

Health Impact Profile) の日本語版 (OHIP-J) を基に、SS の口腔内病変の評価において有用性が報告されている (Stewart CM, et al. J Am Dent Assoc. 139: 291-299, 2008) OHIP-14 による問診法を実施した。14 の質問項目に対する回答はそれぞれ「まったくない」=0、「ほとんどない」=1、「時々」=2、「しばしば」=3、「いつも」=4 と数値化され、そのスコア値を合算した値を口腔内 QOL スコアとして算出した。(/56 点満点)

(3) 統計学的解析

ガム試験で得られた刺激下全唾液の質量 (ml/10 分)、唾液中 EGF 濃度と同総量および OHIP-14 による問診法で得られた口腔内 QOL スコアの関連性について統計学的解析を行い検討した。各群の比較には Mann-Whitney U 検定、Fisher 直接確立試験を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。尚、数的データは平均値 ± 標準偏差 (SD) で示す。

(4) 病理組織学的評価

SS の診断目的で得られた口唇小唾液生検標本を用い EGF の発現を免疫学的染色によって評価した。対象は SS 症例 6 例、非 SS 症例 6 例である。SS 症例は本邦厚生省研究班による改訂診断基準 (1999 年) およびアメリカ-ヨーロッパ基準 (2002 年) をともに満たす 1° SS 症例とし、非 SS 症例は口渇を訴えたが、SS 診断基準を満たさなかつた症例とした。SS 群は全例が女性、非 SS 群は男性 1 例、女性 5 例であった ($p=1$)。Greenspan 分類に基づく grade は SS 群は全例が grade. 4、非 SS 群は全例が grade. 1 であった。年齢 (口唇小唾液腺生検実施時) は SS 群 55.33 ± 6.83 才 (47-64)、非 SS 群 49.00 ± 14.42 才 (31-70) で有意差は無く ($p=0.18$)、唾液量 (口唇小唾液腺生検実施時) は SS 群 7.33 ± 4.88 ml/10 分 (2.0-15.74)、非 SS 群 17.68 ± 6.79 ml/10 分 (11-27) と SS 群で唾液量は有意に少なかった ($p=0.01$)。尚、免疫学的染色において EGF 発現の評価に関しては 1 次抗体として rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)、2 次抗体として Vectastain Elite ABC rabbit IgG kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を用い、コントロールとして normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) を用いた。

(倫理面への配慮)

当科診療において、18 才以上の同意が得られる SS 患者および対照群として健常者を含めた非 SS 患者を対象とする。外来または入院患者の診療において担当医は患者に説明文書を基に研究内容について十分な説明を行い、文書による同意を得る。20 才未満の患者では本人および代諾者の文書による同意を得る。原則として同意が得られた患者を対象とした研究であり、インフォームド・コンセントが得られない認知症や精神疾患などに罹患している患者は含まない。また、18 才

未満の患者も対象としない。同意が得られた患者の臨床情報を収集し、患者名および患者 ID 番号と関連しない登録 ID 番号を付けることで匿名化を行い、またそのデータはパスワード管理とし、パスワードは研究分担者および研究協力者が管理する。この登録 ID 番号化は連結可能匿名化であるが、登録 ID 以降の統計処理などにおいては患者の個人情報特定することは一切できないため患者の個人情報は最大限守られる。また、研究を完全に終了する場合 (引き継がれない場合) は、臨床情報を完全に削除する。その場合も、既に匿名化はなされており、個人情報保護の点で問題はない。

本研究は診療時に得られた臨床情報とその解析による観察研究のみであり、患者に対して直接的不利益が及ぶことはない。費用面についてもガム試験、問診票を用いた試験ともに費用は一切発生しない。唾液中 EGF の測定、口唇小唾液腺生検標本を用いた免疫学的染色による EGF 発現の評価については当科で購入した測定キットおよび試薬を用い、研究分担者または研究協力者が測定するため、これらについても患者負担となる費用は一切発生しない。その他、SS に関する診療において必要とされる検査、治療についての患者負担費用は従来通り保険診療内での支払いとなる。

尚、本研究は兵庫医科大学倫理委員会で審査を受け、承認を得ている (第 758 号)。

C. 研究結果

SS 群の年齢は 55.35 ± 13.82 才 (29-81)、性別は男性 3 人、女性 37 人、非 SS 群は 56.09 ± 17.39 才 (31-82)、男性 5 人、女性 18 才であり、ともに有意差はなかった ($p=0.43$, $p=0.13$)。SS 群の罹病期間は 5.60 ± 3.70 年 (0.2-12) であった。

SS 群では非 SS 群に比べ唾液量が有意に少なく (7.82 ± 4.44 ml/10 分 vs 16.89 ± 5.92 ml/10 分; $p < 0.0001$)、OHIP-14 スコアが高値 (11.34 ± 9.37 点 vs 7.09 ± 7.64 点; $p=0.04$)、つまり口腔内 QOL が悪いという結果であった。唾液中 EGF に関しては、SS 群では非 SS 群に比べ唾液中 EGF 濃度が有意に高く (1109.38 ± 852.26 pg/ml vs 778.49 ± 371.88 pg/ml; $p=0.04$)、唾液中 EGF 量は SS 群で有意に低値 (9237.56 ± 8447.02 pg/10 分 vs 13296.85 ± 7907.15 pg/10 分; $p=0.03$) であった。

【1】口腔内 QOL の程度による SS 群の二群化

SS 群には口腔内病変・QOL の低下の程度が強い症例と軽い症例が混在するため、OHIP-14 問診法による口腔内 QOL スコアに基づき二群化した。OHIP-14 問診法で全項目に 1 点の回答をした場合 14 点となるため、暫定的に 14 点以上を「重症群」($n=14$)、13 点以下を「軽症群」($n=21$) と設定した。

重症群で年齢が有意に高かった (61.50 ± 10.38 才 vs 52.71 ± 13.95 才; $p=0.03$)。唾液量は重症群 (6.90 ± 4.18 ml/10 分)、軽症群 (9.26 ± 4.41 ml/10 分) とも非 SS 群 (16.89 ± 5.92 ml/10 分) より有意に低

値 ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$) であった。重症群は軽症群より罹病期間が長く (7.19 ± 3.68 年 vs 4.90 ± 3.60 年)、唾液量が少ない傾向であったが、それぞれ有意差はなかった ($p = 0.08$, $p = 0.06$)。

唾液中 EGF に関しては、重症群は軽症群に比べ唾液中 EGF 濃度および EGF 量が有意に低値であった (888.92 ± 564.51 pg/ml vs 1392.49 ± 991.51 pg/ml; $p = 0.048$, 6965.77 ± 6161.13 pg/10 分 vs 12275.71 ± 9420.04 pg/10 分; $p = 0.04$)。重症群は非 SS 群と比べて EGF 濃度に差が無く (888.92 ± 564.51 pg/ml vs 778.49 ± 371.88 pg/ml; $p = 0.24$)、EGF 量が有意に低値であった (6965.77 ± 6161.13 pg/10 分 vs 13296.85 ± 7907.15 pg/10 分; $p = 0.008$)。軽症群は非 SS 群と比べて EGF 濃度は有意に高く ($p = 0.004$)、EGF 量に差は無かった ($p = 0.35$)。

【2】罹病期間による SS 群の二群化

SS 群には罹病期間の長い症例と短い症例が混在する。平均罹病期間が 5.6 年であったため、暫定的に 5.6 年以上を「長期群」($n = 11$)、5.6 年未満を「早期群」($n = 13$) と設定し二群化した。平均罹病期間は長期群で 9.18 ± 1.83 年 (7-12)、早期群で 2.57 ± 1.30 年 (0.2-5) であり、年齢は長期群で 63.91 ± 5.89 才 (57-77)、早期群で 53.23 ± 12.99 才 (37-81) であり、長期群で有意に高齢であった ($p = 0.01$) が、長期群、早期群ともに非 SS 群 (56.09 ± 17.39 才 (31-82)) と比して有意差はなかった ($p = 0.08$, $p = 0.30$)

