

混合性結合組織病診断基準の診断特性について

研究代表者： 三森 経世 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・教授
研究分担者： 藤井 隆夫 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・准教授
研究協力者： 塩見 葵 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・大学院生
林野 泰明 京都大学大学院医学研究科医療疫学分野・講師

研究要旨

班員が所属する施設に通院中の混合性結合組織病（MCTD）、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎/皮膚筋炎、関節リウマチの臨床検査所見を調べ、それぞれ「混合性結合組織病の診断の手引き」（旧基準、1996年）、「混合性結合組織病診断基準」（新基準、2004年）を満たすかどうかを調べた。MCTD新基準の感度、特異度は97.2%、98.4%で、旧基準ではそれぞれ95.8%、98.4%であった。MCTDで旧基準を満たさず新基準のみを満たした症例が1例（1.4%）存在し、レイノー現象や手指腫脹のない抗Sm抗体陽性肺高血圧症例であった。肺高血圧症をMCTDに特徴的な所見とすれば新基準の方がすぐれていると結論できる。しかし、その患者サブセットは、Sharpらのオリジナル論文によるMCTDとは異なる疾患群の可能性がある。一方で、両MCTD基準を満たさずSLE基準のみを満たしながらMCTDとして経過観察されている症例が存在したが、これらの症例では肺高血圧症を有していなかった。以上より、専門医によってもMCTD診断における肺高血圧症の寄与度は異なると考えられた。

A. 研究目的

混合性結合組織病（MCTD）の診断については「混合性結合組織病の診断の手引き」（1996年 本研究班）が広く利用されているが、近藤班で、「中核所見」（1996年では共通所見）として肺高血圧症を加えた「混合性結合組織病診断基準」（2004年）が提案された。本研究では、これらふたつの診断基準を、班員が所属する施設のMCTDおよび他の膠原病、関節リウマチ患者をもちいて、調査票により診断特性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

本研究班員が所属する施設に通院中のMCTD（71例）、全身性エリテマトーデス（SLE、65例）、強皮症（SSc、59例）、多発性筋炎/皮膚筋炎（PM/DM、55例）、関節リウマチ（RA、64例）の臨床検査所見を調べ、それぞれ「混合性結合組織病の診断の手引き」（旧基準、1996年）、「混合性結合組織病診断基準」（新基準、2004年）、SLE分類基準（1982年

ACR、1997年改訂）、SSc分類基準（1980年ACR）、PM/DM分類基準（1975年Bohan and Peter）、RA分類基準（1987年ACR）を満たすかどうか調べた。なおPM/DMではProbable以上を診断とした。MCTD新基準と旧基準の感度と特異度、またMCTD基準を満たす他疾患の特徴、MCTD基準をみたさないMCTDの特徴を調べた。さらに肺高血圧症合併例の診断と、疾患標識抗体である抗Sm抗体、抗DNA抗体、抗Scl-70抗体、抗Jo-1抗体のMCTDにおける陽性率を調べた。

C. 研究結果

MCTD 71例、MCTD以外の膠原病あるいは関節リウマチ患者計243例で検討したところ、新基準の診断特性は、感度97.2%（95%CI 90.2-99.7%）、特異度98.4%（95%CI 95.8-99.5%）、陽性尤度比60.8、陰性尤度比0.03であり、旧基準の診断特性は感度95.7%（95%CI 88.1-99.1%）、特異度98.4%（95%CI 95.8-99.5%）、陽性尤度比59.9、陰性尤度比0.04であった。MCTDで、

新基準のみを満たした症例が1例(1.4%)存在し、レイノー現象や手指腫脹のない肺高血圧症例であった。またこの症例は、抗Sm抗体を有していた。逆に新基準をみかさず旧基準のみを満たしたMCTDは存在しなかった。一方、MCTDと診断されながらMCTD基準を満たさなかった症例は2例(2.8%)存在した。両症例ともMCTD共通所見とSLE基準を満たすが肺高血圧症はなく混合所見を欠いており、2例とも同じ施設からの患者であった。他疾患の診断がされていながらMCTD基準を満たした4症例はいずれもSLEで、うち3例はSLEの診断基準をみたしていた。

今回、重複症候群として症例組み入れを行わなかったため、SLE、SSc、PMの混合所見を有する患者がMCTDと診断される可能性については検討できなかった。なお調査票の中で、2つ以上の診断基準を満たす症例は5例存在したが、それらの症例は抗U1RNP抗体陰性であったため、MCTD基準を満たさなかった。

肺高血圧症例は27例含まれた(図1)。MCTDで最も高頻度(18.3%)であり、SSc、SLEでも13.6%、6.2%で認めていた。

疾患標識抗体(抗Sm抗体、抗DNA抗体、抗Scl-70抗体、抗Jo-1抗体)は、MCTD患者において抗DNA抗体の併存率が最も高く28.6%、また抗Sm抗体が17.9%に認められた(図2)。疾患標識抗体を複数有する患者も存在し、疾患標識抗体のいずれかを有するMCTDは42.9%であった。

D. 考察

今回の検討から、旧基準と新基準はいずれも感度・特異度ともに非常にすぐれており、厚生労働省基準を参考に診断されている施設(班員)がほとんどであることが確認された。2004年に提案された「混合性結合組織病診断基準」の中核所見のうち、肺高血

圧症のみを満たす症例があり、この1症例が新基準の感度を高める結果となった。この症例をMCTDと考えるのであれば、新基準の方がより適切であると考えられる。しかしこの症例は抗Sm抗体が陽性であり、臨床所見上もSharpが報告したオリジナル症例(Sharp GC, *et al*, *Am J Med* 52: 148-159, 197)とは異なるサブセットであることは明白である。本研究でもMCTDの18%が抗Sm抗体陽性例で、同抗体陽性MCTDは本邦では以前から認められた概念であるが、新基準を用いてMCTDを規定した場合には欧米におけるMCTDとはより異なる概念となることが予想される。しかし一方で、肺高血圧症がMCTDに高頻度であるという知見は本研究班で確認されたものであり、この新知見を基準に織り込むという点では中核所見の「肺高血圧症」は意義があると考えられる。

肺高血圧症症例の約半数はMCTDと診断されていた。肺高血圧症患者の原疾患分布についても臨床における印象と一致しているため、今回集計に用いた症例が著しく偏った症例群であるとは考えられなかった。

E. 結論

旧、新しいいずれの基準も感度・特異度ともに高かった。しかし抗Sm抗体が陽性でレイノー現象/手および手指の腫脹がないにもかかわらず肺高血圧症を有する症例をMCTDとするならば新基準のほうが優れていると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出現・登録状況

なし

	MCTD	SSc	SLE	PM/DM	RA
肺高血圧症合併頻度	18.3	13.6	6.2	1.8	1.6
	(13/71)	(8/59)	(4/65)	(1/55)	(1/64)

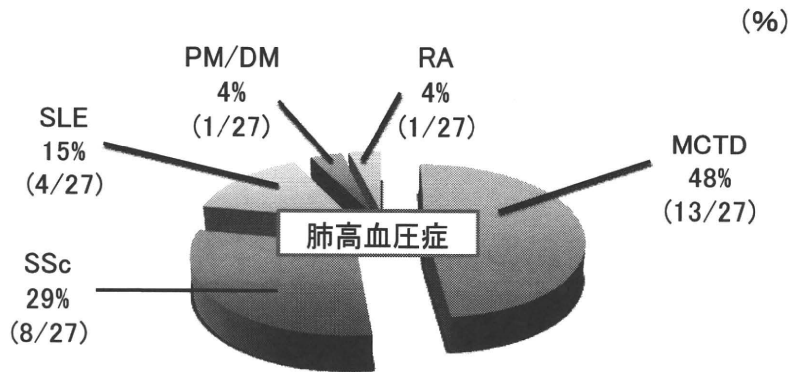


図1. 各疾患における肺高血圧症 (PAH) 合併頻度

MCTDでPAHが最も高頻度であった。多施設の患者を集計したものであるが、過去の報告と同様の合併頻度であり、今回の症例はMCTD基準の検定をする上で適切な症例群と考えられた。なお疾患名は主治医診断である。

