められているとのことで、1977 年秋、留学することになりました。

Weissmann 先生の研究室では、これまで日本では使ったことの無い disposable の製品 (Eppendorf tube, disposable pipette, tissue culture dish) がふんだんに用いられ、信じられないことばかりでした。まずは Q β ファージに人工的に変異を導入する実験から始めました。研究室では谷口維紹氏 (現東京大学医学部教授) がおられ、実験の手技など教えてもらいました。Weissmann 先生は 8 時過ぎに研究室に現れて毎日「What's new?」と聞いて回ります。何らかの新しいデータを用意しておかなければなりません。その圧力は強いも

のでしたが、彼との Discussion は楽しく、大変勉強になりました。

1978 年からヒトのインターフェロン (IFN) の cDNA を単離する研究を始めました。最初は谷口維紹氏がこのプロジェクトを担当しましたが、彼が 1978 年年末帰国することになり、私が担当することになりました。(谷口維紹氏は日本の癌研究所で IFN cDNA のクローニングを続けられました。) センダイウイルスを感染させたヒト白血球から cDNA ライブラリを作成し、その 2 万個のクローンの中から IFN cDNA を探し出すこととなります。25 年も前、IFN のアミノ酸配列が決まっていない時期であり、発現クローニング法もありません。2 万個のクローンを 100 個ずつ 200 個のプールにわけ、その plasmid DNA に IFN 産生細胞から調製した mRNA をハイブリダイズ、ハイブリダイズした mRNA をアフリカツメガエルの卵母細胞に注射、それを 2 日間培養した後、その培養液中に IFN があるかどうかバイオアッセイする。結果が出るまでに 10 日かかる気の遠くなるような作業です。IFN は非常に量が少なくて何万個のクローンの中に 1 つ位しかないと思われていました。しかしアッセイを繰り返していくうちに、100 個に 1 個くらいのクローンは陽性になりました。Weissmann 先生は「一体これは何だ。Assay が全く動いていないではないか」と怒りましたが、こちらはそんなことは考えられない、と反論しました。すると、Weissmann 先生「君が陽性と思う大腸菌の溶解物に IFN 活性があるかどうかを調べてみる」と言い出しました。そこで大腸菌から抽出液を調製、調べてみたところ、なんと IFN の活性が見つかったのです。大腸菌がヒトの IFN を作っていたのです。1979 年 12 月 24 日、研究室には一緒に仕事をしていた平秀晴氏 (現岩手大学教授)、ボストンから Summer student ととして研究室に来ていた Michel Streuli の 3 人だけ、抱き合いました。Weissmann 先生はクリスマス休暇でスキーに行っていましたが、その日の正午に研究室に電話があり、「大腸菌が IFN をつくっている」という私の言葉を聞くと「Fantastic!」と一言。3 時間後にはアルプスから研究室に戻ってきていました。それから、一週間、大腸菌で発現されているたんぱく質が実際に IFN であることを確認し、1980 年の 1 月 3 日 Weissmann 先生はマイアミでの conference に向かわれました。そして、スイスへの帰国の途中、急遽、1 月 16 日ボストンで IFN 遺伝子単離に関する講演、記者会見をされました。その内容は次の日の *New York Times* の 1 面に紹介されました。



図2 Charles Weissmann 博士

1月17日に Weissmann 先生が研究室に戻ってきた時には、すでに投稿すべき論文がほぼ書き上がっていました。タイプライター（当時、ワープロはない）を購入し、空港の待合室などで書かれたたさそうです。Weissmann 先生はこの論文をイギリス *Nature* の編集部に持参、数週間後レフリーから「この論文は *Nature* の front section に発表すべき論文である。」との、とてもうれしい、これまでの苦労が一掃されるコメントをもらい、3月27日号の *Nature* に掲載されました³⁾。

