

全身性強皮症患者におけるダーモスコープを用いた 爪上皮出血点ならびに拡大した爪郭毛細血管ループの観察

研究代表者 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 教授
協力者 室井栄治 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 助教
協力者 原 肇秀 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 助教
協力者 築場広一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 助教
研究分担者 小川文秀 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 講師

研究要旨

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) の血管障害を反映する所見は毛細血管顕微鏡により詳細に観察できることが知られている。しかしながら毛細血管顕微鏡は一般的な装置ではなく、気軽に診察時に用いたり、ベッドサイドで使用することができない。そこで皮膚科診療において一般的で、診察時に手軽に使用できるダーモスコープを代替手段として用いることが近年試みられている。我々はダーモスコープを用いて爪上皮出血点と拡張毛細血管の観察を行った。ダーモスコープを用いることによりこれらの所見の検出感度が増した。所見の出現頻度は第4指が最も高かった。またSScパターンとして「拡張毛細血管が2個以上の指が1本以上」と設定するとSScにおいて感度83.1%、特異度100%であった。以上の結果からダーモスコープは毛細血管顕微鏡の代替手段として有用であると考えた。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) の病態は複雑であるが、血管障害が中心的な役割を果たしていることが想定されている。血管障害を反映する肉眼的な皮膚所見として爪上皮出血点が知られているが、毛細血管顕微鏡を使用すると爪郭部の毛細血管の形態や構築に特徴的な所見が観察されることが知られている¹⁾。それらの所見の中で拡張毛細血管は組織の低酸素状態に対する反応であり、血管壁の障害を示す最初の所見とされ、爪上皮出血点は障害された血管壁より赤血球が漏出し形成される²⁾。こうした所見をもとに原発性 Raynaud 病の鑑別や今後SScが出現する可能性を判断する目的で毛細血管顕

微鏡は有用とされている³⁾。また、SScの早期例や非典型例における診断の感度を上げることも指摘されている⁴⁾。しかし、毛細血管顕微鏡は限られた施設にしかなく、診察時に容易に使用することができない。そこでダーモスコープを用いた爪郭部の毛細血管の観察が近年行われている。ダーモスコープを用いて皮膚表面の乱反射を除くことにより真皮上層の深さまで観察する手法はダーモスコピーと呼ばれ、色素性病変、特に悪性黒色種の鑑別に用いられているが、血管病変の検出目的で毛細血管顕微鏡の代用として有用であると報告されている^{5,6)}。今回、小型軽量なため携帯可能かつ安価な非接触型ダーモスコープである DermLite DL100 を用いて爪上皮出血

点と爪郭部毛細血管の拡張を観察し、肉眼での観察との検出感度の比較、所見を認める頻度が高い指についての検討、SSc と判断する基準の設定、抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性 SSc 患者における罹病期間との関係について検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象患者

対象患者は SSc 83 例（男性 15 例、女性 68 例）であり、年齢は平均 56.3 歳（14～82 歳）であった。病型別では diffuse cutaneous SSc (dSSc) が 21 例、limited cutaneous SSc (lSSc) が 62 例であった。自己抗体として抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性例が 16 例、抗セントロメア抗体陽性例が 40 例、抗 RNA ポリメラーゼ抗体陽性例が 6 例、抗 U1RNP 抗体陽性例が 1 例、抗 U3RNA 抗体陽性例が 2 例、抗 Th/To 抗体陽性例が 1 例、抗 NOR90 抗体陽性例が 1 例、抗核抗体が陽性であるものの特異抗体不明な例が 5 例、抗核抗体陰性患者が 11 例であった。対照群として健常人と湿疹・皮膚炎群の患者合計 68 例を用いた。

2) ダーモスコピー

3Gen 製 DermLite DL100 を用いて全手指（10 本）の爪上皮出血点と爪郭部の拡張毛細血管数を調べた。6 個以上は 6 と計数した。

（倫理面への配慮）

ダーモスコピーは拡大鏡による観察と同様に非侵襲的で数分以内に終了する検査であり、研究対象者に金銭的な負担を含めた不利益が一切ないため本研究は倫理面の問題がないと判断した。

C. 研究結果

1) 爪上皮出血点と拡張毛細血管の頻度

爪上皮出血点を 1 個でも認めた例は肉眼で観察した場合 SSc 34.9%（dSSc 47.6%、lSSc 30.6%）、対照 0% であった。ダーモスコピーで観察した場合 SSc 66.3%（dSSc 76.2%、lSSc 62.9%）、対照 14.7% であった。検出した総数はダーモスコピーを用いると肉眼で観察した場合と比べて SSc で 3.88 倍（dSSc 3.80 倍、lSSc 3.93 倍）であった（表 1）。

拡張毛細血管を 1 個でも認めた例は肉眼で観察した場合 SSc 28.9%（dSSc 23.8%、lSSc 30.6%）、対照 0% であった。ダーモスコピーで観察した場合 SSc 90.4%（dSSc 85.7%、lSSc 91.9%）、対照 12.9% であった。検出した総数はダーモスコピーを用いると肉眼で観察した場合と比べて SSc で 8.92 倍（dSSc 8.63 倍、lSSc 9.05 倍）であった（表 2）。

2) 変化を認めた指の分布と本数

肉眼で爪上皮出血点を 1 個でも認めた SSc 患者において右第 4 指で検出率が最も高く、その割合は SSc 55.2%（dSSc 50.0%、lSSc 57.9%）であった（表 3）。ダーモスコピーで観察した場合、SSc 全体では左第 4 指が 49.1% と最も高く、dSSc では右第 3、4 指が 56.3% と最も高く、lSSc では右第 5 指が 53.8% と最も高く、対照では右第 5 指が 40.0% と最も高かった（表 4）。また爪上皮出血点を認めた指の数の平均はダーモスコピーで観察した場合 SSc、dSSc、lSSc、対照それぞれ 3.5 本、3.6 本、3.5 本、1.2 本であった（表 4）。

肉眼で拡張毛細血管を 1 個でも認めた SSc 患者において右第 4 指で 70.8% と検出率が最も高く、dSSc では両側第 4 指が 80.0% と最も高く、lSSc では右第 4 指が 68.4% と最も高かった（表 5）。ダーモスコピーで観察した場合、SSc 全体では左第 4 指が

77.3%と最も高く、dSScでは左第5指が94.4%と最も高く、ISScでは左第4指が75.4%と最も高く、対照では右第4指が33.3%と最も高かった(表6)。また拡張毛細血管を認めた指の数の平均はダーモスコピーで観察した場合SSc、dSSc、ISSc、対照それぞれ5.3本、6.6本、4.9本、1.1本であった(表6)。

3) 抗トポイソメラーゼI抗体陽性患者における爪上皮出血点、拡張毛細血管の数と罹病期間との関連
ダーモスコピーで観察された爪上皮出血点の数、拡張毛細血管の数は罹病期間と負の相関を認めた($r=-0.537$ 、 $p<0.05$; $r=-0.728$ 、 $p<0.01$) (図1)。

D. 考察

SSc患者における毛細血管顕微鏡所見として毛細血管構築の乱れ、拡張毛細血管、微小出血、毛細血管の減少、血管新生といった所見が知られている²⁾。その中でも拡張毛細血管は最も重要な所見と考えられている⁷⁾。これらの所見のうち毛細血管の数の減少は毛細血管顕微鏡に比べてダーモスコピーでは判断が難しい場合もある⁵⁾。また血管新生を反映する蛇行毛細血管、分枝状毛細血管もダーモスコピーで陰性と捉えやすい⁶⁾。これらのことから今回我々は爪上皮出血点と拡張毛細血管の所見にしばって短時間でかつ簡便にスクリーニングできる方法としてのダーモスコピーの有用性を検討した。

肉眼での観察と比較してダーモスコピーを用いることで爪上皮出血点、拡張毛細血管ともに検出感度が上がった。拡張毛細血管の検出数が約9倍になることから、特に拡張毛細血管の検出に威力を発揮すると考えた。