	Sm	DNA	Scl-70	Jo-1
MCTD (主治医診断)	17.9	28.6	3.6	1.8

%

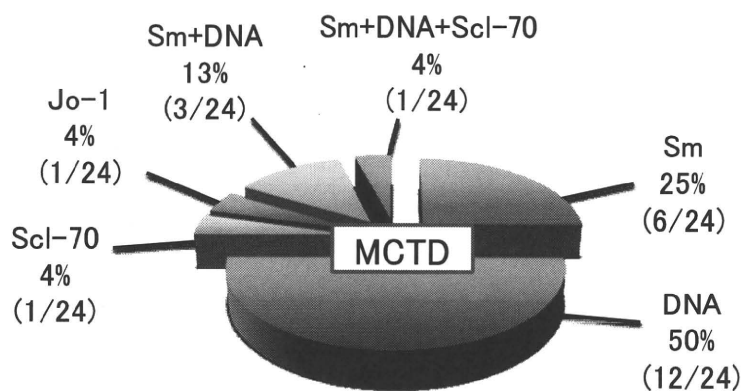


図2. MCTDにおける疾患標識抗体

抗DNA抗体が最も高頻度であった。またSharpらが世界に先駆けて報告したオリジナル症例において陰性と定義される抗Sm抗体は、今回の症例群では17.9%に認められた。なおMCTDの42.9%でいずれかの疾患標識抗体を有していた。

混合性結合組織病(MCTD)の肺動脈性肺高血圧症(PAH)診断の手引き改訂について

研究分担者：	吉田 俊治	藤田保健衛生大学医部内科・教授
研究協力者：	深谷 修作	藤田保健衛生大学医部内科・准教授
研究協力者：	加藤 靖周	藤田保健衛生大学医学部内科・講師
研究協力者：	岩瀬 正嗣	藤田保健衛生大学医療科学部医療経営情報学科・教授
研究分担者：	京谷 晋吾	国立循環器病センター・客員研究員
研究分担者：	桑名 正隆	慶応義塾大学医学部内科・准教授
研究分担者：	藤井 隆夫	京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・准教授
研究代表者：	三森 経世	京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・教授

研究要旨

MCTDには高率に肺高血圧症（PH）の合併を認め、その多くがPAHである。本研究班ではMCTD患者に対する積極的なPAHのスクリーニング検査を推奨してきた。また、近年の新たなPAH治療薬の開発により、PAHに対する関心が急速に高まってきた。その結果、軽症または無症候、境界域のPAH患者も発見されるようになった。また、世界的に新たなPHの診療指針が示され、早期治療や作用機序の異なる肺血管拡張薬の併用が積極的に行われるようになった。そこで、軽症、無症候患者に対して行われるスクリーニング検査も念頭においたPAH診断の手引きが必要と考え、その改定を行った。改訂にあたり、①PAHの診断には肺動脈圧測定を必須とする、②PAHの診断には右心カテーテル検査は必須としないが積極的に推奨する、③PAHの診断に必要な心臓超音波検査での推定肺動脈収縮期圧（ePAP）の具体的数値を記載する、④PHを示唆する臨床所見にも注目する、⑤PHではなく、PAHの診断の手引きとする、の5項目を基本方針とした。これらは本研究班の班会議、本研究班内に設置されたワーキンググループで議論され合意を得た。改訂した診断の手引きは、Ⅰ．PHを疑う臨床所見、検査所見、Ⅱ．心臓超音波検査での診断、Ⅲ．右心カテーテル検査での診断、Ⅳ．除外診断項目からなり、PAHとPHの疑いの2群の診断とした。心臓超音波検査のみでの診断も可能ではあるが、右心カテーテル検査を推奨した。また、PAH診断の閾値となるePAP値はヨーロッパ心臓病学会のPH診断・治療ガイドラインで提唱された36mmHgとした。これは本研究班内でのPHの悪化をきたすePAPの閾値、あるいは自験例での右心カテーテル検査での肺動脈平均圧25mmHgに相当するePAP 値にきわめて近似した値であり、妥当と考えられた。

A. 研究目的

混合性結合組織病（MCTD）には高率に肺高血圧症（PH）の合併を認め、その多くが肺動脈性肺高血圧症（PAH）とされている。また、積極的にPAHのスクリーニングを行うことにより、軽症あるいは無症候の患者も含め、新たなPAH患者が見いだされるりこともあり、本研究班ではMCTD患者に対する積極的なPAHのスクリーニングを推奨してきた。また、近年PAH治療薬の新たな開発が相次いだことによるPAHに対する関心の高まりも相俟って、積極的な

PAHスクリーニングが行われるようになってきた。さらに、境界域なる概念も記載された世界的に新たなPH診療指針^{2,3)}が示され、比較的早期からの肺血管拡張療法、作用機序の異なる肺血管拡張薬の併用療法が積極的に行われるようになってきた。

一方、現在用いられているMCTDのPH診断の手引き⁴⁾は、PHに由来する症状を有する患者におけるPH診断が想定されており、無症候患者における積極的なPHスクリーニングは想定されていない。しかし、無症候患者に対し心臓超音波検査による積極的な

PHスクリーニングを行った場合でも、「超音波ドプラー法による右心系の圧が右心カテーテル検査の肺動脈平均圧 (mPAP) 25mmHg以上に相当」の項目を用いればその診断も可能ではある。しかしながら、「mPAP 25mmHgに相当する圧」の具体的数値の記載がなく、各施設あるいは主治医毎にPH診断の判定基準が異なってしまう可能性がある。

そこで、軽症、無症候患者に対して積極的に行うことを推奨しているPAHスクリーニング検査にも対応できる、第4回PHワールドシンポジウムで提唱された境界域PHにも対応できる、mPAP 25mmHgに相当する心臓超音波検査による推定肺動脈収縮期圧 (ePAP) の具体的数値を記載したMCTDのPAH診断の手引きを作成することとした。

B. 研究方法

MCTDのPH診断の手引きの改訂は、平成21年度第2回本研究班班会議、平成22年4月の「MCTDのPAH診断の手引き改訂のためのワーキンググループ」(本研究班の班内に設置)、平成22年度第1回本研究班班会議の3回の会議で議論され合意された事項に基づき作成し、平成22年度第2回本研究班班会議にて最終的に了承を得た。本手引きの改訂にあたり、①PAHの診断には肺動脈圧の測定を必須とする、②PAHの診断には右心カテーテル検査を必須とはしないが、積極的に推奨する、③PAHの診断に必要な心臓超音波検査でのePAPの具体的数値を記載する、④PHを示唆する臨床所見にも注目する、⑤PHではなくPAHの診断の手引きにする、の5項目が班内の合意事項である。この合意事項を基に、ePAPの経年的変化に関する研究班内の調査結果、自験例におけるmPAP 25mmHgに相当するePAP値の検討結果、ヨーロッパ心臓病学会 (ESC) のPH診断・治療ガイドライン³⁾を参考にPAHの診断に用いるべきePAP値を設定し、PHを示唆する臨床所見も診断に寄与するものとした。

(倫理面への配慮)

今回の研究で患者の個人情報扱ったのはePAPとmPAPとの関連を検討した部分である。これは、履歴調査であるので、患者に不利益を与えるものではないと考える。また、患者個人が特定できるデー

タは公表していない。

C. 研究結果

I. ePAPとmPAPとの関連

図1にePAPとmPAPとの相関を示す。対象は平成16年1月1日から平成20年12月31日までの5年間に右心カテーテル検査を施行した当科にて診療中の膠原病患者15例であった。その内訳はMCTD 6例、全身性硬化症5例、全身性エリテマトーデス (SLE) 1例、SLEとシェーグレン症候群の合併1例、多発性筋炎1例、成人発症Still病1例であった。心臓超音波検査が右心カテーテル検査の前後1週間以内に施行されており、且つ治療内容に変化がなかった場合にそのデータを採用した。右心カテーテル検査は15例の対象患者に対してのべ23回施行されていた。条件に合致する心臓超音波検査は21回施行されていた。心臓超音波検査によって得られたePAPと右心カテーテル検査によって得られたmPAPとの間の相関を検討した。ePAPとmPAPとは $p < 0.0001$ 、 $r^2 = 0.909$ と有意な正相関を認めた。回帰直線から推定されるmPAP 25mmHgに相当するePAPの値は39mmHg (右房圧を5mmHgと仮定) であった。