長期群は非 SS 群より OHIP-14 スコアが有意に高値 (口腔内 QOL が悪い) であった (13.91 ± 10.78 点 vs 7.09 ± 7.64 点; $p = 0.02$)。しかし、早期群と非 SS 群の間に OHIP-14 スコアの差はなかった (8.46 ± 6.59 点 vs 7.09 ± 7.64 点; $p = 0.28$)。唾液量は長期群 (4.69 ± 2.41 ml/10 分) は早期群 (9.07 ± 5.68 ml/10 分) および非 SS 群 (16.89 ± 5.92 ml/10 分)、早期群は非 SS 群と比してそれぞれ有意に低値であった ($p = 0.01$, $p < 0.0001$, $p = 0.0002$)。

唾液中 EGF に関しては、長期群は唾液中 EGF 濃度および EGF 総量が早期群より有意に低値であった (758.97 ± 646.53 pg/ml vs 1513.44 ± 1058.19 pg/ml; $p = 0.03$, 4087.21 ± 4356.74 pg/10 分 vs 13881.34 ± 10480.22 pg/10 分; $p = 0.004$)。長期群は非 SS 群と比べて EGF 濃度に差が無く (758.97 ± 646.53 pg/ml vs 778.49 ± 371.88 pg/ml; $p = 0.46$)、EGF 量が有意に低値であった (4087.21 ± 4356.74 pg/10 分 vs 13296.85 ± 7907.15 pg/10 分; $p = 0.0005$)。早期群は非 SS 群と比べて EGF 濃度は有意に高く ($p = 0.002$)、EGF 量に差は無かった ($p = 0.43$)。

【3】免疫学的染色による病理組織学的評価

非 SS 群では主に導管上皮に EGF の発現を認めた。発症早期 (罹病期間 1-2 年) の SS 症例では導管周囲に多数のリンパ球浸潤を認めたが、非 SS 群と同様に導管上皮に EGF の発現を認めた。しかし、発症後長期間 (15

年) が経過し、拡張し、周囲に著明な線維化を伴う導管では EGF の発現は認められなかった。

D. 考察

難治性口内炎患者や頭頸部への放射線照射に伴う口腔粘膜障害を呈した患者において唾液中 EGF 濃度が低下しているという既存報告 (Ino M, et al. Acta Otolaryngol. Suppl. 500, 126-130, 1993., Epstein JB, et al. Cancer. 89, 2258-2265, 2000., Herman BD, et al. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 89, 710-716, 2000., Adisen E, et al. Dermatology. 217, 235-240, 2008.) があり、口腔粘膜障害と唾液中 EGF の間に強い関連性があると考えられているが、SS 患者での解析はこれまでなされていない。

唾液中 EGF の動態は口腔内病変軽症群と発症早期群、重症群と長期群で類似していた。SS では発症早期から唾液分泌量は低下しているが、発症早期には唾液中 EGF 濃度および量の減少や口腔内 QOL の低下は見られない。罹病期間の長期化とともに唾液分泌量減少の進行に加え唾液中 EGF 濃度および量の減少が見られるようになり、また口腔内 QOL が有意に低下する。口腔内 QOL 低下が強い群 (重症群) は軽症群と比べて唾液分泌量は少ないものの有意差はなく、一方で唾液中 EGF 濃度・量ともに重症群は軽症群に比べ有意に低いことから、SS での口腔内 QOL 低下は早期から生じる唾液量低下だけでなく、口腔内粘膜修復に重要な役割を果たすはずの唾液中 EGF が進行とともに減少することが大きく関わると考えられた。免疫学的染色による唾液腺における EGF 発現様式の評価で得られた罹病期間の長い症例で EGF 発現が低下していたという結果はそれを支持するものと考ええる。

SS 症例において口腔内病変の形成やそれに伴う種々の自覚症状、QOL の低下に対して EGF を含嗽などにより口腔内に「補充」することで改善効果を得ることができる期待を抱くことができ、そこに治療介入のポイントが得られないかの検討を今後要すると考える。

E. 結論

SS では唾棄量分泌の低下が発症早期から見られ、進行とともに遅れて唾液中 EGF 分泌量が低下する。この唾液中 EGF の低下という唾液の「質」の低下が加わることで SS における口腔内 QOL の低下が明らかに増強すると考えられる。

F. 健康危険情報

該当する特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

論文化による本研究成果の公表は現時点では行っていない。

2. 学会発表

#1 東直人、片田圭宣、北野幸恵、西岡亜紀、関口昌弘、北野将康、松井聖、佐野統、シェーグレン症候

群における口腔内病変と唾液中 EGF の関係. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会／東京都／2011 年 11 月 10 日 (アレルギー. 60 (9-10) ; 1327, 2011)

2 東直人、片田圭宣、北野幸恵、西岡亜紀、関口昌弘、北野将康、松井聖、佐野統. シェーグレン症候群における口腔内病変と唾液中 EGF の関係. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会／東京都／2012 年 4 月 26 日 (日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集. 317, 2012)

3 東直人. シェーグレン症候群における口腔内病変と唾液中 EGF の関係. 第 21 回日本シェーグレン症候群学会学術集会／京都府／2012 年 9 月 7 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当する特記事項なし。

2. 実用新案登録

該当する特記事項なし。

3. その他

該当する特記事項なし。

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

シェーグレン症候群におけるダイオキシンを介した EBV 再活性化の関与
に関する研究

研究分担者 齋藤一郎 鶴見大学歯学部病理学講座 教授
研究協力者 井上裕子 鶴見大学歯学部病理学講座 准教授

研究要旨

ダイオキシンは性ホルモン様作用を示すほか、癌や自己免疫疾患の発症に関与している事が報告されている。また、Epstein-Barr virus (EB ウイルス) の再活性化はシェーグレン症候群をはじめとする自己免疫疾患の発症に関与している可能性が報告されている。本課題では EB ウイルス再活性化の指標となる BZLF1 遺伝子のプロモーターアッセイを行い、ダイオキシンレセプター (AhR) を介した転写活性化を確認し、BZLF1 mRNA の発現、EB ウイルスの複製を real time PCR 法で確認した。さらに、シェーグレン症候群患者唾液を用いてプロモーターアッセイを行った結果、患者唾液中には AhR を活性化し BZLF1 の転写を促進する因子が含まれており、これらの活性と血清中の自己抗体である抗 SSB/La 抗体価に正の相関があることを明らかにした。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質として知られるダイオキシンは性ホルモン様作用を示すほか、癌や自己免疫疾患を誘発するなど様々な生体への影響が報告されているが、ヒトの病態形成への関連については不明の点が多い。一方、Epstein-Barr virus (EB ウイルス) は健常人の大半が潜伏感染しており、その再活性化は、慢性疲労症候群、悪性腫瘍、シェーグレン症候群 (SS) をはじめとした自己免疫疾患の発症に関与していることが報告されているが、生体内における活性化因子は不明である。これらのことから本課題ではダイオキシン類による EB ウイルス再活性化の可能性を検討し、SS 患者唾液を用いた検討でダイオキシン類の SS の病態形成への関与について解析を行った。

B. 研究方法

細胞は EB ウイルス陽性 B 細胞株である P3HR1 および B95-8 と唾液腺上皮細胞株 (HSY) を用いた。EB ウイルスの再活性化に必須な遺伝子である BZLF1 のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポータープラスミド (Zp) を作成し、各細胞に遺伝子導入した後ダイオキシンによる Zp 活性を指標に EB ウイルス再活性化の可能性を検討した。BZLF1 および BRLF1 の mRNA 発現ならびに EB ウイルスの Genomic DNA の量について real time