爪上皮出血点は肉眼的観察において第4指で検出頻度が高いことが知られている⁸⁾が、我々の検討でも同様の結果であった。ただしダーモスコピーでは

第4指のみならず第3指、第5指でも検出頻度が高かったことから全指において観察することが必要であると考えた。

今回の我々の検討でSScパターンとして「拡張毛細血管が2個以上の指が1本以上」と設定することにより感度83.1%、特異度100%であった。これまでに行われた同様の検討ではscleroderma patternを「拡張毛細血管、出血、中等度から高度の毛細血管の減少、分枝状ないし蛇行状毛細血管のうち2項目以上を認めるもの」としてダーモスコピーで検討した報告では26例のSSc患者において感度76.9%、特異度90.9%であった³⁾。またscleroderma-dermatomyositis patternを「拡張毛細血管、毛細血管減少、毛細血管構築の乱れ、血管新生、出血のうち2項目以上を2本以上に認めるもの」としてダーモスコピーで検討した報告では27例のSSc患者において感度70.4%、特異度100%であった⁹⁾。「拡張毛細血管が2個以上の指が1本以上」という我々の条件はこれまでの報告と比較して感度、特異度ともに遜色なく、より簡便であることから推奨できるものと考えた。

爪上皮出血点や拡張毛細血管はSScの経過中に変化していくことが知られているため検討したところ爪上皮出血点、拡張毛細血管の数は抗トポイソメラーゼI抗体陽性患者において罹病期間と逆相関を示した。これは抗トポイソメラーゼI抗体陽性SScでは血管障害が短期間に進行して発症数年以内の早期に拡張毛細血管や出血点がみられないlate patternにいたるとする報告と矛盾しない¹⁾。

E. 結論

簡便かつ安価で肉眼での観察よりも精度が上がるダーモスコピーはSSc診療において有用である。

F. 文献

1. Cutolo M, Pizzorni C, Tuccio M, Burrioni A, Cravotto C, Basso M, et al. Nailfold videocapillaroscopic patterns and serum autoantibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(6): 719-26.
2. Cutolo M, Pizzorni C, Secchi ME, Sulli A. Capillaroscopy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22(6): 1093-108.
3. Beltran E, Toll A, Pros A, Carbonell J, Pujol RM. Assessment of nailfold capillaroscopy by x 30 digital epiluminescence (dermoscopy) in patients with Raynaud phenomenon. *Br J Dermatol* 2007; 156(5): 892-8.
4. Lonzetti LS, Joyal F, Raynauld JP, Roussin A, Goulet JR, Rich E, et al. Updating the American College of Rheumatology preliminary classification criteria for systemic sclerosis: addition of severe nailfold capillaroscopy abnormalities markedly increases the sensitivity for limited scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001; 44(3): 735-6.
5. Baron M, Bell M, Bookman A, Buchignani M, Dunne J, Hudson M, et al. Office capillaroscopy in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2007; 26(8): 1268-74.
6. Bauersachs RM, Lossner F. The poor man's capillary microscope. A novel technique for the assessment of capillary morphology. *Ann Rheum Dis* 1997; 56(7): 435-7.
7. Carpentier PH, Maricq HR. Microvasculature in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1990; 16(1): 75-91.
8. Sato S, Takehara K, Soma Y, Tsuchida T, Ishibashi Y. Diagnostic significance of nailfold bleeding in scleroderma spectrum disorders. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28(2 Pt 1): 198-203.
9. Bergman R, Sharony L, Schapira D, Nahir MA, Balbir-Gurman A. The handheld dermatoscope as a nail-fold capillaroscopic instrument. *Arch Dermatol* 2003; 139(8): 1027-30.

G. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 肉眼とダーモスコープでの検出した爪上皮出血点の比較

診断 (例数)	爪上皮出血点				
	人数 (%)		個数		
	肉眼	DermLite DL 100	肉眼	DermLite DL 100	検出数の増加
SSc (83例)	29 (34.9)	55 (66.3)	138	536	x3.88
dSSc (21例)	10 (47.6)	16 (76.2)	44	167	x3.80
ISSc (62例)	19 (30.6)	39 (62.9)	94	369	x3.93
対照 (68例)	0 (0)	10 (14.7)	0	18	

表2. 肉眼とダーモスコープでの検出した拡張毛細血管の比較

診断 (例数)	爪上皮出血点				
	人数 (%)		個数		
	肉眼	DermLite DL 100	肉眼	DermLite DL 100	検出数の増加
SSc (83例)	24 (28.9)	75 (90.4)	200	1783	x8.92
dSSc (21例)	5 (23.8)	18 (85.7)	64	552	x8.63
ISSc (62例)	19 (30.6)	57 (91.9)	136	1231	x9.05
対照 (68例)	0 (0)	9 (12.9)	0	10	

表3. 肉眼で検出した爪上皮出血点の分布

診断 (例数)	右手指 (%)					左手指 (%)					爪上皮出血点を認めた指の数(本)
	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	
SSc (29例)	34.5%	55.2%	13.8%	24.1%	10.3%	0.0%	0.0%	31.0%	31.0%	31.0%	2.3
dSSc (10例)	20.0%	50.0%	20.0%	40.0%	20.0%	10.0%	0.0%	30.0%	20.0%	20.0%	2.3
ISSc (19例)	42.1%	57.9%	10.5%	15.8%	5.3%	0.0%	0.0%	31.6%	36.8%	36.8%	2.4
対照 (0例)											

表4. ダーモスコープで検出した爪上皮出血点の分布

診断 (例数)	右手指 (%)					左手指 (%)					爪上皮出血点を認めた指の数(本)
	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	
SSc (55例)	43.6%	43.6%	41.8%	30.9%	16.4%	20.0%	18.2%	41.8%	49.1%	47.3%	3.5
dSSc (16例)	18.8%	56.3%	56.3%	31.3%	25.0%	18.8%	18.8%	37.5%	50.0%	43.8%	3.6
ISSc (39例)	53.8%	38.5%	35.9%	30.8%	12.8%	20.5%	17.9%	43.6%	48.7%	48.7%	3.5
対照 (10例)	40.0%	10.0%	0.0%	10.0%	10.0%	10.0%	20.0%	0.0%	10.0%	10.0%	1.2

表5. 肉眼で検出した拡張毛細血管の分布

診断 (例数)	右手指 (%)					左手指 (%)					拡張毛細血管を認めた指の数(本)
	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	
SSc (24例)	50.0%	70.8%	25.0%	20.8%	8.3%	4.2%	16.7%	41.7%	50.0%	16.7%	3.0
dSSc (5例)	40.0%	80.0%	20.0%	20.0%	20.0%	0.0%	40.0%	60.0%	80.0%	20.0%	3.8
ISSc (19例)	52.6%	68.4%	26.3%	21.1%	5.3%	5.3%	10.5%	36.8%	42.1%	15.8%	2.8
対照 (0例)											1.2

表 6. ダーモスコープで検出した拡張毛細血管の分布

診断 (例数)	右手指 (%)					左手指 (%)					拡張毛細血管を認めた指の数(本)
	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	
SSc (75 例)	58.7%	64.0%	58.7%	37.3%	26.7%	29.3%	42.7%	65.3%	77.3%	68.0%	5.3
dSSc (18 例)	66.7%	66.7%	77.8%	44.4%	55.6%	33.3%	55.6%	77.8%	83.3%	94.4%	6.6
ISSc (57 例)	56.1%	63.2%	52.6%	35.1%	17.5%	28.1%	38.6%	61.4%	75.4%	59.6%	4.9
対照 (9 例)	22.2%	33.3%	11.1%	11.1%	0.0%	11.1%	11.1%	0.0%	0.0%	11.1%	1.1