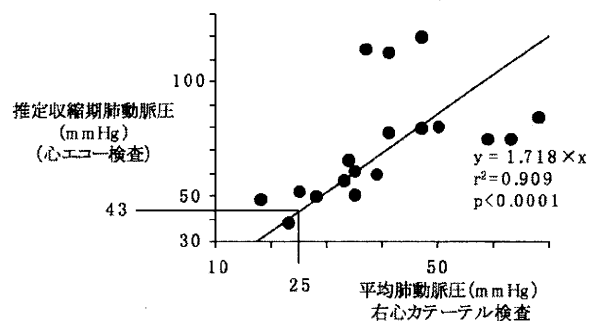


図1. 心エコーによる推定収縮期肺動脈圧と右心カテーテルによる平均肺動脈圧との相関

II. MCTDのPAH診断のアルゴリズム

表1に今回改訂したMCTDのPAH診断の手引き、図2にその診断アルゴリズムを示す。

診断は「PAH」と「PAH疑い」の2群を設定した。心臓超音波検査でPAHを診断する場合に用いるePAPの値はESCのPH診断・治療ガイドライン³⁾に基づき36mmHgと50mmHg (表2)とした。この時に、IのAの項目の満たし具合を加味したPAHの診断となるようにした。右心カテーテル検査でPAHを診断

する場合に用いるmPAPの値はPHの定義に基づき21mmHgをPAH疑い（境界域）、25mmHgをPAHとした。

D. 考察

MCTD患者に積極的にPAHのスクリーニングを行うことにより、軽症あるいは無症候の患者も含め、新たなPAH患者が見いだされる¹⁾。このような状況で、従来用いられてきたMCTDのPH診断の手引き⁴⁾には二つの問題点があると思われる。第一の問題点は、従来のPH診断の手引きは、PHに由来すると考えられる症候を有している患者におけるPHの診断を想定しており、無症候患者における積極的なPHスクリーニングは想定されていない点である。第二の問題点は、「超音波ドップラー法による右心系の圧が右心カテーテル検査のmPAP 25mmHg以上に相当すればPHの診断が可能であるが、その具体的数値の記載がなく、各施設あるいは主治医毎にPH診断の判定基準が異なってしまう可能性がある点である。そして、第4回PHワールドシンポジウムでは境界域PHの概念も提唱された。そこで、これら三つの点に対応できるMCTDのPAH診断の手引きを作成した。

本手引きの改訂にあたり、①PAHの診断には肺動脈圧の測定を必須とする、②PAHの診断には右心カテーテル検査を必須とはしないが、積極的に推奨する、③PAHの診断に必要な心臓超音波検査でのePAPの具体的数値を記載する、④PHを示唆する臨床所見にも注目する、⑤PHではなくPAHの診断の手引きにするの5項目が本研究班内の合意事項である。

まず、肺動脈圧の測定であるが、心臓超音波検査および右心カテーテル検査いずれでもかまわないが、肺動脈圧の測定なしではPAHあるいはPAHの疑いの診断に至らない様な位置づけとした。

右心カテーテル検査については、PAHの診断に際し必須の検査とはしていないが、右心カテーテル検査だけでもPAHあるいはPAHの疑いの診断が可能である位置づけにするとともに、これらの診断に至る症例については、診断の手引き使用時の留意点および付記においてその施行を推奨している。

PAHの診断に必要なePAPの具体的数値についてはESCのPH診断・治療ガイドライン³⁾に記載されている値を採用した。具体的には36mmHgと50mmHg

である。この内、36mmHgはPAHの存否を判断する重要な数値と考えられる。自験例での検討ではmPAP 25mmHgに相当するePAPは38mmHgときわめて近似した値であったこと（図1）、平成16年度の本研究班班内調査において行ったePAPの経時的な経過観察においてePAP 35mmHg以下ではePAPの悪化は見られなかったこと⁵⁾からも36mmHgは妥当な数値と考えられた（いずれも右房圧を5mmHgと仮定）。

PHを示唆する臨床所見に関しては、従来の診断の手引きに記載されている項目から心臓超音波検査に関連する項目を除いた5項目とした。これら5項目中4項目以上を満たす場合（従来の手引きではこれだけでPHの診断が可能）は、ePAPが36mmHg以下ではPAHは否定的からPAH疑いへ、37～50mmHgではPAHの疑いからPAHへとその診断が変化するようにし、これらの項目がPAHの診断に寄与するものとなっている。また、これら臨床徴候とは別に無症候患者に対するスクリーニングも念頭にスクリーニング検査としての心臓超音波検査の位置づけも明確にした。さらに、臨床所見だけでなくBNPやNT-ProBNP、%VC/%DLco、血清尿酸値などの検査所見の異常も心臓超音波検査を行うべききっかけとして明記した。

MCTDに合併するPHの多くはPAHと考えられており、「MCTDに合併したPH」は「MCTDに合併したPAH」と同義に近い。しかし、PAH以外のPHも確かに存在し、PHの治療まで考えると、さらにPAHとその他のPHとの鑑別は重要となる。したがって、除外診断項目を設け、具体的に左心性疾患、肺疾患および/または低酸素血症、慢性血栓塞栓によるPHを挙げることにより、PAHの診断の手引きであることを明確にした。

今回改訂したMCTDのPAH診断の手引きは本研究班内では合意されているが、その感度・特異度の検定は行われておらず、今後検討されなければならない。また、多くの軽症PAH患者を循環器専門医ではなくリウマチ専門医が診療している現状を鑑み、その診断に際し右心カテーテル検査を必須とはしなかった。しかし、右心カテーテル検査はPAHの診断のゴールドスタンダードであり、その重要性を否定するものではないことを強調したい。さらに、無症候あるいは軽症のPAHが診断された場合、その管理に明確な指針はない。慎重に経過観察されたこれら症

例の蓄積が、その答に結びつくものと考える。

E. 結論

「MCTDのPH診断の手引き」を改訂し、「MCTDのPAH診断の手引き」とした。「MCTDのPAH診断の手引き」は無症候患者へのPAHスクリーニング検査の施行も想定し、mPAP 25mmHgに相当するePAPの具体的数値を記載し、PAHの診断に際し肺動脈圧の測定を必須とし、PAHの疑いの中に境界域のPAHが含まれるようにした。

今後、「MCTDのPAH診断の手引き」の感度・特異度の検討が必要であるし、右心カテーテル検査の扱いについてもさらに議論を深める必要がある。

文献

1. 吉田俊治, 深谷修作, 岡田純, 他: 混合性結合組織病における肺高血圧症の合併頻度. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 混合性結合組織病に関する研究—混合性結合組織病の病態、治療と関連する遺伝的因子、自己抗体の研究— 平成15年度総括・分担研究報告書: 43-46, 2004
2. Proceedings of the 4th World Symposium on Pulmonary Hypertension, February 2008, Dana Point, California, USA. J Am Coll Cardiol 54(1 Suppl): S1-117, 2009
3. Galie N., Hoesper M.M., Humbert M., et al. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Eur Heart J. 30(20): 2493-2537, 2009
4. 厚生省結合組織病調査研究班: 混合性結合組織病の肺高血圧症診断の手引き. リウマチ31: 159-166, 1991
5. 吉田俊治, 深谷修作, 岡田純, 他: 混合性結合組織病合併肺高血圧症の自然経過に関する研究. 厚

生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業—混合性結合組織病の病態、治療と関連する遺伝的因子、自己抗体の研究— 平成16年度総括・分担研究報告書: 55-58, 2005

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato K, Onoda S, Asano J, Fukaya S, Yoshida S. : Evaluation of the clinical cutoff level of serum (1→3)-beta-D-glucan in patients with connective tissue diseases complicated by deep fungal infections. Mod Rheumatol. 20(4):366-9. 2010.
2. Kunieda T, Nakanishi N, Matsubara H, Ohe T, Okano Y, Kondo H, Nishimura M, Shirato K, Tanabe N, Homma S, Yoshida S, Inokuma S, Kodama M, Koike T, Hishida H : Effects of long-acting beraprost sodium. (TRK-100STP) in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension. International Heart Journal. 50(4):513-29, 2009.
3. 吉田俊治: 膠原病の伴う肺動脈性肺高血圧症. 呼吸器科 16(3):192-8, 2009.
4. 深谷修作, 吉田俊治: 膠原病と肺動脈性肺高血圧症. 日本臨床 66(11):2200-4, 2008.
5. 吉田俊治: 膠原病性肺高血圧症. 呼吸と循環 56(10):995-1001, 2008.
6. 吉田俊治: 膠原病性肺高血圧症. 臨床リウマチ 20(2):95-100, 2008
7. 岩館知史, 吉田俊治: 強皮症の肺高血圧症. リウマチ科 39(4): 326-332, 2008.