PCR 法により検討を行った。また、SS におけるダイオキシン類の作用を検討するために、AhR の標的遺伝子である CYP1A1 プロモーター活性を指標に SS 患者唾液中の AhR 活性化因子の解析を行った。また、エストロゲンの作用を検討するために、エストロゲン受容体 (ER) の発現プラスミドを細胞に遺伝子導入し同様の検討を行った。

C. 研究結果

P3HR1 および B95-8 細胞は TPA 刺激により活性化した条件下で TCDD により Zp 活性増強ならびに BZLF1 の mRNA 発現、EB ウイルス DNA の複製も real time PCR 法により確認できた。さらに HSY 細胞でも TCDD により Zp 活性の増強が認められ、開始コドンの上流 130bp に活性化 AhR の結合サイトがあることをプロモーター活性および EMSA 法により確認した。次に SS 患者唾液を用いて同様の検討を行った結果、SS 患者唾液は健常人や SS 以外のドライマウス患者の唾液と比べて有意に高い Zp 活性を示し、AhR の標的遺伝子である CYP1A1 活性の増強も検出された。さらにこれら両者の活性には正の相関が認められ、また、SS 患者血清中の自己抗体、抗 SSA/Ro 抗体と抗 SSB/La 抗体について解析を行ったところ、抗 SSA/Ro 抗体は Zp 活性と相関は得られなかったが抗 SSB/La 抗体に正の相関が確認できた。さらに女性ホルモンのエストロ

ゲンにより、Zp 活性は抑制される傾向が認められた。ダイオキシンによる Zp 活性化へのエストロゲンやフィトエストロゲンによる作用について、現在検討中である。

D. 考察

ダイオキシンなどのリガンドにより活性化された AhR は EB ウイルス潜伏感染した B 細胞や唾液腺上皮細胞に作用して、ウイルスの早初期蛋白であり、再活性化に必須な遺伝子 BZLF1 の転写促進し、EB ウイルス再活性化を誘導する可能性が示唆された。また、SS 患者唾液は AhR の標的遺伝子である CYP1A1 のプロモーター活性を増強させたことから、患者唾液中にダイオキシン様の AhR 活性化因子が存在し、それらが BZLF1 のプロモーターを活性化し、転写を促進することで EB ウイルスの再活性化が誘導され、SS の病態に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。さらに抗 SSB/La 抗体と Zp 活性に正の相関が認められ、EB ウイルスの再活性化が自己抗体の産生に関与している可能性も示唆された。SSB/La は生体内で EB ウイルスの小 RNA である EBER と複合体を形成する事が知られていることから、この複合体が免疫応答を惹起している可能性も考えられた。予備的検討でエストロゲンが Zp 活性を抑制したことから、ダイオキシンによる EB ウイルス再活性化をエストロゲンが抑制的に働くことも推測された。

E. 結論

SS 患者唾液中に存在する AhR 活性化因子が EB ウイルスの再活性化を誘導した結果 EB ウイルスの複製が起こり、自己抗体の産生などの病態形成に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue H, Mishima K, Yamamoto-Yoshida S, Ushikoshi-Nakayama R, Nakagawa Y, Yamamoto K, Ryo K, Ide F, Saito I. Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Induction of EBV Reactivation as a Risk Factor for Sjogren's Syndrome. *J Immunol* 2012, 188:4654-4662
- 2) Mishima K, Inoue H, Nishiyama T, Mabuchi Y, Amano Y, Ide F, Matsui M, Yamada H, Yamamoto G, Tanaka J, Yasuhara R, Sakurai T, Lee MC, Chiba K, Sumimoto H, Kawakami Y, Matsuzaki Y, Tsubota K, Saito I. Transplantation of

side population cells restores the function of damaged exocrine glands through clusterin. *Stem Cells* 2012, 30:1925-1937

- 3) Ooka H, Kanda S, Okazaki H, Suzuki H, Mishima K, Saito I., Yagi M, Tomoda K, Nishiyama T. Characterization of side population (SP) cells in murine cochlear nucleus. *Acta oto-laryngologica.* 2012, 132:693-701
- 4) Okamoto M.R., Kamoi M., Yamachika S., Tsurumoto A., Imamura T., Yamamoto K., Kadomatsu S., Saito I., Maeda N., Nakagawa Y. Efficacy of Fungiflora Y staining for the diagnosis of oral erythematous candidiasis. *Gerodontology* 2012, 5:1-6
- 5) Kobayashi S., Kawakita T., Kawashima M., Okada N., Mishima K., Saito I., Ito M., Shimmura S., Tsubota K. Characterization of cultivated murine lacrimal gland epithelial cells. *Mol. Vis.* 2012, 18:1271-1277

2. 学会発表

第 21 回日本シェーグレン学会 シンポジウム「シェーグレン症候群における aryl hydrocarbon 受容体を介した EB ウイルス再活性化機構の解明」井上裕子

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

シェーグレン症候群様病態を示す慢性移植片対宿主病マウスモデルの
加齢的解析に関する研究

研究分担者 坪田一男 慶應義塾大学医学部眼科 教授
研究協力者 小川葉子 慶應義塾大学医学部眼科 特任准教授

研究要旨

本研究ではシェーグレン症候群様病態を示すマウスモデルの加齢的解析しその病態を追及することを目的とする。8週齢 B10.D2 (H-2d) マウスの全骨髄細胞を採取し、BALB/c (H-2d) マウスに移植した。移植後レシピエントにおける涙液産生能、涙腺組織の酸化ストレスマーカーと老化マーカーの発現を検討した。シェーグレン症候群様のドライアイを示すマウスモデルと老齢マウスでは類似した線維化の進行を認めた。同様に涙腺における酸化ストレスマーカーおよび老化マーカー発現を認めた。ドライアイ、および涙腺炎症の経時的進展と加齢的变化にかかわる病態の解析をしシェーグレン症候群に関連する病態解明を目標とする

A. 研究目的

造血幹細胞移植後に発症する慢性移植片対宿主病ではシェーグレン症候群に極めて類似したドライアイが発症し、涙腺、角結膜を含めた粘膜、外分泌腺の機能不全を引き起こす。本研究ではシェーグレン症候群様病態を示すマウスモデルの加齢的解析しその病態を追及することを目的とする。

B. 研究方法

8週齢 B10.D2 (H-2d) マウスの全骨髄細胞を採取し、放射線照射後の BALB/c (H-2d) マウスに移植した。移植後3週後と8週後のレシピエントにおける涙液産生能、涙腺組織における病理組織像、酸化ストレスマーカーと老化マーカーの発現を検討し、さらに超微形態を含めた組織学的解析にて、コントロールと比較して評価した。

酸化ストレスマーカーには 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG), 4-hydroxy-2-nonenal histidine (4-HNE) と hexanoyl lysine (HEL) の発現の検討をした。老化のマーカーとして p16, p38 を検討した。線維化の評価は涙腺組織切片を用い mallory 染色を施行し線維化の面積を定量的に比較した。電子顕微鏡による超微形態の検討では特に老化に深く関与するミトコンドリア及びリポフスチンに注目して形態変化、数の変化を検討した。以上の検討項目を syngeneic 移植コントロール、老齢マウス、若年齢マウスと比較検討した。

(倫理面への配慮)

慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインの諸規定に従い動物福祉の精神の沿った、科学的な動物実験が行われるよう配慮している。動物実験のプロトコールを作成して、学内の動物実験委員会の承認を得ている。(承認番

号 09152)

C. 研究結果

骨髄移植後レシピエントマウスはシェーグレン症候群に類似した自己免疫疾患様病態を示す慢性 GVHD が発症した。レシピエント涙腺は、ヒト GVHD 病変の過剰な線維化、炎症性細胞浸潤、ドナー由来線維芽細胞の存在とその活性化の4点においてその所見を再現していることを確認した。涙腺線維化発症あたる移植後3週時に末梢血中の制御性 T 細胞の減少とそれに引き続く Th 17 細胞の上昇を認めた。