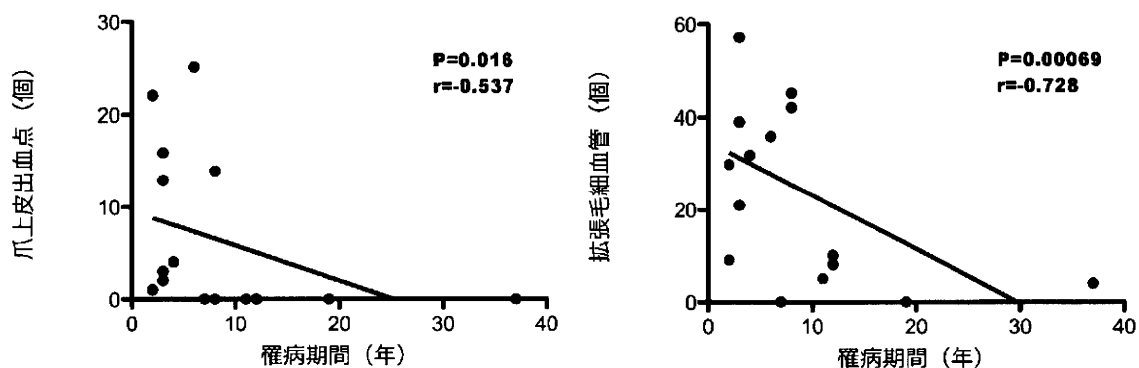


図 1：抗トポイソメラーゼ I 抗体陽性 SSc 患者における爪上皮出血点数と拡張毛細血管数の罹病期間との相関

Tight-skin (TSK) マウスおよびブレオマイシン (BLM) 誘発強皮症 (SSc) マウスモデルにおけるラパマイシンの効果に関する検討

研究代表者 佐藤伸一 東京大学大学院医学系研究科 教授
協力者 吉崎 歩 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 医員
協力者 築場広一 東京慈恵会医科大学皮膚科学 助教
研究分担者 浅野善英 東京大学医学部附属病院皮膚・皮膚光線レーザー科 助教
研究分担者 小川文秀 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 講師

研究要旨

ラパマイシンは放線菌由来のマクロライドであり、近年、移植後の拒絶反応抑制に優れた効果を示すことから、新たな免疫抑制薬として注目を集めている薬剤である。今回我々は SSc のモデルマウスとして広く知られている TSK マウスと BLM 誘発 SSc モデルマウスにおけるラパマイシンの効果を検討した。ラパマイシンの投与により TSK マウスに認められる皮膚硬化と皮膚へのコラーゲンの蓄積は有意に抑制され、同時に皮膚への T 細胞浸潤も抑制された。TSK マウス皮膚で認められるサイトカイン産生の亢進もラパマイシンの投与により有意に抑制された。TSK マウス皮膚線維芽細胞を用いた検討では、IL-4 の刺激によって亢進した増殖能とコラーゲン産生量は、ラパマイシンによって有意に抑制された。さらに、TSK マウス皮膚線維芽細胞において、ラパマイシンの作用する標的分子である mammalian target of rapamycin の有意な発現亢進を認めた。TSK マウスは自己抗体の産生増加を認めることが知られているが、ラパマイシンの投与はこの自己免疫異常を抑制した。BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいても同様に、ラパマイシンは皮膚硬化、肺線維化、皮膚および肺への炎症細胞浸潤、皮膚、肺および血清中におけるサイトカイン産生亢進を有意に抑制した。このように、二つの異なる SSc モデルマウスにおいて、線維化を抑制したラパマイシンは、既に様々な病態でヒトに対して優れた効果を上げており、SSc の新たな治療薬となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は免疫学的異常を背景に、皮膚硬化と内臓諸臓器の線維化を主徴とする疾患で、病因は未だ明らかにされていない¹⁾。SSc 患者皮膚には CD4⁺ T 細胞の浸潤を認め、サイトカイン産生を介して線維化に寄与しているものと考えられている²⁾。Th2 サイトカインのひとつであ

るインターロイキン (interleukin; IL)-4 や Th17 サイトカインのひとつである IL-17 は SSc 患者由来線維芽細胞を刺激し膠原線維の産生を増強する³⁻⁷⁾。さらに SSc 患者血清中の IL-4 と IL-17 の増加が報告されており、Th2、Th17 サイトカインは SSc の皮膚硬化および肺線維化に密接に関与していると考えられている^{3-6,8)}。

TSK マウスは著名な皮膚線維化を呈する突然変異種として継代されたマウスであり、SSc の動物モデルとして広く認知されている⁹⁾。別のSScモデルであるBLM誘発SScモデルも同様に皮膚硬化、肺線維症、サイトカイン産生、SSc特異的自己抗体産生を認め、SScをよく模倣したモデルと考えられている^{10,11)}。加えて、SSc患者と同様に皮膚および肺における炎症細胞浸潤を認める¹⁰⁾。これらのマウスモデルはSSc患者と同様に、その発症機序として免疫学的な異常が存在することが示されているが、治療法として確立されたものは未だない。

ラパマイシンはマクロライド系の免疫抑制薬であり、すぐれた免疫抑制効果を示すことから、カルシニューリン阻害薬であるシクロスポリンやタクロリムスに次ぐ新たな免疫抑制薬として近年注目を集めている^{12,13)}。ラパマイシンの特徴として、カルシニューリン阻害薬と比較して腎毒性の発現が少なく、がん細胞の増殖を抑制する効果を持ち、サイトメガロ感染のリスクを減らすことが上げられる^{14,15)}。ラパマイシンが免疫抑制作用を示す機序としては、ラパマイシンがFK506 binding protein 12へ結合することにより複合体を形成し、その複合体が mammalian target of rapamycin (mTOR) の機能を抑制することにより mTOR の下流へのシグナル伝達を阻害し、細胞増殖、サイトカイン産生を抑制することが示されている^{16,17)}。同時に mTOR の阻害は線維芽細胞からのコラーゲン産生を抑制することが示唆されている^{18,19)}。

今回の検討では、ラパマイシンの線維化に対する効果を TSK マウスおよび BLM 誘発 SSc モデルマウスを用いて検討した。

B. 研究方法

1) マウス

本研究では C57BL/6 マウスを背景とする TSK マウスと C57BL/6 マウスを用いて作成した BLM 誘発 SSc モデルマウスを使用した。本研究には6週齢のマウスを用いた。BLM 誘発 SSc モデルマウスは BLM (Nippon Kayaku Co. Ltd., Tokyo) をリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) に 1 mg/ml となるように溶解し、フィルター濾過後、剃毛したそれぞれのマウスの背部皮膚へ4週間にわたり27ゲージの注射針で 300 μ g を連日皮下投与することで作成した¹¹⁾。コントロールとして PBS のみを BLM と同様の方法でそれぞれのマウスに投与した。以下の解析にはそれぞれ最低10匹のマウスを用いた。いずれの研究も長崎大学動物実験規則を遵守し行った。

2) ラパマイシンの投与

ラパマイシン (Sigma, St Louis, MO) を 0.2% sodium carboxymethyl cellulose と 0.25% polysorbate 80 による溶媒に溶解し、1.5 mg/kg/day の容量で4週間にわたりそれぞれのマウスへ腹腔内投与した。コントロール群には溶媒のみを投与した。

3) 組織病理学的検討

4週間のラパマイシンの投与が終了した TSK マウスから背部皮膚を、BLM 誘発 SSc モデルマウスからは背部皮膚と肺を採取し、一部をパラフィン包埋し、6 μ m 切片を作製した。ヘマトキシリン & エオジン染色とヴァンギーソン染色を行い、皮膚に関しては一検体中10箇所をランダムに選び、表皮、真皮、皮下結合組織層の厚さを測定した。肺に関しては左中葉のランダムに選ばれた部分を100倍の拡大率で観察し、線維化の程度を Aschcroft らの提唱するスコア法で評価した²⁰⁾。トルイジンブルー染色を

行い、肥満細胞の数を 400 倍の拡大率で一検体中 10 箇所をランダムに選び測定した。抗マウス F4/80 抗体 (Serotec Inc., Oxford, UK)、抗マウス CD3 抗体 (BD PharMingen, San Diego, CA, USA)、抗マウス B220 抗体 (BD PharMingen) を用いて免疫染色を行い、それぞれマクロファージ、T 細胞、B 細胞の数を 400 倍の拡大率で一検体中 10 箇所をランダムに選び測定した。以上の測定および検討はマウス病理に精通した 2 人の検者が盲検し、結果を平均した。