2. 学会発表

1. 登坂信子, 深谷修作, 吉田俊治, 他: 当科におけるボセンタンの治療成績から考える肺血管拡張薬の併用療法. 第54回日本リウマチ学会総会, 2010.4
2. 吉田俊治: 膠原病性肺高血圧症の現状. 第54回日本リウマチ学会総会, 2010.4

表 1. 混合性結合組織病(MCTD)の肺動脈性肺高血圧症(PAH)診断の手引き

<p>I. 肺高血圧症を疑う臨床所見、検査所見</p> <p>A. 労作時の息切れ 胸骨左縁収縮期拍動 第II肺動脈音の亢進 胸部X線像での肺動脈本幹部の拡大あるいは左II弓の突出 心電図上の右室肥大あるいは右室負荷</p> <p>B. BNP または NT-ProBNP 高値 %VC/%DLco\geq1.4 原因不明の高尿酸血症</p> <p>II. 心臓超音波検査</p> <p>1. 推定肺動脈収縮期圧が 36mmHg (三尖弁逆流速度 2.8m/s) 以下 2. 推定肺動脈収縮期圧が 37~50mmHg (三尖弁逆流速度 2.9~3.4m/s) 3. 推定肺動脈収縮期圧が 50mmHg (三尖弁逆流速度 3.4m/s) より大</p> <p>III. 右心カテーテル検査</p> <p>1. 肺動脈平均圧 21~24mmHg 2. 肺動脈平均圧 25mmHg 以上</p> <p>IV. 診断</p> <p>PAH</p> <p>IIの3に該当 IIの2に該当し、IのAの4項目以上を満たす IIIの2に該当</p> <p>PAHの疑い</p> <p>IIの2に該当し、IのAの4項目以上を満たさない IIの1に該当し、IのAの4項目以上を満たす IIIの1に該当</p> <p>V. 除外診断</p> <p>1. 左心疾患による肺高血圧症 2. 肺疾患および/または低酸素血症による肺高血圧症 3. 慢性血栓塞栓性肺高血圧症</p>

診断の手引使用上の留意点

- 本手引きは MCTD 患者の PAH の診断に用いる。
- MCTD 患者では肺高血圧症を示唆する臨床所見、検査所見がなくても、心臓超音波検査を行うことが望ましい。
- 肺高血圧症を示唆する推定肺動脈収縮期圧以外のパラメーター（肺動脈弁逆流速度の上昇、肺動脈への右室駆出時間の短縮、右心系の径の増大、心室中隔の形状および機能の異常、右室肥厚の増加、主肺動脈の拡張）を認める場合には、PAH およびその疑いの診断に至らなくても 1 年以内に再評価することが望ましい。
- PAH 疑いと診断される場合には右心カテーテル検査を施行することが望ましい。治療を行わない場合でも、3 か月後に心臓超音波検査を行い再評価する。
- PAH と診断される場合においても、その臨床分類、重症度評価のため、治療開始前に右心カテーテル検査を施行することが望ましい。

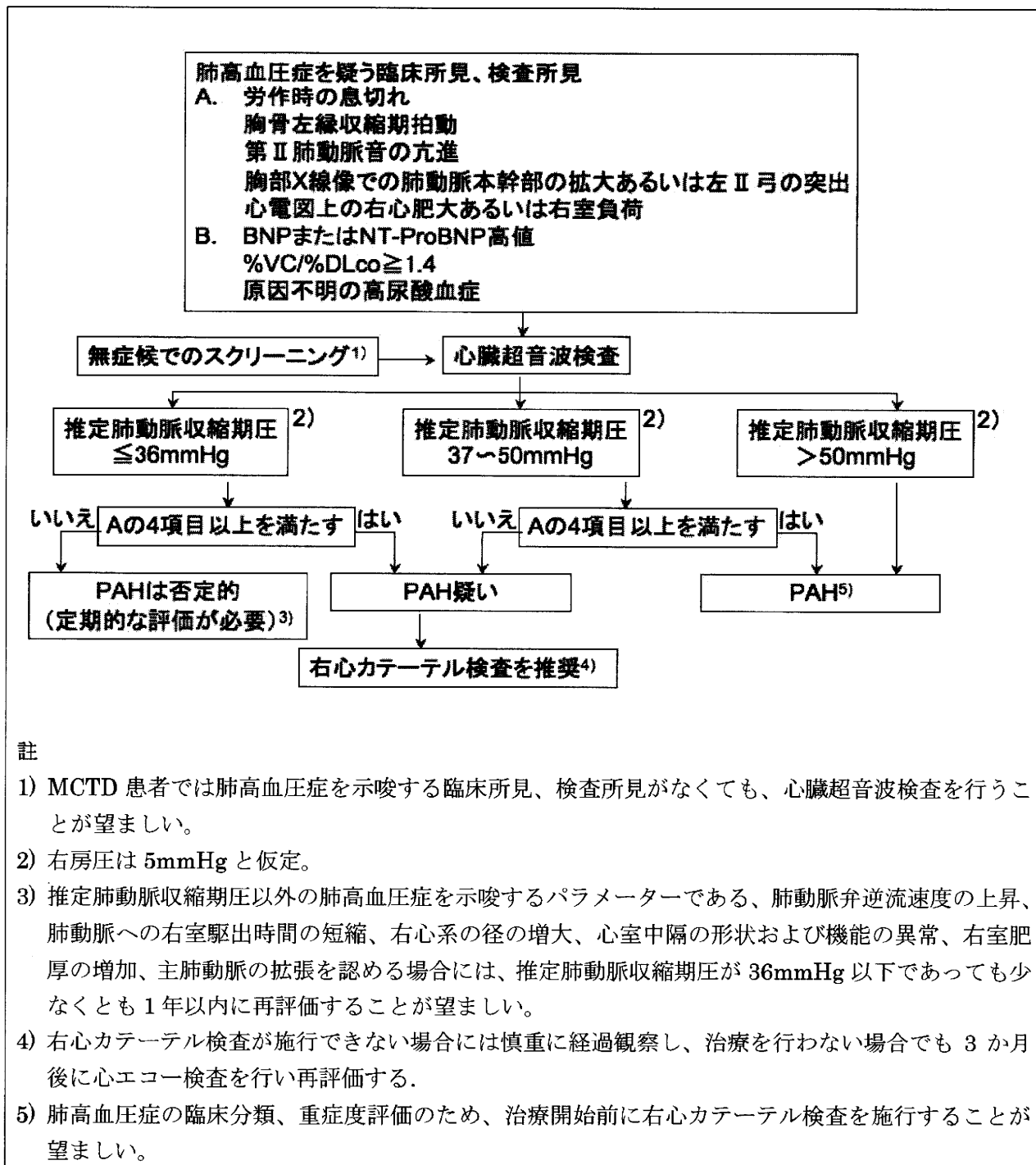


図2. 混合性結合組織病(MCTD)の肺動脈性肺高血圧症(PAH)診断アルゴリズム

表2. 心エコー検査による肺高血圧症の有無を推測するための基準

	推奨度	エビデンスレベル
心エコー診断：PHの可能性ほぼなし 三尖弁逆流速度 $\leq 2.8\text{m/s}$ PA収縮期圧 $< 36\text{mmHg}$ PHを示唆するその他の心エコーパラメーターなし	I	B
心エコー診断：PHの可能性あり 三尖弁逆流速度 $\leq 2.8\text{m/s}$ 、PA収縮期圧 $< 36\text{mmHg}$ だが、 PHを示唆するその他の心エコーパラメーターあり	IIa	C
三尖弁逆流速度 $2.9\sim 3.4\text{m/s}$ 、PA収縮期圧 $37\sim 50\text{mmHg}$ 、 PHを示唆するその他の心エコーパラメーターの有無は問わない	IIa	C
心エコー診断：PHの可能性大 三尖弁逆流速度 $> 3.4\text{m/s}$ 、PA収縮期圧 $> 50\text{mmHg}$ 、 PHを示唆するその他の心エコーパラメーターの有無は問わない	I	B
PHのスクリーニングに運動負荷ドップラー心エコー法は推奨できない	III	C