さらに、シェーグレン症候群様マウスモデルと老齢マウスではコントロールに比して類似した線維化の進行を認めた。同様に涙腺における酸化ストレスマーカー 8OHdG、4-HNE、HEL および老化マーカー p16、および p38 の発現を認めた。これらの分子は導管周囲に集積する炎症細胞および、血管内皮に発現が認められた。病理組織学的、免疫組織学的検討では電子顕微鏡による超微形態の検討では自己免疫疾患様反応を示すマウスモデルと老齢マウスでは特に老化に深く関与するミトコンドリアの形態変化及びリポフスチンの蓄積が認められた。

D. 考察

レシピエント涙腺にはシェーグレン症候群類似の炎症性細胞の浸潤を認め、涙腺細胞が酸化ストレスマーカー、老化マーカーを発現していることから炎症老化の機序が病態の一部に関連している事が示唆された。本マウスモデルでは、シェーグレン症候群類似のドライアイ、および涙腺炎症や線維化の発症時期と経時的進展について酸化ストレスマーカー、老化マーカーの発現亢進を併せ検討することによりシェーグレン症候群様変化による炎症と老化の病態解明の手がかりとなる

可能性が考えられた。

E. 結論

シェーグレン症候群様ドライアイを示す GVHD マウスモデルでは酸化ストレスと老化マーカーの発現が亢進しており、炎症老化がドライアイの涙腺における病態進展の一部に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsubota K, Kawashima M, Inaba T, Dogru M, Matsumoto Y, Ishida R, Kaido M, Kojima T, Uchino M, Uchino Y, Ogawa Y, Nakamura S, Higuchi A, Shinmura K, Watanabe M, Kawakita T. The anti-aging approach for the treatment of dry eye. *Cornea*. 2012 Nov;31(11):S3-S8.

Uchino Y, Kawakita T, Miyazawa M, Ishii T, Onouchi H, Yasuda K, Ogawa Y, Shimmura S, Ishii N, Tsubota K. Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production. *PLoS One*. 2012 Oct;7(10):e45805.

Kamoi M, Ogawa Y, Nakamura S, Dogru M, Nagai T, Obata H, Ito M, Kaido M, Kawakita T, Okada Y, Kawakami Y, Shimmura S, Tsubota K. Accumulation of secretory vesicles lacrimal gland epithelia is related to non-Sjögren's type dry eye in visual display terminal users. *PLoS One*. 2012 Sep;7(9):e43688.

Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, Hatou S, Nakamura S, Inaba T, Imada T, Ozawa Y, Kawakami Y, Ishida S, Tsubota K. Presence and physiologic function of the Renin-Angiotensin System in mouse lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Aug;53(9):5416-5425.

Kojima T, Wakamatsu TH, Dogru M, Ogawa Y, Igarashi A, Ibrahim OM, Inaba T, Shimizu T, Noda S, Obata H, Nakamura S, Wakamatsu A, Shirasawa T, Shimazaki J, Negishi K, Tsubota K. Age-related dysfunction of the lacrimal gland and oxidative stress: evidence from the Cu,Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1) knockout mice. *Am J Pathol*. 2012 May;180(5):1879-1896.

2. 学会発表

2012 Cornea Society/Eye Bank Association of America Fall Educational Symposium, Chicago, USA.

2012/11/09

Kim, SK, Ogawa Y, Dana R, Jain S, Khan S, Modak J, Ban Y, Oshima C, Perez V, Riemens A, Rosenblatt M, Tsubota K. International chronic ocular graft-vs-host disease (GVHD) consensus group: Validation study for the proposed diagnostic criteria (Part II). 2012 Cornea Society/Eye Bank Association of America Fall Educational Symposium, Chicago, USA. 2012/11/09

International Society of Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan. 2012/6/13-16
Matsuzaki Y, Ogawa Y, Morikawa S, Okano H, Tsubota K, Shimmura S. Minor antigen-mismatched MSC react with residual host T cells to trigger the progression of chronic GVHD. International Society of Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan. 2012/6/13-16

The association for research in vision and ophthalmology 2012 (ARVO 2012) Annual Meeting, Fort Lauderdale, Florida, USA. 2012/5/6-5/10
Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, Inaba T, Ozawa Y, Ishida S, Tsubota K. Expression and localization of renin-angiotensin system (RAS) in the mouse lacrimal gland. The association for research in vision and ophthalmology 2012 (ARVO 2012) Annual Meeting, Fort Lauderdale, Florida, USA. 2012/5/6-5/10

Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Yaguchi T, Yaguchi S, Inaba T, Kawakami Y, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K. Interaction between donor mesenchymal stem cells and recipient-derived T cells in the pathogenesis of ocular chronic graft versus host disease. The association for research in vision and ophthalmology 2012 (ARVO 2012) Annual Meeting, Fort Lauderdale, Florida, USA. 2012/5/6-5/10

2nd International chronic ocular graft-vs-host disease (GVHD) consensus meeting. Fort Lauderdale, Florida, USA. 2012/5/4.

Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Mabuchi Y, Suzuki S, Tomonori Y, Yaguchi S, Inaba T, Okamoto S, Kawakami Y, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K. Donor mesenchymal stem cells trigger chronic graft-versus-host disease following minor antigen-mismatched bone marrow transplantation. 2nd International chronic ocular graft-vs-host

disease (GVHD) consensus meeting. Fort Lauderdale, Florida, USA. 2012/5/4.

1st Conference on the Tear Film and Ocular Surface in Asia, Kanagawa, Japan. 2012/4/2-4

Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Mabuchi Y, Yaguchi Y, Inaba T, Kawakami Y, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K. A role of recipient-derived T cells in ocular chronic graft-versus-host disease. 1st Conference on the Tear Film and Ocular Surface in Asia, Kanagawa, Japan. 2012/4/2-4

Hayashi I, Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Yaguchi S, Okamoto S, Kawakami Y, Tsubota K. Localization of immunocompetent cells in lacrimal gland of patients with chronic graft-versus-host disease (cGVHD) and T-cell activation. 1st Conference on the Tear Film and Ocular Surface in Asia, Kanagawa, Japan. 2012/4/2-4

8. 国内学会

平成24年度 厚生労働科学研究費 難治性疾患等克服研究事業 自己免疫疾患に関する調査研究班 班会議 東京 2012/12/14

小川葉子, 坪田一男. シェーグレン症候群様病態を示すマウスモデルの加齢的解析. 平成24年度 厚生労働科学研究費 難治性疾患等克服研究事業 自己免疫疾患に関する調査研究班 班会議 東京 2012/12/14

第21回日本シェーグレン症候群学会学術集会 京都 2012/9/7-8

坪井洋人, 萩原晋也, 浅島弘充, 松本功, 住田孝之, 梅原久範, 川上純, 一瀬邦弘, 佐野統, 坪田一男, 小川葉子, 高村悦子, 斉藤一郎, 井上裕子, 中村誠司, 森山雅史, 竹内勤, 田中良哉, 平田新太郎, 三森経世. シンポジウム2 シェーグレン症候群の診断基準を考える 2-1 日本人シェーグレン症候群患者の診断における3つの診断基準の比較. 第21回日本シェーグレン症候群学会学術集会 京都 2012/9/7-8

稲葉隆明, 久恒智博, 佐々木恭正, 小川葉子, 竹内勉, 御子柴克彦, 坪田一男. 慢性的分泌生涯による涙腺のシェーグレン症候群様病態変化. 第21回日本シェーグレン症候群学会学術集会 京都 2012/9/7-8