4) 皮膚および肺組織中のヒドロキシプロリン測定

ヒドロキシプロリンはコラーゲン中に特異的に高率に含まれるアミノ酸で、その量はコラーゲン量を反映する。従って、皮膚および肺における線維化を評価するため、それぞれ Matsushita ら²¹⁾、Schrier ら²²⁾の方法に準じ組織中のヒドロキシプロリン量を測定した。

5) 気管支肺胞洗浄液 (BAL) の採取

4 週間のラパマイシン投与後に、BLM 誘発 SSc モデルマウスより得られた肺を生食 1 回 1 ml で軽くマッサージしながら洗浄して洗浄液を回収した。同様の操作を 3 回繰り返した。BAL の回収量は 1 検体当たり 2.5 ml であった。回収した BAL は細胞数の測定と細胞分画の評価に用いた。細胞数は Burger-Turk 算定板を用い算定した。細胞分画の評価はまず、細胞沈殿法により細胞標本を作成し、May-Giemsa 染色と、マクロファージに対して抗マウス F4/80 抗体 (Serotec Inc.)、T 細胞に対して抗マウス CD3 抗体 (BD PharMingen)、B 細胞に対して抗マウス B220 抗体 (BD PharMingen) を用いて免疫染色を行い検討した。細胞分画は任意に選定した視野で、計 200 個の細胞を算定して検討した。好中球の同定は形態学的に行った。

6) 血清中のサイトカインの検討

ラパマイシンの投与が終了したマウスより血清を採取し、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、Interferon (IFN)- γ 、tumor growth factor (TGF)- β 1、および tumor necrosis factor (TNF)- α (Biosource International Inc., Camarillo, CA, USA) の濃度を ELISA キットにより測定した。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

7) 皮膚および肺におけるサイトカインの発現量の検討

各マウス皮膚および肺より RNeasy spin column (Qiagen Inc., Crawley, UK) を用いて mRNA を抽出し、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ 、TGF- β 1、TNF- α の発現量を real time RT-PCR にて測定した。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

8) TSK マウス皮膚線維芽細胞に対するラパマイシンの効果における

TSK マウス背部皮膚より線維芽細胞を抽出、培養した²¹⁾。線維芽細胞を 12 時間 serum free とした後、ラパマイシンの存在下に IL-4 (10 ng/ml; R&D systems, Minneapolis, MN) で 24 時間刺激した。刺激後に mRNA を抽出し、COL1A2 と TGF- β 1 の発現量を real time RT-PCR にて定量した。Proliferation assay では刺激後に BrdU (10 μ M) を加え、24 時間培養後 ELISA にて BrdU の取り込みを評価することで検討した。

また、TSK マウス皮膚線維芽細胞における mTOR の発現を real time PCR および western blotting 法により検討した。

9) γ グロブリンの検討

ラパマイシンの投与が終了した TSK マウスより血清を採取し、血清 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、

IgG3、IgA の濃度を ELISA キットにて検討した (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA)。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

10) 自己抗体の検討

血清中の自己抗体を、MBL 社製 (Medical & Biological Laboratories Co., Nagoya) のヒト抗 topo I 抗体測定 ELISA キットを用いて抗体価を測定した。このとき 2 次抗体として抗マウス Ig 抗体を使用した。それぞれの検体は duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

11) 統計学的検討

2 群間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。p<0.05 を有意とした。

C. 研究結果

TSK マウスでは野生型マウスと比べて皮下結合組織層の肥厚を認めた (図 1)。4 週間の観察において、時間と共に皮下結合組織層の厚みが増すことが確認された。ラパマイシンはこの皮下結合組織層の肥厚を投与後 2 週間目より有意に抑制し (p<0.05)、その抑制効果は 4 週間後に最大となった (p<0.01)。同様に、ラパマイシンはヒドロキシプロリンの産生量も有意に抑制した。(p<0.05)。TSK マウス皮膚には野生型マウスと比べ、多くの T 細胞の浸潤を認めたが、ラパマイシンはこの T 細胞浸潤を抑制した (p<0.05)。

TSK マウス皮膚における IL-4、IL-6、IL-10、IL-17、および TGF- β 1 発現量は野生型マウスに比べ増加していたが (p<0.05)、この増加はラパマイシンによって有意に抑制された (p<0.05; 図 2)。

TSK マウス皮膚線維芽細胞における検討では、IL-4 によって引き起こされた増殖亢進と COL1A2

および TGF- β 1 の発現亢進はラパマイシンによって有意に抑制されていた (p<0.05; 図 3)。また、このラパマイシンの細胞増殖と COL1A2 および TGF- β 1 発現抑制効果は、ラパマイシンの濃度依存的に認められた。線維芽細胞における mTOR の発現は TSK マウスにおいて野生型マウスと比べ有意に亢進していた。

TSK マウスでは過去の報告通り、自己抗体の産生を認めた (図 4)。ラパマイシンはこの自己抗体産生を有意に抑制した (p<0.05)。 γ グロブリンに関しても同様に、TSK マウスでは野生型マウスに比べ産生亢進を認めたが、ラパマイシン投与によって有意に抑制された (p<0.01)。

BLM 誘発 SSc モデルマウスでは PBS 投与群と比べ、有意な皮膚硬化と肺線維化、炎症細胞浸潤を認めた (p<0.05; 図 5)。TSK マウスと同様、ラパマイシンの投与は BLM によって引き起こされたこれらの異常を有意に抑制した。BLM 投与群では PBS 投与群と比べ皮膚、肺、血清におけるサイトカイン産生の亢進を認めたが、ラパマイシンの投与によってこれらは有意に抑制された (p<0.01)。

D. 考案

ラパマイシンは mTOR の阻害薬であり、移植後の免疫抑制や全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、皮膚筋炎などにも使用され優れた効果を認める²³⁻²⁵⁾。SSc に対する有効性も過去に 2 つの論文において報告されているが、いずれも症例数は 1-3 例と少なく、また皮膚硬化などの臨床症状の推移に対する検討であり、ラパマイシンがどのような機序で線維化を抑制するかは未だはっきりとした見解がない^{26,27)}。今回の検討では、ラパマイシンの投与は 2 つの異なる SSc モデルマウスにおいて線維化、サイ

トカイン産生亢進および免疫学的異常を改善した。

SScでは免疫細胞の異常な活性化を認める²⁸⁾。さらに、TSK マウスと BLM 誘発 SSc モデルマウスにおいても認められる、硬化した皮膚や肺で認められる活性化した免疫細胞の浸潤からは、免疫細胞の異常な活性化が線維化を引き起こしていることが示唆される^{29,30)}。今回の研究では、TSK マウスにおいて認められたラパマイシンの線維化抑制効果は T 細胞の浸潤抑制効果と共に認められており、また BLM 誘発 SSc モデルマウスにおけるラパマイシンの線維化抑制効果も、炎症細胞浸潤抑制効果と共に認められた。また、これらの浸潤した炎症細胞からは線維化を引き起こす様々なサイトカインが産生されることが知られている¹⁰⁾。今回の検討では、ラパマイシンはこれらのサイトカインの産生も抑制していた。以上より、ラパマイシンは炎症細胞浸潤とサイトカイン産生を抑制することによって線維化を抑制している可能性が示唆された。

今回の検討では TSK マウスにおいて自己抗体の産生が認められた。TSK マウスでは B 細胞の異常活性化が示されており、B 細胞から産生されるサイトカインが TSK マウスの皮膚硬化を誘導していることが示唆されている³¹⁾。近年、mTOR は B 細胞の異常活性化において大きな役割を果たしていることが報告されている³²⁾。今回の検討ではラパマイシンは TSK マウスの自己抗体産生を抑制したことから、B 細胞の活動を抑制したことが示唆され、この B 細胞の活動抑制が線維化抑制につながった可能性が考えられた。また、mTOR はその下流に S6K や 4E-BP1 を持ち、IL-4 によって刺激された線維芽細胞からは、これらの mTOR-S6K、4E-BP1 シグナルを介することによって種々の線維化に関与するサイトカイン産生を促されることが知られている³³⁾。実際、今