推奨度

- I：エビデンスが存在するおよび/または見解が広く一致
- IIa：有用、有効である可能性が高い
- IIb：有用性/有効性が確立されているとはいえない
- III：有用、有効ではなく、時に有害であるというエビデンスが存在するか、見解が広く一致

エビデンスレベル

- A：多数の無作為化臨床試験またはメタアナリシス
- B：ひとつの無作為化臨床試験または大規模非無作為化試験
- C：専門医の合意および/または小規模試験、レトロスペクティブ試験、症例登録

抗 U1RNP 抗体の病原性に関する研究

- 抗 U1RNP 抗体と MCTD/SLE の中枢神経症状に関して -

研究分担者： 藤井 隆夫 京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・准教授

研究要旨

本邦において無菌性髄膜炎を呈する膠原病患者は血清中抗 U1RNP 抗体陽性例が多い。しかし病態局所における抗 U1RNP 抗体については報告がないため、本研究では脳脊髄液（CSF）中の同抗体を詳細に検討した。中枢神経（CNS）症状を呈した抗 U1RNP 抗体陽性 SLE/MCTD 28 患者血清中、副腎皮質ステロイドを含む免疫抑制療法が必要であった SLE/MCTD による活動性炎症性 CNS 症状（NPSLE）例では、それ以外の CNS 症状症例に比し CSF 中抗 U1RNP 抗体陽性率が有意に高かった。また anti-U1RNP index は CSF IL-6、IgG index、血液脳関門の傷害（Qalb）と相関がなく、NPSLE の特異的な活動性指標となる可能性が示唆された。なお anti-U1-70K index は anti-U1-A および U1-C index よりも高値で、CSF 中の抗 U1-70K 抗体の抗原エピトープは既報の T・B 細胞エピトープと一致し、髄腔内でその産生が刺激されている可能性が示唆された。またわれわれは CSF-抗 U1RNP 抗体陽性例で CSF 中の IFN- α 、IP-10、MCP-1、MIG、RANTES、fractalkine が高く、NPSLE 24 症例（CSF-抗 U1RNP 抗体陽性率=46%）とステロイド精神病と 6 症例（同 17%）とを比較すると、MCP-1 が前者で高値である（ $p<0.05$ ）ことをつきとめた。より多数例での検討が必要であるが、血清-抗 U1RNP 抗体陽性 NPSLE 患者では CSF-抗 U1RNP 抗体が高力価で、病因的意義を有すると報告されている CSF-ケモカインが相関する可能性がある。

A. 研究目的

抗 U1RNP 抗体は膠原病患者血清中で高頻度に検出され、特に MCTD では高力価となる。以前からレイノー現象や肺高血圧症、無菌性髄膜炎など一部の病態と抗 U1RNP 抗体との関連が示唆されているが、抗 U1RNP 抗体の特定の臓器に対する病原性について直接的なエビデンスを示す報告はきわめて少ない。われわれは、抗 U1RNP 抗体（特に抗 U1-70K 抗体）が *in vivo* でそれらの関連病態に及ぼす影響を明確にしたいと考えた。そこで抗 U1RNP 抗体が関連する病態の局所においてその産生が亢進しているかを明確にするため、抗 U1RNP 抗体陽性患者で高頻度とされる無菌性髄膜炎を含む中枢神経（central nervous system: CNS）症状をきたした膠原病患者において、その髄液（cerebrospinal fluid: CSF）中の抗核抗体を測定し、その臨床的意義を検討した。また、CSF-抗 U1RNP 抗体と液性因子（NPSLE と関連するサイトカイン・ケモカイン）に相関がないかどうかを調べた。

B. 研究方法

2002 年から 2008 年の間に CNS 症状（ACR 分類、1999）を発症し、当院に入院した 28 例の膠原病患者（SLE 24 例、MCTD 4 例、CNS 症状を発症した平均年齢=34.1 歳）を対象とした。血清と CSF 中の抗 U1RNP/Sm/SS-A 抗体は RNA-免疫沈降法（RNA-IPP）と ELISA（MBL 社）で測定、抗 dsDNA 抗体と抗リボソーム P 抗体は ELISA（MBL 社）で測定して原疾患による CNS 症状との関連を調べた。anti-U1RNP index（=[CSF-抗 U1RNP 抗体価/CSF-IgG 濃度]/[血清-抗 U1RNP 抗体価/CSF-IgG 濃度]）を計算し、CSF IL-6、IgG index、および血液脳関門（blood brain barrier: BBB）透過性の指標である albumin quotient（Qalb = CSF-アルブミン濃度 [mg/dl]/血清-アルブミン濃度 [mg/dl]、正常<0.0076）との相関を調べた。

またその髄腔内局所における抗 U1RNP 抗体の特徴をより明確にするために、U1RNP に特異的な蛋白

成分である U1-70K、A、C 各成分に対する反応性を、そのリコンビナント抗原を固相化した ELISA で血清と CSF を用いてしらべた。なお U1-70K 蛋白に関して、その全長蛋白を 24 アミノ酸ペプチドとして部分合成し、ELISA によって血清・CSF の反応性を検討した。

さらに十分な臨床データと CSF があつた SLE28 例、MCTD2 例を対象として、CSF 中の液性因子を測定した。男性 1 例、女性 29 例、CNS 症状の平均発症年齢は 32.3 歳で、CNS 症状を認めた際に採取された CSF を用いた。CSF 中の液性因子の測定は Filgen 社に依頼し、Procarta® Cytokine Assay kit を用いて IFN- α 、IL-8、IP (interferon inducible protein) -10、MCP (monocyte chemoattractant protein) -1、MIG (monokine induced by IFN- γ)、RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)、fractalkine の 7 種類を Bio-Plex™ により測定した。CSF-抗 U1RNP 抗体陽性患者と陰性患者で CSF 中液性因子の差、臨床的にステロイド精神病とされた症例 (脳 MRI、脳波、CSF の一般検査などで明らかな異常がなく、ステロイド減量により症状が改善した症例) と NPSLE と考えられた症例とで液性因子の差がないかを調べた。

C. 研究結果

CNS 症状を呈した SLE/MCTD 28 患者の血清中、抗 U1RNP、dsDNA、SS-A、Sm、リボソーム P 抗体をそれぞれ 75、61、57、25、14% に認めた。しかし CSF 中では抗 U1RNP 抗体 (36%)、抗 SS-A 抗体 (14%)、抗 dsDNA 抗体 (7%) のみが認められ、抗 Sm 抗体、抗リボソーム P 抗体は検出されなかった (表 1)。図 1・2 に示すように、SLE/MCTD と関連する活動性炎症性 CNS 症状 (neuropsychiatric SLE: NPSLE、感染症などの他疾患が除外され、その治療に副腎皮質ステロイドを含む免疫抑制療法を要した症例) を有した症例ではそれ以外の CNS 症状 (薬剤性、感染症、血栓症など) を呈した症例に比し CSF 中の抗 U1RNP 抗体陽性率が有意に高かった (70% vs. 7%、 $P < 0.001$)。また anti-U1RNP index は CSF 中の抗 U1RNP 抗体陽性 (RNA-IPP) 例ではすべての症例で高値 (2.1-13.6) となっていた (表 1)。われわれの症例では、CSF IL-6 や IgG index が必ずしも NPSLE