小川葉子, 榛村重人, 森川暁, 馬淵洋, 谷口智憲, 谷口紗織, 稲葉隆明, 岡本真一郎, 河上 裕, 岡野栄之, 松崎有未, 坪田一男. 自己免疫疾患様反応を示す眼慢性GVHDマウスモデルのT細胞と間葉系幹細胞の相互作用. 第21回日本シェーグレン症候群学会学術集会

京都 2012/9/7-8

第116回日本眼科学会総会, 東京 2012/4/5-8

谷口紗織, 小川葉子, 稲葉隆明, 小沢洋子, 石田晋, 榛村重人, 坪田一男. マウス正常涙腺における組織レニンアンジオテンシン系 (RAS) の発現と局在. 第116回日本眼科学会総会, 東京 2012/4/5-8

小川葉子, 榛村重人, 森川暁, 馬淵洋, 谷口智憲, 谷口紗織, 稲葉隆明, 河上裕, 岡野栄之, 松崎有未, 坪田一男. 眼慢性移植片対宿主病におけるT細胞と間葉系幹細胞の相互作用. 第116回日本眼科学会総会, 東京 2012/4/5-8

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特記すべきものなし

2. 実用新案登録

特記すべきものなし

3. その他

特記すべきものなし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

シェーグレン症候群の診断精度の検討

研究分担者 高村悦子 東京女子医科大学医学部医学科眼科 (准教授)
研究協力者 小島原典子 東京女子医科大学医学部医学科公衆衛生学第二 (准教授)

研究要旨

シェーグレン症候群の診断基準には American-European Consensus Group (AECG 2002)、厚生省改定診断基準 (1999年)、SICCA 診断基準 (2012年) があり、診断基準全体の感度・特異度の検討はされているが、各検査項目に対する個別な検討をした文献は少ない。今回、診断精度を臨床疫学的に検討するために PubMed、Cochrane Library、医学中央雑誌にて、Key word “Sjogren’s syndrome” AND “sensitivity OR specificity” にて検索を行い inclusion criteria として Sjogren’s syndrome を対象とし、数値として sensitivity と specificity の記載があり、英語か日本語の Abstract が参照できる 15 件について、QUADAS2 を用いた批判的吟味を行い、分文献の質が担保できた 10 論文につき各診断項目の sensitivity、specificity を抽出した。これらの論文では、眼科所見では、シルマーテストは 42.7~77.8、特異度は 57.3~82.5 と報告によりばらつきがみられた。また、角結膜染色は、感度 45.6~100、特異度 37.8~100 であり、また、その他の項目についても同様であった。AECG、SICCA、厚生省改定診断基準などを参照基準とし、どのような分析が行われているか文献的に検索したところ、研究の質に問題がある論文も多く、かつ感度・特異度のばらつきが大きいことが分かった。今後は、より正確なシェーグレン症候群の診断を行うために、診断精度の高い検査法を適切に評価することが必要である

A. 研究目的

シェーグレン症候群の診断基準作成の難しさは、多臓器に多くの特徴的な病変を呈するため、診断する診療科が、全身状態については、内科、ドライマウスについては、歯科、口腔外科、耳鼻科、ドライアイについては眼科と異なることが挙げられる。現在、シェーグレン症候群の診断基準としては、American-European Consensus Group (AECG 2002)、厚生省改定診断基準 (1999年)、SICCA 診断基準 (2012年) があるが、どの診療科を受診したかにより、解析集団の偏りや、診断のために採用された検査項目の違いが生じ、結果が異なる可能性も否定でない。しかし、診断精度の高い検査があれば、ドライアイの検査結果からシェーグレン症候群の診断がある程度予測できる可能性がある。今まで、診断基準全体の感度・特異度の検討はされているが、各検査項目に対する個別な検討をした報告は少ない。今回、診断精度を臨床疫学的に検討するために文献的考察を行った。

B. 研究方法

PubMed、Cochrane Library、医学中央雑誌にて、Key word “Sjogren’s syndrome” AND “sensitivity OR specificity” にて検索を行った (2012/11/12)。それに reference list から 5 件を加えた 793 件の文献から、title, abstract により 1 次スクリーニングを行った。inclusion criteria として Sjogren’s syndrome を対

象としているもの、数値として sensitivity と specificity の記載があるもの、英語か日本語の abstract が参照できるものとし、15 件を得た。15 文献の本文を 2 名の査読者が独立して QUADAS2 を用いた批判的吟味を行った。

QUADAS とは、quality assessment tool for diagnostic accuracy studies のことであり、診断精度に関する研究の質を評価するためのツールで、研究の限界 (limitation)、バイアスのリスク (risk of bias) を評価するためにコクランが推奨している方法であり、今回は 2011 年に改定された QUADAS2 を用いた。質問は、Patient selection (患者選択)、index test (検査項目)、reference standard (参照基準)、flow and timing (検査の時期) などそれぞれ、2~4 項目の質問、合計 11 個の質問から成っており、それぞれの質問に対して “Yes” か “No”、もしくは “Unclear” を回答する。

今回の研究では Yes の数が 5 以下の文献は質が担保出来ないとして除外し、いずれかの評価が 6 以上の 10 論文につき各診断項目の sensitivity、specificity を抽出した。

(倫理面への配慮)
該当せず

C. 研究結果

自覚症状、眼科所見、生検病理組織所見、口腔検査所

見、血清学的検査の結果を表に示す。今回選択された論文では、自覚症状は、検査法によって、感度・特異度にばらつきがみられた(表1)。眼科所見(表2)では、シルマーテストは42.7~77.8、特異度は57.3~82.5と報告によりばらつきがみられた。また、角結膜染色は、感度45.6~100、特異度37.8~100であり、感度はShiboski(2012)のリサミングリーンを用いた12点満点の評価では、感度が高く、特異度が低い結果だったが、Fujibayashi(2004)らローズベンガルを用いた9点満点の評価では、感度が低く、特異度が高かった。

D. 考察

我が国の診断基準は、生検病理所見、口腔所見、眼科所見、自己抗体の4項目中、2項目が陽性のときシェーグレン症候群とするため、参照項目が一致する場合としない場合とで診断精度の研究は結果のばらつきが大きい。今までのAECG、SICCA、厚生省改定診断基準などを参照基準としたときにどのような分析が行われているか文献的に検索したところ、研究の質に問題がある論文も多く、かつ感度・特異度のばらつきが大きいことが分かった。

シルマーテストについては、感度、特異度ともにばらつきが大きかった。シルマーテストは、眼科以外の診療科においても検査することが可能であり、検査法は簡便である反面、室内環境、試験紙の当て方など検査時の条件により、値が変動し、また、再現性が低いといった問題が残る。角結膜染色は、ドライアイの評価として、特にシェーグレン症候群のドライアイにおいては、有用な検査と思われる。シェーグレン症候群のドライアイにおいては、角膜に比べ結膜の染色は初期からみられ、治療によっても残存し、病変の首座である可能性があることから、結膜の染色を的確に評価することは、シェーグレン症候群のドライアイの診断としては、必要である。現在、染色に用いる色素には、フルオレセイン、ローズベンガル、リサミングリーンがある。ローズベンガルは、厚生省診断基準にも採用されているが、検査時の刺激が強いこと、高濃度では毒性があること、簡便な試験紙がないことなどの理由から、眼科においても日常診療では行いにくい検査となっている。リサミングリーンは安全性の点ではローズベンガルにまさるが入手が難しいといった現状がある。フルオレセインは、眼科の診療では、必ず使用される検査薬であり、蛍光色素検査として、角膜上皮障害の評価のために厚生省改訂診断基準に採用されているが、最近では、特殊なフィルターを用いて結膜の染色を観察することができ、ローズベンガルとほぼ同等の角結膜全体の評価を行うことができるようになってきた。

今後は、感度、特異度が高い検査法を探していく必要がある。

今後、参照基準としてdry eyeを用い、眼科を受診したシェーグレン症候群疑いの患者に対し、既存の診断基準に含まれる項目を含めたいくつかの変数の尤度比を求める研究を計画している。コスト、副作用を含めた害も勘案した重みづけから、確定診断に必要な検査の優先順位の検討が必要と思われる。

E. 結論

より正確なシェーグレン症候群の診断を行うために、診断精度の高い検査法を適切に評価することが必要である

F. 健康危険情報

なし

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 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

Whiting PF, Rutjes AWS, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, Leeflang MM, Sterne JAC, and Bossuyt PMM. QUADAS-2: A Revised Tool for the Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies. *Ann Intern Med*, 2011; 155:529-536.