回の検討では TSK マウス線維芽細胞は野生型マウスと比し、mTOR の強発現を認めており、このことは、TSK マウス線維芽細胞の IL-4 に対する反応性の鋭敏さ、ラパマイシンによる抑制効果の高さを説明すると考えられた。以上のことから、ラパマイシンは免疫細胞と線維芽細胞の mTOR を抑制することによって、線維化抑制作用を発揮している可能性が示唆された。

今回の検討から、ラパマイシンは TSK マウスと BLM 誘発 SSc モデルマウスの両モデルにおいて線維化抑制作用を持つことが示唆された。現時点において、SSc に対する有効な治療ははまだ十分に開発されていない。ラパマイシンは既に種々の臓器移植において臨床治験が行われている比較的安全性の高い薬剤であり、SSc に対する新規治療薬の候補の一つとして挙げられると考えられた。

E. 結 論

ラパマイシンは SSc のモデルマウスである TSK マウスおよび BLM 誘発 SSc モデルにおける線維化を改善させることが示唆された。SSc に対する新規治療薬の一つとなりうる可能性が示唆された。

F. 文 献

1. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger Jr TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988; 15: 202-5.
2. Chizzolini C. T lymphocyte and fibroblast interactions: the case of skin involvement in systemic sclerosis and other examples. *Springer Semin Immunopathol*. 1999; 21 (4): 431-50.
3. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y,

- Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *J Rheumatol.* 2006; 33 (2): 275-84.
4. Sato S, Hanakawa H, Hasegawa M, Nagaoka T, Hamaguchi Y, Nishijima C, et al. Levels of interleukin 12, a cytokine of type 1 helper T cells, are elevated in sera from patients with systemic sclerosis.[In Process Citation]. *J Rheumatol.* 2000; 27 (12): 2838-42.
 5. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1998; 25: 308-13.
 6. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4) , IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1997; 24 (2): 328-32.
 7. Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006; 2 (12): 679-85.
 8. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43 (11): 2455-63.
 9. Green MC, Sweet HO, Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol.* 1976; 82 (3): 493-512.
 10. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol.* 2008; 172 (6): 1650-63.
 11. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol.* 1999; 112 (4): 456-62.
 12. Kahan BD. Fifteen years of clinical studies and clinical practice in renal transplantation: reviewing outcomes with de novo use of sirolimus in combination with cyclosporine. *Transplant Proc.* 2008; 40 (10 Suppl): S17-S20.
 13. Antin JH, Kim HT, Cutler C, Ho VT, Lee SJ, Miklos DB, et al. Sirolimus, tacrolimus, and low-dose methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis in mismatched related donor or unrelated donor transplantation. *Blood.* 2003; 102 (5): 1601-5.
 14. Forgacs B, Merhav HJ, Lappin J, Miele L. Successful conversion to rapamycin for calcineurin inhibitor-related neurotoxicity following liver transplantation. *Transplant Proc.* 2005; 37 (4): 1912-4.
 15. Busca A, Locatelli F, Moscato D, Falda M. Sirolimus-related toxicity in stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11 (8): 647-9.
 16. Xu G, Xia J, Hua X, Zhou H, Yu C, Liu Z, et al.

- Activated mammalian target of rapamycin is associated with T regulatory cell insufficiency in nasal polyps. *Respir Res.* 2009; 10: 13.
17. Breslin EM, White PC, Shore AM, Clement M, Brennan P. LY294002 and rapamycin cooperate to inhibit T-cell proliferation. *Br J Pharmacol.* 2005; 144 (6): 791-800.
 18. Bridle KR, Popa C, Morgan ML, Sobbe AL, Clouston AD, Fletcher LM, et al. Rapamycin inhibits hepatic fibrosis in rats by attenuating multiple profibrogenic pathways. *Liver Transpl.* 2009; 15 (10): 1315-24.
 19. Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R. Noncanonical TGF-beta pathways, mTORC1 and Abl, in renal interstitial fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 298 (1): F142-F9.
 20. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol.* 1988; 41 (4): 467-70.
 21. Matsushita Y, Hasegawa M, Matsushita T, Fujimoto M, Horikawa M, Fujita T, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency attenuates the development of skin fibrosis in tight-skin mice. *J Immunol.* 2007; 179 (1): 698-707.
 22. Schrier DJ, Phan SH, McGarry BM. The effects of the nude (nu/nu) mutation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. A biochemical evaluation. *Am Rev Respir Dis.* 1983; 127 (5): 614-7.
 23. Bruyn GA, Tate G, Caeiro F, Maldonado-Cocco J, Westhovens R, Tannenbaum H, et al. Everolimus in patients with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a 3-month, double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, proof-of-concept study. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67 (8): 1090-5.
 24. Nadiminti U, Arbiser JL. Rapamycin (sirolimus) as a steroid-sparing agent in dermatomyositis. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 52 (2 Suppl 1): 107-9.
 25. Desai N, Heenan S, Mortimer PS. Sirolimus-associated lymphoedema: eight new cases and a proposed mechanism. *Br J Dermatol.* 2009; 160 (6): 1322-6.
 26. Yoon KH. Proliferation signal inhibitors for the treatment of refractory autoimmune rheumatic diseases: a new therapeutic option. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1173: 752-6.
 27. Fried L, Kirsner RS, Bhandarkar S, Arbiser JL. Efficacy of rapamycin in scleroderma: a case study. *Lymphat Res Biol.* 2008; 6 (3-4): 217-9.
 28. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum.* 2004; 50 (6): 1918-27.
 29. Kalogerou A, Gelou E, Mountantonakis S, Settas L, Zafiriou E, Sakkas L. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64 (8): 1233-5.
 30. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med.* 2006; 354 (25): 2655-66.
 31. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K,

Hamaguchi Y, Kaburagi Y, et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest.* 2002; 109 (11): 1453-62.

32. Perl A, Fernandez DR, Telarico T, Doherty E, Francis L, Phillips PE. T-cell and B-cell signaling biomarkers and treatment targets in lupus. *Curr Opin Rheumatol.* 2009; 21 (5): 454-64.
33. Cardoso BA, Martins LR, Santos CI, Nadler LM, Boussiotis VA, Cardoso AA, et al. Interleukin-4 stimulates proliferation and growth of

T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by activating mTOR signaling. *Leukemia.* 2009; 23 (1): 206-8.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