IFN には抗癌作用が存在すると報告されていたことから、*Time* 誌などマスコミに大きく取り上げられました。何千もの患者さんから「分けてほしい」という手紙や電話でのリクエストが飛び込んできました。Weissmann 先生はこれらに対して、「今はそういう時期ではない。これが薬として使えるようになるまでに何年もかかる」ということを丁寧に説明して返信されました。バイオサイエンスはインパクトが非常に強くて大変面白い分野ですが、それと同時にその成果の発表にあたっては、注意をしないと世間の人達を騙す結果にもなるのだと、強く思いました。ワイスマン研究室ではその後2年間に、大腸菌を使って IFN の大量生産に成功、これを精製、サルを使った実験をし、最終的に臨床試験にまで発展していきました。臨床試験のため、IFN を研究室から搬送しようとした前の晩、Weissmann 先生は私に「明日の朝まで自分がここに倒れていたら、搬送を止めろ」と告げた後、IFN を自らに注射されました。彼の自信と責任感に圧倒されました。このような先生（図2）の研究室で4年間過ごせたということはすばらしい経験であり幸運だったと思います。

初出：『分子消化器病』2008年6月号

Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F

Jun Suzuki^{1,2}, Masato Umeda³, Peter J. Sims⁴ & Shigekazu Nagata^{1,2}

In all animal cells, phospholipids are asymmetrically distributed between the outer and inner leaflets of the plasma membrane¹. This asymmetrical phospholipid distribution is disrupted in various biological systems. For example, when blood platelets are activated, they expose phosphatidylserine (PtdSer) to trigger the clotting system^{2,3}. The PtdSer exposure is believed to be mediated by Ca²⁺-dependent phospholipid scramblases that transport phospholipids bidirectionally^{1,4}, but its molecular mechanism is still unknown. Here we show that TMEM16F (transmembrane protein 16F) is an essential component for the Ca²⁺-dependent exposure of PtdSer on the cell surface. When a mouse B-cell line, Ba/F3, was treated with a Ca²⁺ ionophore under low-Ca²⁺ conditions, it reversibly exposed PtdSer. Using this property, we established a Ba/F3 subline that strongly exposed PtdSer by repetitive fluorescence-activated cell sorting. A complementary DNA library was constructed from the subline, and a cDNA that caused Ba/F3 to expose PtdSer spontaneously was identified by expression cloning. The cDNA encoded a constitutively active mutant of TMEM16F, a protein with eight transmembrane segments⁵. Wild-type TMEM16F was localized on the plasma membrane and conferred Ca²⁺-dependent scrambling of phospholipids. A patient with Scott syndrome^{6,7}, which results from a defect in phospholipid scrambling activity^{8,9}, was found to carry a mutation at a splice-acceptor site of the gene encoding TMEM16F, causing the premature termination of the protein.

When mouse Ba/F3 cells were treated with 1.0 μ M A23187 for 15 min in the presence of 0.5 mM CaCl₂, the cells underwent necrosis or became propidium iodide (PI)-positive. However, when the same treatment was performed in Ca²⁺-free conditions, most of the cells exposed PtdSer and the PI-positive population was low (Fig. 1a). Chelating intracellular Ca²⁺ with bis-(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetra-acetic acid acetoxymethyl ester (BAPTA-AM) blocked the PtdSer exposure (Fig. 1b), indicating that the process required the mobilization of intracellular calcium. This PtdSer exposure was reversible: treatment of the PtdSer-exposing cells with BAPTA-AM at 37 °C for 5 min (Fig. 1c) or culturing them in Ca²⁺-free medium at 37 °C for 12 h (data not shown) eliminated the PtdSer from the cell surface. These results suggest that under low-Ca²⁺ conditions, A23187 mobilized the intracellular Ca²⁺, which activated a phospholipid scramblase to expose PtdSer. When the intracellular Ca²⁺ concentration was lowered, the phospholipid scramblase lost activity, and flippases returned the PtdSer to the inner leaflet.