表1 自覚症状

Article	Diagnostic criteria	Se	Sp	
Knezović I (2011)	AECG	56.25	100.00	OSDI *
Yazisiz V (2009)	AECG	80	19	Ocular symptoms
		77	14	Oral symptoms

* ophthalmologic questionnaire (ocular surface disease index)

表2 眼科所見

Article	Diagnostic criteria	Se	Sp	
Shiboski SC (2012)	SICCA	89.7 (86.4–92.7)	37.8(34.2–41.2)	OSS>3
		90.5(87.9–93.0)	21.4 (17.9–24.3)	TBUT **
		42.7 (37.8–47.6)	75.1 (71.7–78.2)	Schirmer' s test
Knezović I (2011)	AECG	62.5	83.33	TBUT**
		100	100	Rose Bengal score
de Monchy I (2011)	AECG	77.8	82.5	Schirmer test
		68	90	PRT2
		61	75	ΔPRT
		94	20	Ocular signs
Yazisiz V (2009)	AECG	94	20	
Fujibayashi T (2004)	厚生省(1999)	69.2	100	LG >Grade3(focus score>1)
		58.3	57.3	Schirmer' s test <5mm/5min
		45.6	86.9	Rose bengal test ++(score≥4)
		77.5	52	Fluorescein test +

** tear breakup time

ΔPRT is defined as the difference between phenol red thread test performed before and after Schirmer I test. PRT, phenol red thread test;

表3 生検病理組織検査

Article	Diagnostic criteria	Se	Sp	
Shiboski SC (2012)	SICCA	83.5 (79.1-88.2)	82.3 (78.1-85.8)	FS \geq 1
Knezović I (2011)	AECG	56.25	100	Focus score
Obinata K (2010)	厚生省(1999)	63.9	91.9	\geq Grade 3
Yazisiz V (2009)	AECG	79	100	Chisholm's score(III/IV)

表4 口腔検査所見

Article	Diagnostic criteria	Se	Sp	
Shiboski SC (2012)	SICCA	89.8 (87.2-92.0)	74.3 (71.0-77.5)	UWS flow rate ***
Obinata K (2010)	厚生省(1999)	83.3	94.6	Sialography
		77.8	78.4	Ultrasonography
Poul JH (2008)	AECG	84.4	73	Ultrasound
		77.8	86.7	Sialography
Fujibayashi T (2004)	厚生省(1999)	69.4	58.9	Chewing gun test <10ml/10min
		83.3	60	Saxon test <2g/2min
		96.1	57.8	SG scintigraphy hypofunction
		86.8	95.9	Sialography >Stage I

*** UWS unstimulated whole salivary

表5 血清学的検査

Article	Diagnostic criteria	Se	Sp	
Shiboski SC (2012)	SICCA	83.7(78.0-89.3)	91.5(87.8-94.9)	Anti-SSA and/or anti-SSB
		72.3(67.7-77.6)	86.4(83.2-89.9)	Rheumatoid factor
		72.8(67.5-77.7)	80.4(76.9-84.0)	ANA titer \geq 1:320
Yazisiz V (2009)	AECG	53	75	Autoantibodies(the least one positive)
		41	87	Anti-nuclear antibody(+)
		27	90	Ig M rheumatoid factor(+)
		18	95	Anti-Ro(+)
		80	93	Anti-La(+)
		17	-	Hypergammaglobulinemia
Fujibayashi T (2004)	厚生省(1999)	68.6	69.9	Rheumatoid factor
		88.5	45.6	Antinuclear antibody
		73.4	77.9	Anti-Ro/SS-A antibody
		18.7	96.2	Anti-La/SS-B antibody
		69.9	72.3	Hyper-gammaglobulinemia

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

アクアポリン発現誘導によるシェーグレン症候群治療戦略の萌芽的研究

研究分担者	梅原久範	金沢医科大学医学部血液免疫内科	教授
研究協力者	田中真生	金沢医科大学医学部血液免疫内科	准教授
研究協力者	澤木俊興	金沢医科大学医学部血液免疫内科	助教
研究協力者	藤田義正	金沢医科大学医学部血液免疫内科	助教
研究協力者	杉本直俊	金沢大学医学部生理学第一	准教授

研究要旨

シェーグレン症候群の乾燥症状の一つである口腔乾燥は患者 QOL を著しく低下させる。口腔乾燥は主に唾液分泌量の低下に起因する。唾液成分の 99% が水であることから、水輸送体であるアクアポリン群の発現や機能の亢進が口腔乾燥症の改善につながると思われる。我々は健常人の両頬部耳下腺周囲を加温することで唾液分泌量が増加することを見出した。また、その分子メカニズムとして、温熱刺激が唾液腺のアクアポリン群発現、水の供給源となる血管の新生を亢進することをラットを用いた動物実験により明らかにした。以上から、温熱療法はシェーグレン症候群口腔乾燥症状の QOL 改善に対し治療の一選択肢として有効であることが推察される。

A. 研究目的

シェーグレン症候群は唾液腺や涙腺などを標的とする自己免疫疾患であり、口腔乾燥、目乾燥に代表される乾燥症状が患者の QOL を著しく低下させる。唾液や涙液の多くは水分であり、特に、唾液の 99% 以上が水分であることから、水輸送体であるアクアポリン (AQP) 群が唾液分泌に深く関わっている。ヒト唾液腺には、AQP1、AQP3、AQP5 が発現している。シェーグレン症候群患者の唾液腺や涙腺で、タンパク質 AQP5 の発現量低下や異所性発現の報告があることから、AQP5 がシェーグレン症候群の口腔乾燥症状出現において重要な分子の一つであることが推察される。

本研究では、シェーグレン症候群に伴う口腔乾燥症状の改善へ向けた治療戦略として AQP5 発現を誘導する方法を検討した。

B. 研究方法

①健常ボランティア (n=12) の両頬部耳下腺周囲を一日一時間、連続 7 日間使い捨てカイロで加温した。加温期間前後での唾液分泌量の変化をサクソンテストを用いて評価した。

②Wistar ラット (各群 n=8) を 24°C (control 群) もしくは 32°C (heat stress 群) 温度下で 5 日間飼育後、左右顎下腺を回収した。左顎下腺はホルマリン固定後、パラフィンで包埋して切片を作製

した。右顎下腺から RNA およびタンパク質を回収した。免疫組織化学法、RT-PCR 法およびウエスタンブロット法にて AQP 発現部位および発現量を検討した。また、heat shock proteins (HSPs) 発現量も検討した。

C. 研究結果

①健常ボランティアで両頬部耳下腺周囲を一日一時間、連続して 7 日間加温すると有意に唾液分泌量が増加した。

②ラット唾液腺には AQP1、AQP5、AQP8 が発現していた。AQP1 は血管に、AQP5 は腺腔内側面に発現していた。heat stress 群では control 群と比べ、AQP1 と AQP5 の発現が亢進した。heat stress 群では血管密度が増加した。heat stress 群では AQP5 の発現は腺房細胞管腔面で増加した。heat stress 群では HSPs 発現が増加した。

D. 考察

健常ボランティア実験により継続的な耳下腺周囲温熱刺激が唾液分泌を亢進することが明らかとなったが、その作用機序は不明な点が多い。AQP5 KO マウスでは唾液分泌量が極度に減少することから、げっ歯類でも唾液分泌において AQP5 の発現と機能は重要と考えられる。連続的 heat stress を加えたラット実験から唾液腺、とくに腺房細胞