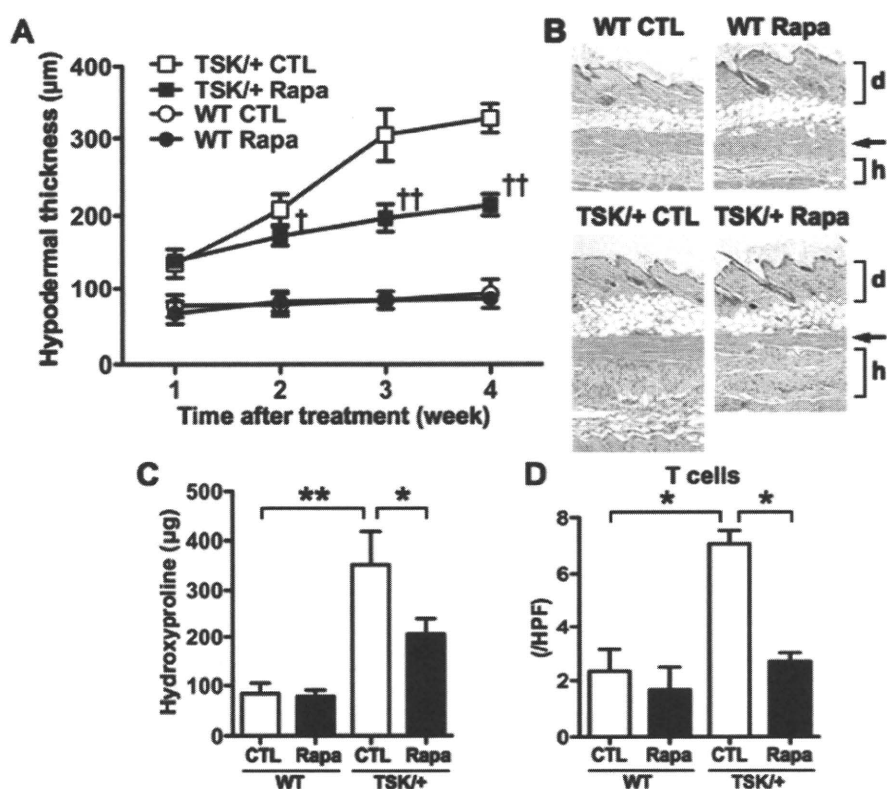


図1：TSK マウスにおける皮膚硬化を経時的に示した (A)。4週間後における皮膚硬化を組織学的に示した (B; 40倍)。表皮を (d)、皮筋層を矢印、皮下結合組織層を (h) でそれぞれ表す。ハイドロキシプロリン産生量 (C)、T細胞浸潤数 (D) を示した。TSK/+は TSK マウスを、WTは野生型マウスを、CTLはラパマイシンの溶媒のみを投与した群を、Rapaはラパマイシン投与群をそれぞれ表す。それぞれの TSK マウス CTL 群と比べて † $p < 0.05$ 、†† $p < 0.01$ を表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を表す。

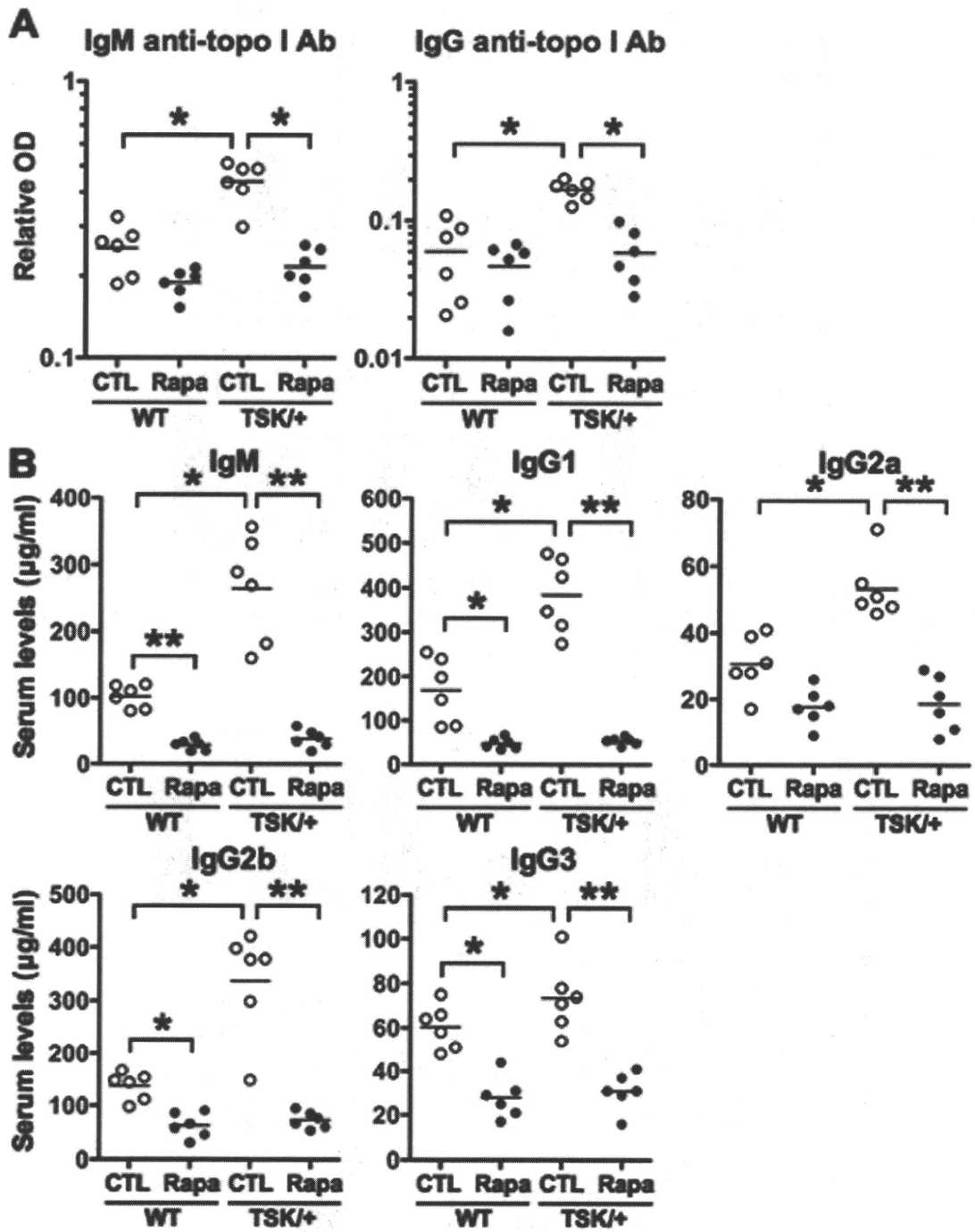


図4：血清中の抗 topo I 抗体 (A)、 γ グロブリンの濃度 (B) を示した。TSK/+ は TSK マウスを、CTL は野生型マウスを、CTL はラパマイシンの溶媒のみを投与した群を、Rapa はラパマイシン投与群をそれぞれ表す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ を表す。

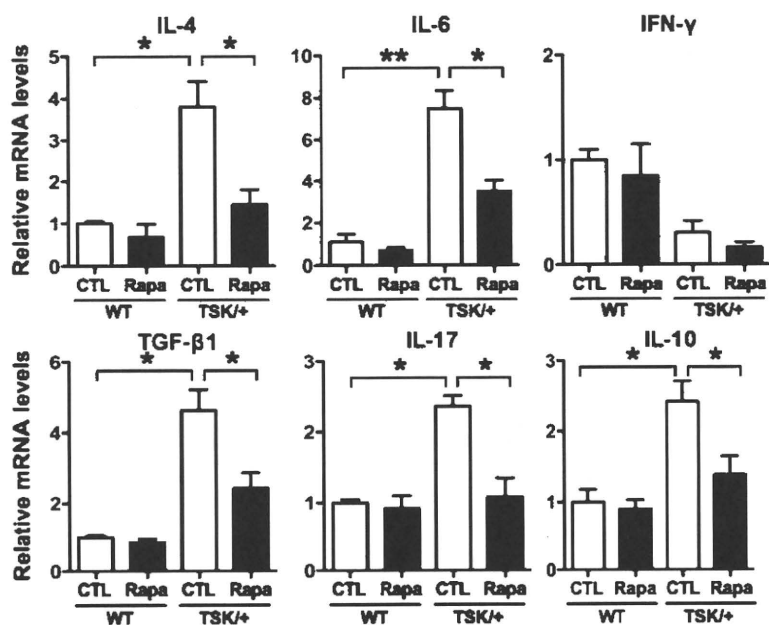


図2: TSK マウス皮膚におけるサイトカインの発現量を示した。TSK/+は TSK マウスを、CWT は野生型マウスを、CTL はラパマイシンの溶媒のみを投与した群を、Rapa はラパマイシン投与群をそれぞれ表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を表す。