症例で上昇を示していなかった (表 1)。一方、BBB 傷害の指標である Qalb は NPSLE 症例で、それ以外の CNS 症状症例に比して高値となる症例が高頻度であった。しかし、anti-U1RNP index はこれらのいずれの指標とも相関を示さなかった (図 2)。なお本報告書では示していないが、無菌性髄膜炎を呈した症例では anti-U1RNP index が 4 例中 3 例で治療後に低下していた (結果は図示していない)。

抗 U1RNP 抗体は通常、U1RNP 分子に特異的な蛋白である U1-70K、A、C のいずれかに反応する。anti-U1RNP index と同様に計算した anti-U1-70K index ($= 3.1 \pm 1.8$) は anti-U1-A (1.5 ± 1.2) および U1-C (0.9 ± 0.7) index よりも高値であった (図 3)。すなわち、CSF 中の抗 U1RNP 抗体が血清中の抗 U1RNP 抗体のプロファイルと異なり、全 IgG に比し、抗 U1-70K 抗体がもっとも“濃縮”されていることを示唆する。そこで、CSF 中の抗 U1RNP 抗体が認識する U1-70K のエピトープを、抗原ペプチドを固相化した ELISA で検討した。血清中の抗 U1-70K 抗体は、レトロウイルス p30^{gag} に相同の部分 (aa 59-73) および RNA-binding domain (aa 104-183) を含む多くのペプチドに反応していたのに対し、CSF 中の抗 U1-70K 抗体は p755 の部分 (aa 144-164) にもっとも高頻度に反応性を認めた (図には示していない)。

また RNA-IPP で測定した CSF-抗 U1RNP 抗体陽性 12 例と、陰性 18 例を比較したところ、陽性例で CSF 中の IFN- α 、IP-10、MCP-1、MIG、RANTES、fractalkine が高い傾向を認めた (図 4)。また NPSLE と診断された 24 症例 (CSF-抗 U1RNP 抗体陽性率 = 46%) とステロイド精神病と診断された 6 症例 (同 17%) とを比較すると、MCP-1 が前者で高値であった (281 vs. 151 pg/mL、 $p < 0.05$) (図 5)。

D. 考察

NPSLE およびそれ以外の CNS 症状を呈した抗 U1RNP 抗体陽性 SLE/MCTD 患者の CSF 中の抗核抗体を調べた。本研究で示された第 1 点は、抗 U1RNP 抗体陽性 SLE/MCTD で CNS 症状を発症した場合の CSF-抗 U1RNP 抗体の臨床的意義である。本研究では抗 U1RNP 抗体の検出に関してもっとも特異性が高く、かつ高感度である RNA-IPP を用いたが、陽性例では高頻度に強力な免疫抑制療法を必要としてい

た。一方、しばしば鑑別に苦慮するステロイドによる躁うつ病や CNS 感染症（結核性髄膜炎）、非ステロイド抗炎症薬による無菌性髄膜炎では CSF-抗 U1RNP 抗体は陰性であることが多かった。すなわち CSF 中に抗 U1RNP 抗体が陽性であった場合には原疾患による活動性炎症性の NPSLE と診断できる可能性が高い。また今回新たな指標として提唱した anti-U1RNP index は、いままで報告されてきた CNS 症状の指標とは関連せず、MPSLE に特異的な活動性指標となる可能性がある。

本研究で示された 2 点目は、CSF-抗 U1RNP 抗体が BBB の傷害のみでは説明できず、髄腔内でその産生が刺激されている可能性である。anti-U1RNP index が CSF-抗 U1RNP 抗体陽性のすべての症例で 1 をこえていたことは、抗 U1RNP 抗体が CSF 中で血清中に比し“濃縮”されていることを示唆する。抗 U1RNP 抗体は血清中に高力価で存在するために BBB の傷害により髄腔内に流入する可能性があるが、それだけではこのように“濃縮”される可能性は低い。また anti-U1RNP index と Qalb の値との相関が全く認められなかったこと、anti-U1-A および UI-C index に比し、anti-U1-70K index が高値であったことは U1-70K 蛋白が抗 U1RNP 抗体の髄腔内での産生を刺激した可能性を支持する。さらに CSF 中の抗 U1-70K 抗体の主要抗原エпитープ (p755, aa 141-164) は、T 細胞 (aa 131-151) および B 細胞エпитープ (aa 104-183) としてすでに報告されている部位、すなわち RNA-binding domain と一部あるいはすべてが重複していた。したがって、CSF 中の抗 U1RNP 抗体の産生が BBB を通して流れ込んできた B 細胞の非特異的な活性化によるとは考えにくく、局所で新規に誘導された可能性が高いと考える。

近年、抗 U1RNP 抗体が形成する免疫複合体は、I 型インターフェロンである IFN- α の inducer として注目されている。また血中 IFN- α 濃度は U1RNP を含む RNA-binding protein (RBP) に対する抗体 (抗 RBP 抗体) や全身性エリテマトーデス (SLE) の皮膚症状や腎障害と関連するため、ヒト SLE でも IFN- α は病因的なサイトカインのひとつと考えられている。一方、NPSLE に関連する液性因子としていくつかのサイトカインやケモカインが報告されている。CSF 中で測定された IFN- α 、IL-8、IP-10、MCP-1、MIG、

RANTES、fractalkine が、CNS 症状のない SLE に比し NPSLE 患者で有意に高いとされている。また興味深いことに、これらの液性因子のうち IFN- α 、IL-8、IP-10、MCP-1 は、CSF から精製された IgG と細胞核成分を混合して作成した免疫複合体によりヒト PBMC から分泌が刺激されることが報告されている。今回の成績から、特に血清-抗 U1RNP 抗体陽性 NPSLE 患者において、CSF-抗 U1RNP 抗体と MCP-1 をはじめとしたケモカイン、および IFN- α が関連する可能性がある。しかし、NPSLE の病態は多彩で、それらが混在する可能性があり、また臨床的にステロイド精神病との鑑別がきわめて難しい（あるいは混在する）症例が少なからず存在する。今後さらに検討症例数を増やし、他の抗核抗体も含めて検討した上で、より均一の病態に対する CSF-抗 U1RNP 抗体の臨床的意義を明確にしたい。

抗 U1RNP 抗体の病因的意義については以前から検討されてきた。本班会議でも、大川らが抗 U1RNP 抗体や抗 dsDNA 抗体が末梢血単核球細胞の IL-1 α 、IL-1 β および IL-6 の産生を刺激することを示し、特に抗 U1RNP 抗体は Fab 部のみでも IL-1 α 産生の亢進を認めることを報告してきた。さらにヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC) でも抗 U1RNP 抗体や抗 dsDNA 抗体が ICAM-1、ELAM-1、MHC calss II などの発現を増強させることを証明している。しかし脳組織においては、NPSLE 患者で IgG や免疫複合体の沈着が証明されないため、抗 U1RNP 抗体が直接組織傷害を誘導したり、抗 U1RNP 抗体単独で病原性を示したりする可能性は低いと考えている。すなわち、今回 CSF 中に見いだされた抗 U1RNP 抗体は、CNS 細胞の傷害により細胞外へ移動した U1-70K が抗原刺激となり、活性化されたリンパ球が抗 U1RNP 抗体を産生したというシナリオが考えられる。今後、本班会議で分離したモノクローナル抗体を用いて、抗 U1RNP 抗体あるいは抗 U1-70K 抗体が CNS にいかなる影響を及ぼすかを検討してみたい。

E. 結論

抗 U1RNP 抗体陽性 NPSLE 患者において、CSF 中の抗 U1RNP 抗体は病因的意義を有する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujita Y, Fujii T, et al. Aseptic meningitis in mixed connective tissue disease: cytokine and anti-U1RNP antibodies in cerebrospinal fluids from two different cases. *Mod Rheumatol* 2008; 18: 184-188.
2. Sato T, Fujii T, et al. Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 3730-3740, 2010.

2. 学会発表

1. Sato T, Fujii T, et al. Characterization of monoclonal anti-U1RNP-70K antibodies derived from lupus-prone mice. The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Yokohama, September 2008.
2. 藤井 隆夫. 関節リウマチ診療における自己抗体の有用性. 第53回日本リウマチ学会総会シンポジウム. 2009年4月、横浜.
3. Yukawa N, Fujii T, Kawabata D, Nojima T, Ohmura K, Usui T, Mimori T. Correlation of antinuclear antibodies and anti-DNA antibodies with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. EULAR, Rome, June 2010.