管腔面において AQP5 発現が増強されることが示された。一方、連続的 heat stress によりラット唾液腺で血管密度が増加した。血管には AQP1 が発現していることから、heat stress 群の唾液腺では血液からの水の供給が増加していると推察された。健常人の唾液分泌においても AQP の働きが重要であることを考慮すると、今回の結果は健常人でも温熱刺激により唾液腺房細胞での AQP5 発現亢進と唾液腺での血管密度の増加により唾液分泌量が増加した可能性が考えられる。

E. 結論

温熱療法はシェーグレン症候群口腔乾燥症状の QOL 改善に対して治療の一選択肢として有効であることが推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Umehara, H., K. Okazaki, Y. Masaki, M. Kawano, M. Yamamoto, T. Saeki, S. Matsui, T. Yoshino, S. Nakamura, S. Kawa, H. Hamano, T. Kamisawa, T. Shimosegawa, A. Shimatsu, S. Nakamura, T. Ito, K. Notohara, T. Sumida, Y. Tanaka, T. Mimori, T. Chiba, M. Mishima, T. Hibi, H. Tsubouchi, K. Inui, H. Ohara and A. J. I. team "Comprehensive Diagnostic Criteria (CDC criteria) for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011." *Mod. Rheum.* **22**(1): 21-30.2012
2. Umehara, H., K. Okazaki, Y. Masaki, M. Kawano, M. Yamamoto, T. Saeki, S. Matsui, T. Sumida, T. Mimori, Y. Tanaka, K. Tsubota, T. Yoshino, S. Kawa, R. Suzuki, T. Takegami, N. Tomosugi, N. Kurose, Y. Ishigaki, A. Azumi, M. Kojima, S. Nakamura, D. Inoue and L. a. W. M. J. G. t. the Research Program for Intractable Disease by Ministry of Health "A Novel Clinical Entity, IgG4-Related Disease (IgG4RD) - General Concept and Details-." *Mod Rheum* **22**(1): 1-14.2012
3. Umehara, H. "A new clinical entity: IgG4-related disease (IgG4-RD) discovered in the 21st century." *Intern Med* **51**(8): 821-822. 2012.
4. Ito K, Yamada K, Mizushima I, Aizu M, Fujii H, Mizutomi K, Matsumura M, Hayashi K, Yamagish M, Umehara H, Yamaguchi Y, Nagata M, and Kawano M. Henoch-Schonlein purpura nephritis in a patient with IgG4-related disease: A possible association. *Clin Nephrol*, (accession number 22841022) 2012.
5. Shiboski, S., C. Shiboski, L. Criswell, A. Baer, S. Challacombe, H. Lanfranchi, M. Schiødt, H. Umehara, F. Vivino, Y. Zhao, Y. Dong, D. Greenspan, A. Heidenreich, P. Helin, B. Kirkham, K. Kitagawa, G. Larkin, M. Li, T. Lietman, J. Lindegaard, N. McNamara, K. Sack, P. Shirlaw, S. Sugai, C. Vollenweider, J. Witcher, A. Wu, S. Zhang, W. Zhang, J. Greenspan, T. Daniels and f. t. S. s. I. C. C. Alliance "American College of Rheumatology Classification Criteria for Sjogrens Syndrome: A Data-Driven, Expert Consensus Approach in the Sjogren's International Collaborative Clinical Cohort." *Arthritis Care & Research* **64**(4): 475-487.2012
6. Murakami, K., M. Tanaka, T. Usui, D. Kawabata, A. Shiomi, M. Iguchi-Hashimoto, M. Shimizu, N. Yukawa, H. Yoshifuji, T. Nojima, K. Ohmura, T. Fujii, H. Umehara and T. Mimori "Follistatin-related protein/follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4." *FEBS Lett* **586**(4): 319-324. 2012.
7. Mizushima, I., K. Yamada, H. Fujii, D. Inoue, H. Umehara, M. Yamagishi, Y. Yamaguchi, M. Nagata, M. Matsumura and M. Kawano "Clinical and histological changes associated with corticosteroid therapy in IgG4-related tubulointerstitial nephritis." *Mod Rheumatol* DOI 10.1007/s10165-011-0589-2.2012
8. Malladi, A. S., K. E. Sack, S. C. Shiboski, C. H. Shiboski, A. N. Baer, R. Banushree, Y. Dong, P. Helin, B. W. Kirkham, M. Li, S. Sugai, H. Umehara, F. B. Vivino, C. F. Vollenweider, W. Zhang, Y. Zhao, J. S. Greenspan, T. E. Daniels and L. A. Criswell "Primary Sjogren's syndrome as a systemic disease: a study of participants enrolled in an international Sjogren's syndrome registry." *Arthritis Care Res (Hoboken)* **64**(6): 911-918. 2012.
9. Kawanami T, Sawaki T, Sakai T, Miki M, Iwao H, Nakajima A, et al. Skewed production of IL-6 and TGFβ by cultured salivary gland epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome. *PLoS One*. 2012; **7**(10):e45689. doi: 10.1371/journal.pone.0045689.
10. Sugimoto N, Shido O, Matsuzaki K, Ohno-Shosaku T, Hitomi Y, Tanaka M, et al. Cellular heat acclimation regulates cell growth, cell morphology, mitogen-activated protein

- kinase activation, and expression of aquaporins in mouse fibroblast cells. *Cell Physiol Biochem.* 2012; 30(2):450-7. doi: 10.1159/000339038.
11. Taniguchi M, Kitatani K, Kondo T, Hashimoto-Nishimura M, Asano S, Hayashi A, et al. Regulation of autophagy and its associated cell death by "sphingolipid rheostat": reciprocal role of ceramide and sphingosine 1-phosphate in the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem.* 2012; 287(47):39898-910. doi: 10.1074/jbc.M112.416552.
 12. Fukushima T, Sato T, Nakamura T, Iwao H, Nakajima A, Miki M, et al. Daily 500 mg Valacyclovir Is Effective for Prevention of Varicella Zoster Virus Reactivation in Patients with Multiple Myeloma Treated with Bortezomib. *Anticancer Res.* 2012 Dec;32(12):5437-40.
 13. Stone JH, Khosroshahi A, Deshpande V, Chan JK, Heathcote JG, Aalberse R, et al. Recommendations for the nomenclature of IgG4-related disease and its individual organ system manifestations. *Arthritis Rheum.* 2012 Oct;64(10):3061-7. doi: 10.1002/art.34593.
 14. Okazaki K, Umehara H. Are Classification Criteria for IgG4-RD Now Possible? The Concept of IgG4-Related Disease and Proposal of Comprehensive Diagnostic Criteria in Japan. *Int J Rheumatol.* 2012;2012:357071. doi: 10.1155/2012/357071.
 15. Asano S, Kitatani K, Taniguchi M, Hashimoto M, Zama K, Mitsutake S, et al. Regulation of cell migration by sphingomyelin synthases: sphingomyelin in lipid rafts decreases responsiveness to signaling by the CXCL12/CXCR4 pathway. *Mol Cell Biol.* 2012;32(16):3242-52. doi:10.1128/MCB.00121-12.
 16. Deshpande V, Zen Y, Chan JK, Yi EE, Sato Y, Yoshino T, et al. Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. *Mod Pathol.* 2012;25(9):1181-92. doi:10.1038/modpathol.2012.72.
 17. Fukushima T, Kawabata H, Sawaki T, Satoh T, Nakamura T, Iwao H, et al. Low-dose cytarabine plus aclarubicin for patients with previously untreated acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome ineligible for standard-dose cytarabine plus anthracycline. *Anticancer Res.* 2012 Apr;32(4):1347-53.
 18. Masaki Y, Kurose N, Yamamoto M, Takahashi H, Saeki T, Azumi A et al. Cutoff Values of Serum IgG4 and Histopathological IgG4+ Plasma Cells

for Diagnosis of Patients with IgG4-Related Disease. *Int J Rheumatol.* 2012;2012:580814. doi: 10.1155/2012/580814.