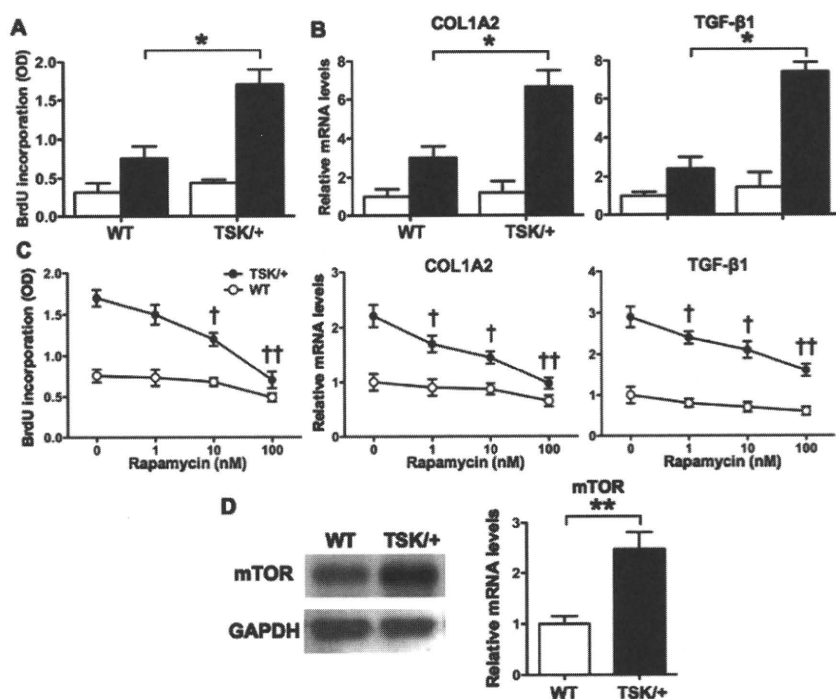


図3: TSK マウス皮膚線維芽細胞を IL-4 で刺激したときの増殖能 (A)、COL1A2、TGF- β 1 発現量 (B) を示した。白棒は無刺激を表し、黒棒は IL-4 刺激を表す。IL-4 刺激下でのラパマイシン投与時の増殖能、COL1A2 および TGF- β 1 発現量を示した (C)。TSK 皮膚線維芽細胞における mTOR の発現量を western blotting 法および real time PCR で示した (D)。TSK/+は TSK マウスを、WT は野生型マウスをそれぞれ表す。それぞれの WT 群と比べて † $p < 0.05$ 、†† $p < 0.01$ を表す。** $p < 0.01$ を表す。

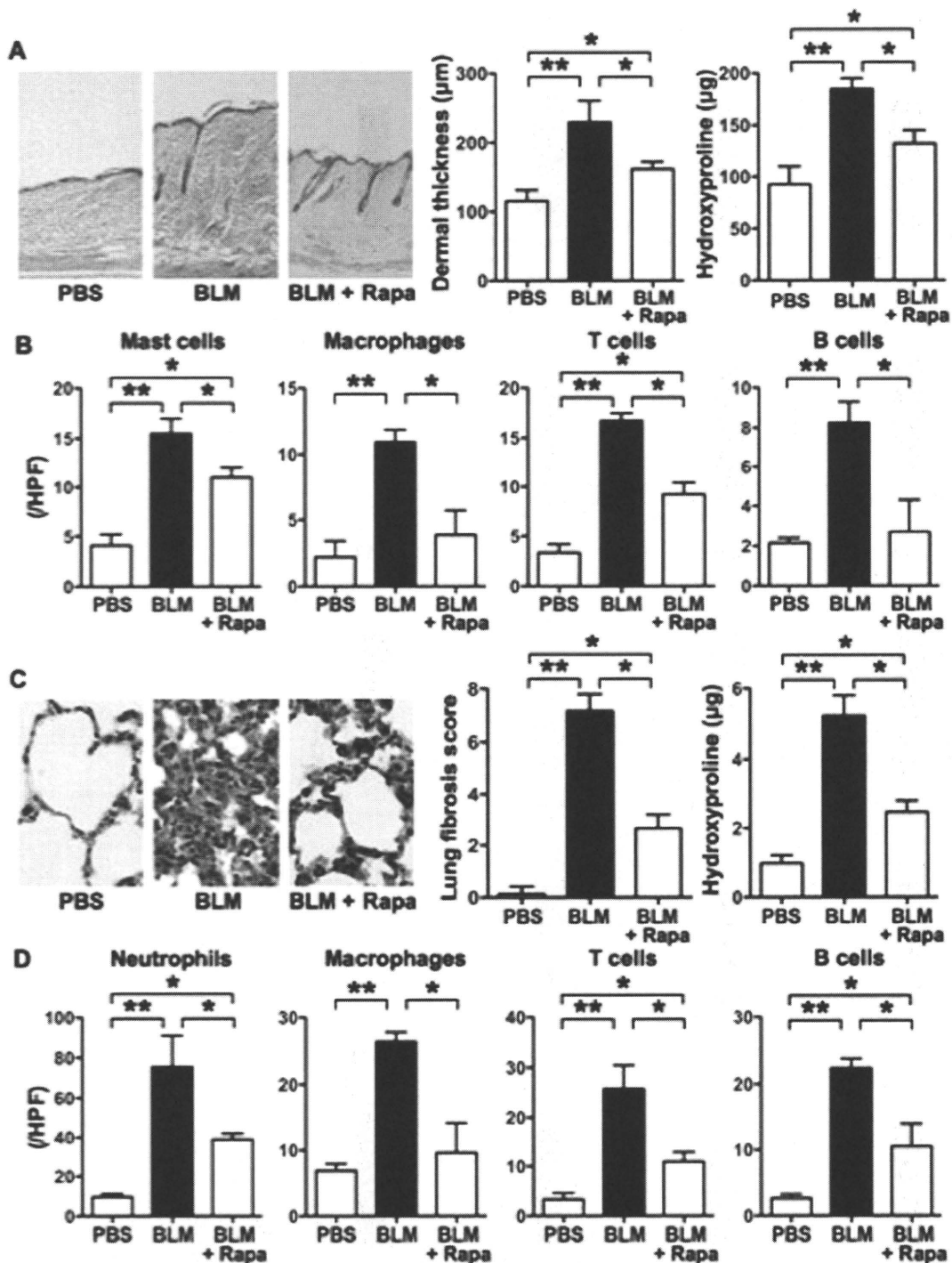


図5：BLM誘発SScモデルマウスの皮膚（A）、肺（C）を組織学的（皮膚；x40、肺；x100）に示した。同時にヒドロキシプロリン産生量を示した。皮膚（B）、肺（D）への炎症細胞浸潤数を示した。PBSはPBS投与群を、BLMはBLM投与群を、BLM+RapaはBLMおよびラパマイシン投与群をそれぞれ表す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を表す。