H. 知的財産権の出現・登録状況

なし

表 1. 活動性炎症性 CNS 症状 (NPSLE) を呈した SLE/MCTD 患者

age	Dx.	CSF			IgG index	CNS manifestations
		Cell /3μl	Protein mg/dl	IL-6 pg/ml		
1	32 SLE	<u>43</u>	<u>128</u>	<u>1190</u>	<u>0.80</u>	Aseptic meningitis
2	30 SLE	<u>15</u>	31	3.19	<u>0.76</u>	Aseptic meningitis, Cognitive dysfunction
3	29 MCTD	<u>33</u>	<u>81</u>	<u>3240</u>	<u>0.72</u>	Aseptic meningitis
4	20 SLE	1	<u>48</u>	2.31	0.62	Cognitive dysfunction, Psychosis
5	39 SLE	<u>13</u>	20	1.85	0.61	Movement disorder, Headache
6	40 MCTD	<u>121</u>	<u>155</u>	<u>837</u>	0.59	Aseptic meningitis, Cognitive dysfunction
7	43 MCTD	8	<u>49</u>	1.48	<u>0.77</u>	Psychosis
8	22 SLE	<u>97</u>	<u>132</u>	<u>7.8</u>	<u>0.77</u>	Acute confusional state Cerebrovascular disease
9	32 SLE	1	14	N.D.	<u>0.89</u>	Headache
10	26 SLE	<u>10</u>	29	<u>644</u>	<u>0.83</u>	Psychosis, Headache
11	41 SLE	8	<u>119</u>	N.D.	<u>0.68</u>	Demyelinating syndrome
12	56 SLE	2	35	1.99	<u>0.68</u>	Headache
13	29 SLE	3	<u>52</u>	N.D.	0.65	Acute confusional state, Psychosis

Treatments		serum ANA	CSF ANA	Anti-U1RNP C/S ratio	Qalbumin (x10 ³)
1	mPSL pulse, high-dose CS	U1RNP, DNA, SSA, SSB	U1RNP, SSA	2.1	18.6
2	mPSL pulse, high-dose CS cyclosporine A, IVCY	U1RNP, DNA, SSA Sm, tRNA, Ribo P	U1RNP, SSA	12.4	3.7
3	high-dose corticosteroids	U1RNP, SSA, Ribo P	U1RNP, SSA	9.4	15.7
4	mPSL pulse, IVCY DFPP, rituximab	U1RNP, Sm, SSA Ribo P	U1RNP	7.6	8.1
5	mPSL pulse, high-dose CS	U1RNP, SSA	U1RNP	2.1	2.8
6	high-dose CS, IVCY	U1RNP, DNA	U1RNP	3.0	30.3
7	mPSL pulse, high-dose CS, IVCY	U1RNP, U2RNP	U1RNP	8.8	7.3
8	high-dose CS, IVCY	U1RNP, Sm, Ribo P	U1RNP	2.2	20.4
9	high-dose CS	U1RNP, DNA, Sm,	U1RNP	13.6	1.9
10	high-dose CS	U1RNP, SSA	Neg	N.D.	8.6
11	high-dose CS, IVCY	DNA, SSA,	DNA	N.D.	1.9
12	mPSL pulse	DNA	Neg	N.D.	4.5
13	high-dose CS, rituximab	Neg	Neg	N.D.	9.5

CS, corticosteroids; IVCY, intravenous cyclophosphamide; N.D., not determined

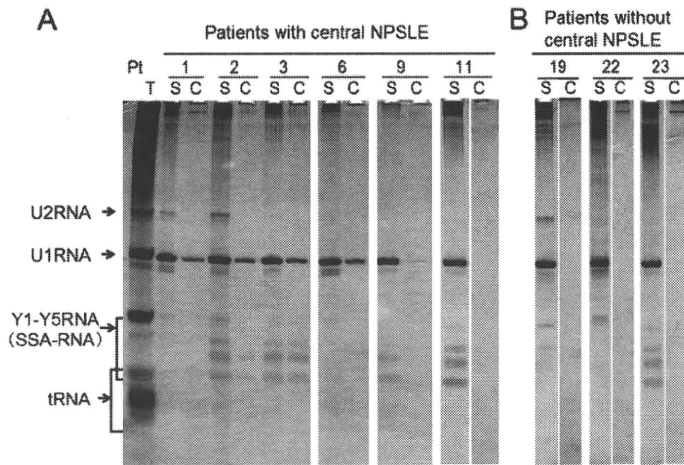


図1. RNA-免疫沈降法で検出したCSF-抗核抗体

A. 血清抗U1RNP抗体陽性NPSLE患者では、高率にCSF中でも抗U1RNP抗体が検出(U1-RNAが沈降)された。また抗SS-A抗体の併存が認められた(SSA-RNAが沈降)患者も存在した。B. CNS症状が他の原因(19:結核性髄膜炎、22:ステロイド精神病、23:NSAID髄膜炎)による場合には血清中で抗U1RNP抗体が陽性であってもCSF中では陰性であった。S=血清、C=CSF

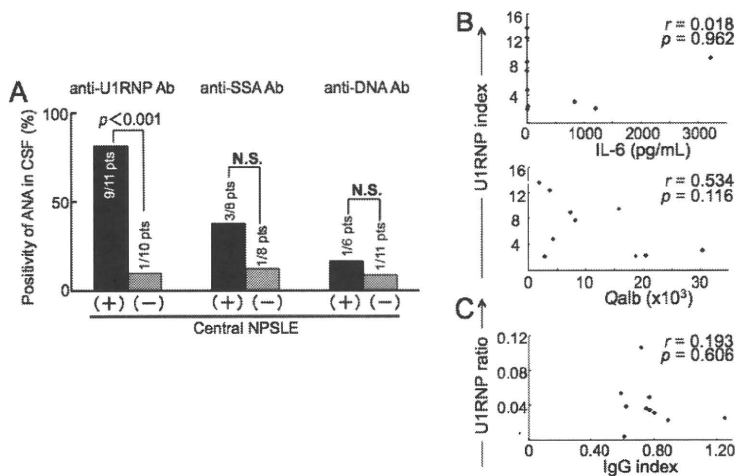


図2. CSF-抗U1RNP抗体の陽性頻度とAnti-U1RNP index

A. 抗U1RNP抗体は、他の抗核抗体と異なりNPSLE患者ではCSF中でも有意に高頻度に認められた。B. またanti-U1RNP indexは既存のCNSマーカーであるIgG index、血液脳関門の傷害指標であるQalbを相関がなかった。C. さらにanti-U1RNP ratioはIgG indexとの相関しなかったことから、CSF-抗U1RNP抗体はNPSLEの新たなマーカーとなる可能性が示唆された。

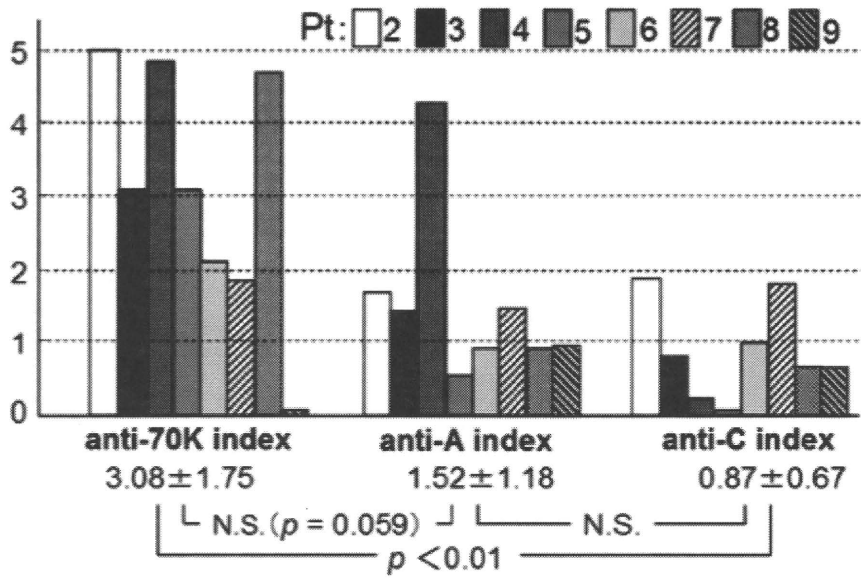


図3. CSF-抗U1RNP抗体が反応するU1RNP特異蛋白

U1-70K、A、C蛋白を固相化したELISAによって、血清とCSFのそれらに対する抗体価を調べ、anti-U1RNP indexと同様にanti-70K、A、C indexを計算した。CSF中の抗U1RNP抗体は抗70K抗体が有意であることが示された。