To characterize the PtdSer-exposure process, we used its reversible nature under low-Ca²⁺ conditions to establish a cell line that overexposed PtdSer. Ba/F3 cells were treated with 1.0 μ M A23187 in the absence of calcium, and subjected to fluorescence-activated cell sorting (FACS) based on PtdSer exposure. A population (0.5–5%) that showed intense staining with Annexin V was collected, cultured for 15 h in Ca²⁺-free medium, returned to normal medium, and subjected to the next sorting. After this cycle of sorting and expansion had been repeated 12 times, the cells (Ba/F3-PS12) showed roughly 100-fold

higher staining with Annexin V than the original Ba/F3 cells (Ba/F3-PS0) on treatment with 125 nM A23187 (Fig. 1d). The sorting and expansion were repeated another seven times, and the resulting cell line (Ba/F3-PS19) was used for further studies.

There were two possible causes of the strong PtdSer exposure in Ba/F3-PS19 cells. One was the overexpression or overactivation of phospholipid scramblase, and the other was the inactivation of flippase¹⁰ that transports PtdSer from the outer to the inner leaflet of the plasma membrane. To examine which possibility was correct, DsRed-expressing Ba/F3-PS19 cells were fused with green fluorescent protein (GFP)-labelled parental Ba/F3 (Ba/F3-PS0) cells. The PtdSer-exposure response of the hybrid cells to 1.0 μ M A23187 was similar to, or slightly weaker than, that of Ba/F3-PS19 cells (Fig. 1e), suggesting that the phenotype of Ba/F3-PS19 cells was dominant to that of Ba/F3-PS0 cells, and that the phospholipid scramblase was overactivated in Ba/F3-PS19 cells. To identify the gene responsible for the enhanced phospholipid scramblase activity, a cDNA library (9.3 \times 10⁵ clones) was prepared from Ba/F3-PS19 cells, and introduced into the parental Ba/F3 cell line. The stably transformed cells were treated with 125 nM A23187, and a population that stained strongly with Annexin V was sorted (Fig. 1f). At the third cycle of sorting and expansion (Library-Derived (LD)-PS3), about 35% of the cells exposed PtdSer without A23187 treatment, and this cell population (LD-PS4) was characterized.

LD-PS4 cells carried two or three different cDNAs, but the *Tmem16f* cDNA (GenBank accession number NM_175344) was present in two independent experiments, suggesting that TMEM16F caused the PtdSer exposure. The two *Tmem16f* cDNAs identified in the different experiments contained an A-to-G mutation at nucleotide 1226, which caused an aspartic residue to be replaced by glycine at codon 409 (Fig. 2a). TMEM16A, another member of the TMEM16 family, was recently shown to be a Ca²⁺-dependent Cl⁻ channel^{11–13}. However, the Cl⁻ channel activity of TMEM16F was lower than that of TMEM16A¹⁴. To examine the function of TMEM16F, the wild-type and mutant (D409G) forms of TMEM16F were tagged with Flag or monomeric red fluorescent protein (mRFP) at the carboxy terminus, and expressed in Ba/F3 or human 293T cells. Western blotting of the cell lysates with anti-Flag showed broad bands at 125 and 500 kDa on SDS-PAGE (Fig. 2b), suggesting that mouse TMEM16F (calculated molecular mass 106 kDa) is glycosylated and/or aggregated. Observation of the 293T cells expressing TMEM16F-mRFP indicated that TMEM16F is located at the plasma membrane (Fig. 2c).

Annexin V was able to bind to the Ba/F3 cells expressing the D409G mutant, but not the wild-type, TMEM16F (Fig. 2d), suggesting that the mutant TMEM16F-expressing cells constitutively expose PtdSer. This was confirmed by binding of MFG-E8, which specifically binds to PtdSer^{15,16} (Supplementary Fig. 1). Chelating the intracellular Ca²⁺ with BAPTA-AM decreased the exposed PtdSer level in the mutant TMEM16F-expressing cells (Fig. 2d). When cells expressing wild-type TMEM16F were treated with A23187, PtdSer was exposed without a lag time, reaching saturation more quickly than the vector-transformed

¹Department of Medical Chemistry, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. ²Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, Kyoto 606-8501, Japan. ³Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan. ⁴Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Rochester Medical Center, 601 Elmwood Avenue, Rochester, New York 14642, USA.