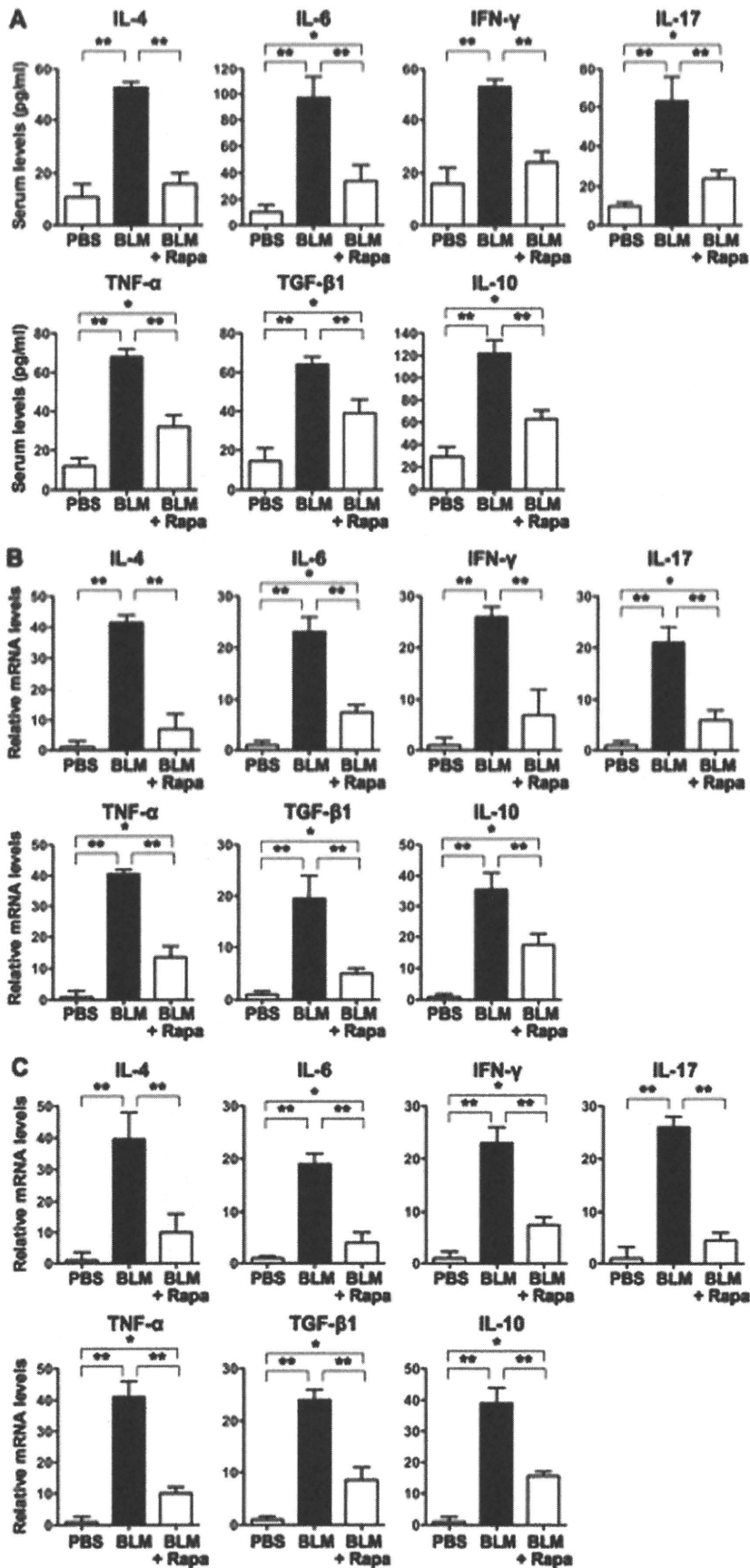


図6：BLM誘発SScモデルマウスにおける皮膚(A)、肺(B)、血清(C)におけるサイトカイン産生量を示した。PBSはPBS投与群を、BLMはBLM投与群を、BLM+RapaはBLMおよびラパマイシン投与群をそれぞれ表す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ を表す。

Tight skin (TSK) マウスにおける硫化水素の効果

研究代表者	佐藤伸一	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授
協力者	室井栄治	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 助教
協力者	吉崎 歩	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 医員
協力者	築場広一	東京慈恵会医科大学皮膚科 助教
協力者	原 肇秀	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 助教
協力者	竹中 基	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 講師
協力者	清水和宏	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 准教授
研究分担者	小川文秀	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学 講師

研究要旨

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) の病態形成に酸化ストレスが関与していることが報告されている。このことから抗酸化療法が SSc の治療戦略として有望視されている。高濃度の硫化水素 (H_2S) は毒性を呈するが、低濃度では抗酸化作用を有することが近年明らかになった。そこで SSc モデルマウスである TSK マウスにおける H_2S の効果を検討するために、 H_2S の供与体である硫化水素ナトリウム (NaHS; $100 \mu\text{mol/kg}$) を連日 4 週間、腹腔内投与した。組織学的に皮下結合織の菲薄化を認め、皮膚硬化の改善が確認できた。NaHS の投与により IgM 型抗 ss-DNA 抗体量は減少したが、抗トポイソメラーゼ I 抗体量に変化は認められなかった。また皮膚では抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 mRNA の発現増強が認められた。さらに TSK マウス皮膚から培養した線維芽細胞を NaHS で刺激したところ、COL1A2 の発現低下が認められた。以上の結果から、 H_2S は SSc の治療薬となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は皮膚および内臓諸臓器の血管障害と線維化を主徴とする膠原病である。SSc の重要な臨床的特徴として、組織の線維化に先行して生じる血管病変が挙げられる。Raynaud 現象に代表される、繰り返す一過性の血管攣縮による組織虚血と再還流はフリーラジカルであるスーパーオキシドの産生をきたし、酸化ストレス過剰状態を引き起こす。酸化ストレスは SSc の血管

障害や線維化そして抗核抗体の産生に関与している可能性が示唆されている^{1,2)}。これらのことから抗酸化療法は SSc の治療法として有望視されている³⁾。

硫化水素 (H_2S) は無色、可燃性、水溶性、腐卵臭の気体で 1713 年に最初に記載されて以来、毒性のガスとして知られている。しかしヒトをはじめとして生体内で恒常的に食餌性のシステインを主な基質として産生されていることが明らかにされた⁴⁾。また高濃度では毒性を呈するが、低濃度では抗酸化作

用を持つことが明らかになっている。抗酸化作用の機序として活性酸素⁵⁾や過酸化亜硝酸⁶⁾といった酸化ストレスの原因物質を直接除去することや、抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現を増加させ、一酸化炭素を介して除去するといった機序⁷⁾が考えられている。実際に投与する場合、主に濃度を一定に保つ目的で H₂S の供与体として硫化水素ナトリウム (NaHS) を用いる。そして NaHS は動物モデルにおいて炎症、虚血再還流、循環ショックに対し、治療効果が報告されている⁸⁾。

TSK マウスは著明な皮膚線維化を呈する突然変異として継代されたマウスであり、SSc 動物モデルとして広く認知されている⁹⁾。皮膚におけるコラーゲン蓄積や自己抗体の産生に加えて、抗酸化酵素の発現低下が認められることが近年明らかになった¹⁰⁾。

本研究では SSc において皮膚の線維化が H₂S で抑制できるかどうかを TSK マウスに NaHS を投与することにより検討した。

B. 研究方法

1) マウス

SSc モデルマウスとして TSK マウス、コントロールとして C57BL/6 マウスを用いた。

2-a) NaHS の投与

1 週齢のマウスに 4 週間にわたり PBS で希釈した NaHS を 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 、連日腹腔内注射した。また、試薬の対照として PBS のみを同様のスケジュールで腹腔内投与した。

2-b) 組織学的評価

マウスの背部皮膚より 6 mm 径のパンチで生検した。試料よりパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン & エオジン染色した。TSK マウスの皮膚硬化を反映する皮下結合組織層の厚さを光学顕微鏡で

測定し、線維化の指標とした。

2-c) マウス由来皮膚中ヒドロキシプロリン量の測定

ヒドロキシプロリンはコラーゲン中に特異的に高率に含まれるアミノ酸であり、その量はコラーゲン量を反映する。凍結保存した皮膚サンプル中のヒドロキシプロリン量を生化学的に測定し、線維化の指標とした。

2-d) 血清学的検討

自己抗体産生に対する影響を検討するために、採取したマウス血清について、TSK マウスで発現が高い抗トポイソメラーゼ I 抗体、IgM 型抗 ss-DNA 抗体、IgM 抗 ds-DNA 抗体について MBL 社製測定キットをモデファイして測定した。具体的にはこれらのキットはヒト抗体測定用のため、二次抗体がマウス免疫グロブリンを認識するように抗マウス免疫グロブリン抗体へとキットにあらかじめ添付されている二次抗体を置換して測定を行った。それぞれのサンプルは duplicate で測定し、平均値を解析に使用した。

2-e) リアルタイム RT-PCR 法による HO-1 mRNA 発現の定量的解析

TSK マウスで発現が低下することが報告されている、抗酸化酵素である HO-1 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で定量的に測定した。

2-f) TSK マウス由来線維芽細胞の COL1A2 発現のリアルタイム RT-PCR 法による検討

TSK マウス皮膚より繊維芽細胞を培養した。培養した線維芽細胞は 12 時間血清を除去した DMEM 培地に培地を置き換えたのち、DMEM 培地で希釈した 1 μM 、10 μM 、50 μM の NaHS で刺激し 24 時間後細胞を回収した。細胞から RNA を回収し、COL1A2 の発現をリアルタイム RT-PCR を行ない