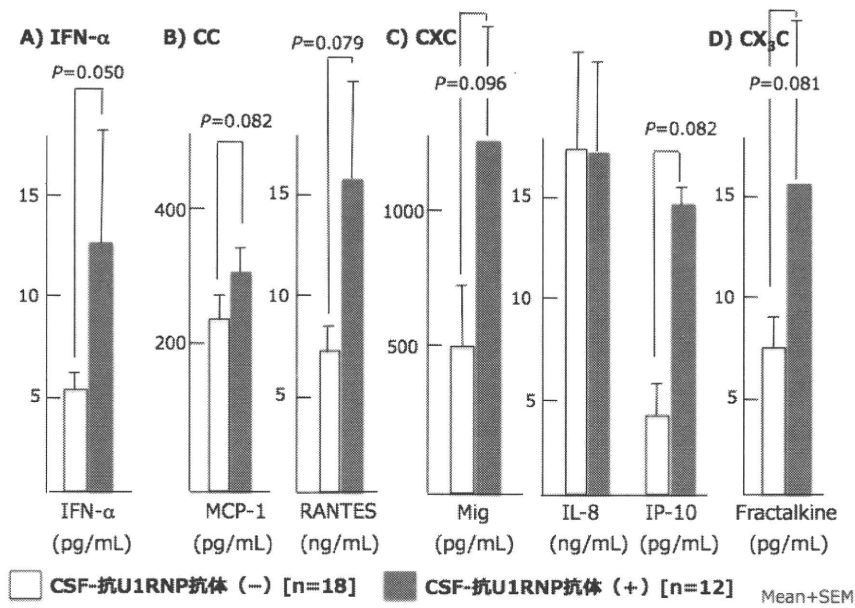


図4. CSF-抗U1RNP抗体とCSF中の液性因子

いずれも有意差は認めなかったが、RNA-免疫沈降法で検出したCSF-抗U1RNP抗体陽性患者でCSF中IFN- α や多くのケモカインが高い傾向を示した。ただしIL-8は差が認められなかった。

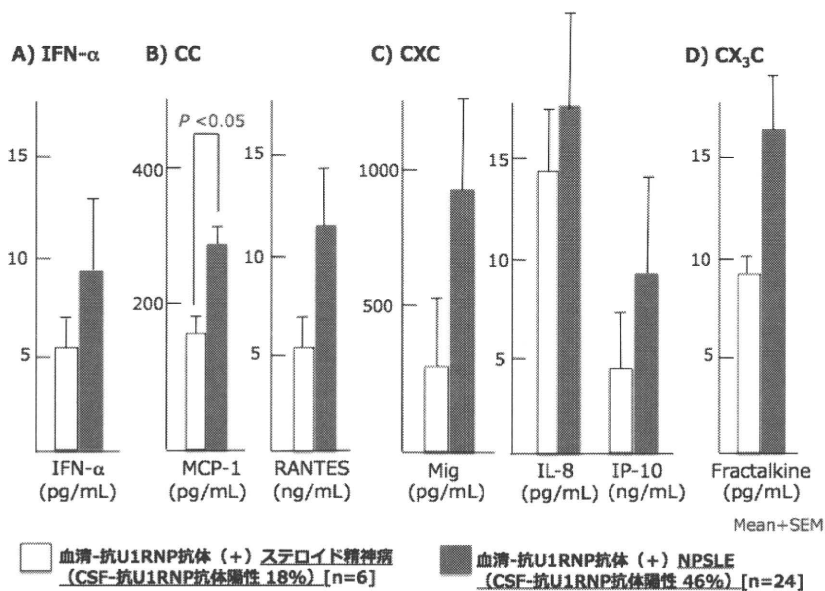


図5. 血清-抗U1RNP抗体陽性NPSLEにおけるCSF中の液性因子

臨床的にステロイド精神病と診断された患者に比し、NPSLE患者ではCSF中MCP-1が有意に高濃度であった。

混合性結合組織病(MCTD)にともなう肺高血圧症(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。AECAの抗原を二次元電気泳動とウェスタンブロット、質量分析を用いて解析した結果、約20の抗原候補蛋白質を得ることができた。また、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) から調製した蛋白質を二次元電気泳動で展開し、PVDFに転写後、ウェスタンブロットを行った (2Dウェスタン)。MCTD患者血清と強く反応したスポットの抗原候補

蛋白質をMALDI-TOF MSやLC-MS/MSで同定した。一方で、HMVEC-L由来の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ェ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

2Dウェスタンと質量分析により、20個の抗原候補蛋白質が同定できた。同定できた蛋白質にはU1RNPも含まれており、組換え蛋白質が患者血清と高く反

応する候補も得られた(図1)。また、ライブラリーを用いたイムノスクリーニングにより(図2)、3x10⁵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。この中にはSNRPFも含まれていた。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3)、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4)。

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やcoiled-coilドメインを持つ蛋白質も含まれていた。MCTDのAECAの抗原の候補を得ることはできたが、今回の方法では肺の微小血管に特異的な抗原を明らかにすることはできなかった。現在、HMVEC-Lとヒト臍帯静脈血管内皮細胞とヒト皮膚血管内皮細胞のサブトラクションライブラリーを構築し、肺血管内皮細胞に特異的な抗原を探索している。

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

1. 論文発表

1) Takamiya M, Fujita S, Niitsu H, Aoki Y, Kanno H, Sawai T: A Case of Takayasu arteritis complicated by right atrium perforation and injuries of the right common iliac artery and vein caused by cannulation for percutaneous cardiopulmonary support. Am J

Forensic Med Pathol. 31(1):72-6(2010)

- 2) Yamauchi K, Sasaki N, Niisato M, Kamataki A, Shikanai T, Nakamura Y, Kobayashi H, Suwabe A, Kanno H, Sawai T and Inoue H: Analysis of pulmonary allergic vasculitis with eosinophil infiltration in asthma model of mice. Exp Lung Res. 36: 227-36(2010)
- 3) Kurose R, Ichinohe S, Tajima G, Horiuchi S, Kurose A, Sawai T, Shimamura T: Characterization of human synovial fluid cells of 26 patients with osteoarthritis knee for cartilage repair therapy. Int J Rheum Dis. 13(1):68-74(2010)
- 4) 三又義訓、鎌滝章央、及川伸也、村上賢也、澤井高志：関節リウマチ患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞に対するIL-6刺激による蛋白分解酵素ADAMTS-4とADAMTS-5の発現の変化の解析. 岩手医誌. 62(2): 85-94(2010)
- 5) 及川伸也、鎌滝章央、三又義訓、村上賢也、澤井高志：関節リウマチ滑膜におけるBv8の発現. 岩手医誌. 62(1): 37-45(2010)
- 5) 石黒直樹、岩館克治、澤井高志：実験的変形性膝関節症に対する高分子量ヒアルロン酸(平均分子量270万HA)スベニールと架橋型ヒアルロン酸(Hylan G-F20)SYNVISCの作用比較. 関節外科. 29(12): 112-124(2010)
- 6) 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(3): 224-233(2010)
- 7) 村上賢也、鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志：関節破壊の病理組織学的特徴. 日本臨床68(増刊号5)「関節リウマチ(第2版)－寛解を目指す治療の新時代－」: 65-70(2010)
- 8) 宇月美和、鎌滝章央、佐々木喜子、徳永勢二、澤井高志：関節リウマチにおけるヒアルロン酸の合成と分解について. 臨床リウマチ. 22: 337-43(2010)
- 9) 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)
- 10) 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