2. 学会発表

・第21回日本シェーグレン学会 2012年9月京都

杉本直俊、松崎健太郎、田中真生、澤木俊興、藤田義正、正木康史、岡崎俊朗、紫藤 治、梅原久範「温熱刺激による唾液腺アクアポリンと転写因子の発現調節」

・第56回日本リウマチ学会学術集会 2012年4月東京

杉本直俊、田中真生、澤木俊興、藤田義正、正木康史、梅原久範「温熱刺激による唾液腺房細胞アクアポリン5の発現調整」

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

出願番号：特願 2010-194326

発明者：梅原久範、正木康史、友杉直久、石垣靖人「IgG4 関連疾患診断用マーカー及びその利用」

出願番号：特開 2011-188958 (特願 2010-056779)

発明者：梅原久範、杉本直俊、紫藤治「シェーグレン症候群及びドライマウスの治療器並びにドライアイの治療器」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

日本人シェーグレン症候群患者の診断における3つの診断基準の比較

研究分担者 坪井洋人 筑波大学医学医療系内科

（膠原病・リウマチ・アレルギー）講師

研究協力者 梅原久範、川上純、中村英樹、佐野統、坪田一男、小川葉子、高村悦子、斉藤一郎、井上裕子、中村誠司、森山雅文、竹内勤、田中良哉、平田信太郎、三森経世、住田孝之

厚労省「自己免疫疾患に関する調査研究」班拡大SS分科会

研究要旨

シェーグレン症候群（SS）の診断基準として、国内で汎用されている厚生省改訂診断基準（JPN）（1999年）、アメリカ・ヨーロッパ改訂分類基準（AECG）（2002年）と、最近提唱されたACR分類基準（ACR）（2012年）を、日本人SS患者の診断に関して検証することを目的とした。対象は、厚労省「自己免疫疾患に関する調査研究」班拡大SS分科会の参加10施設（金沢医大、長崎大、兵庫医大、慶應大、東京女子医大、鶴見大、九州大、産業医大、京都大、筑波大）に通院中のSS患者およびSS疑いの患者のうち、JPN基準に挙げられた4項目（1. 生検病理組織検査、2. 口腔検査、3. 眼科検査、4. 血清検査（抗SS-A抗体、抗SS-B抗体））をすべて実施した症例694例（男性51例、女性643例）とした。各施設での臨床診断、前述の3つの基準の満足度に関して、調査票を用いて後ろ向きに検討した。各施設における主治医による臨床診断は、SS476例（一次性SS302例、二次性SS174例）、非SS218例（他の膠原病合併なし197例、合併あり21例）であった。主治医による臨床診断をゴールドスタンダードとして、3つの基準の感度・特異度を算出した。全SS（一次性＋二次性）に関しては、JPN基準の感度は79.6%、特異度は90.4%、AECG基準の感度は78.6%、特異度は90.4%、ACR基準の感度は77.5%、特異度は83.5%であった。一次性SSに関しては、JPN基準の感度は82.1%、特異度は90.9%、AECG基準の感度は83.1%、特異度は90.9%、ACR基準の感度は79.1%、特異度は84.8%であった。二次性SSに関しては、JPN基準の感度は75.3%、特異度は85.7%、AECG基準の感度は70.7%、特異度は85.7%、ACR基準の感度は74.7%、特異度は71.4%であった。全SSの診断に関する、3つの基準の一致率を κ 係数で解析すると、JPN基準とAECG基準は0.31、JPN基準とACR基準は0.74、AECG基準とACR基準は0.30であった。日本人SS患者の診断に関して、JPN基準はAECG基準、ACR基準よりも優れている可能性が示された。

A. 研究目的

シェーグレン症候群（SS）の診断基準として、国内では、厚生省改訂診断基準（the revised Japanese Ministry of Health criteria for the diagnosis of SS; JPN）（1999年）とアメリカ・ヨーロッパ改訂分類基準（the

American-European Consensus Group classification criteria for SS; AECG）（2002年）が汎用されてきた。一つの疾患に対して、複数の診断基準が用いられていたため、診断や治療反応性、予後等に関して、統一された見解が得られにくい状況であった。国際統一

基準の策定を進めていた Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance (SICCA) から新しい基準が提唱され、アメリカリウマチ学会分類基準 (American College of Rheumatology classification criteria for SS; ACR) (2012年)として発表された。SICCAによるACR基準の策定に関しては、日本人SS患者も一部含まれていたが、日本人SS患者に関して、前述の3つの基準を比較検証した報告はなく、海外の validation studyでは、AECG基準とACR基準の比較が行われているのみである。

3つの基準に含まれる項目を比較すると、乾燥自覚症状はAECG基準のみに含まれており、自己抗体検査のうち抗核抗体 (ANA) とリウマトイド因子 (RF) はACR基準にのみ含まれている。一方で、口腔検査 (唾液腺シンチグラフィ、耳下腺造影、唾液分泌量) はACR基準には一切含まれていない (表1)。

本研究では、日本人SS患者の診断に関して、JPN基準 (1999年)、AECG基準 (2002年)、ACR基準 (2011年) の比較検証を目的とした。

B. 研究方法

1. 対象

厚生省「自己免疫疾患に関する調査研究」班拡大SS分科会の参加10施設 (金沢医大、長崎大、兵庫医大、慶應大、東京女子医大、鶴見大、九州大、産業医大、京都大、筑波大) に通院中のSS患者およびSS疑いの患者のうち、JPN基準に挙げられた4項目 (1. 生検病理組織検査、2. 口腔検査、3. 眼科検査、4. 血清検査 (抗SS-A抗体、抗SS-B抗体)) をすべて実施した症例694例 (男性51例、女性643例) を対象とした。

2. 方法

各施設での臨床診断、前述の各基準の満足度に関して、調査票を用いて後ろ向きに検討した。なお、ACR基準における眼染色スコアについては、従来のローズベンガル染色3点以上あるいは蛍光色素染色陽性例は、基準を満たすと判断した。

主治医による臨床診断をゴールドスタンダードとして、3つの基準の感度・特異度を算出した。またSSの診断に関する、3つの基

準の一致率を κ 係数を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 対象患者の主治医による臨床診断

各施設における主治医による臨床診断は、SS476例 (一次性SS302例、二次性SS174例)、非SS218例 (他の膠原病合併なし197例、合併あり21例) であった。

JPN基準、AECG基準、ACR基準の満足度に関して、3つのコホートに分けて解析した (表2) (Tsuboi H, et al. *Mod Rheumatol*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print])。

解析①: 全症例694例 (SS476例、非SS218例)

解析②: 一次性SS+一次性SS疑い (他の膠原病合併なし) 499例 (一次性SS302例、非SS197例)

解析③: 二次性SS+二次性SS疑い (他の膠原病合併あり) 195例 (二次性SS174例、非SS21例)

2. 診断に必要な検査項目の実施率

全症例694例における各検査項目の実施率

(実施症例数) は、口唇唾液腺生検99.42% (690例)、涙腺生検0.86% (6例)、シルマー試験94.38% (655例)、ローズベンガル試験28.24% (196例)、リサミングリーン染色39.77% (276例)、蛍光色素染色38.47% (267例)、無刺激唾液分泌量76.08% (528例)、ガムテスト86.31% (599例)、サクソントテスト52.45% (364例)、耳下腺造影21.04% (146例)、唾液腺シンチグラフィ11.82% (82例)、抗SS-A抗体100.00% (694例)、抗SS-B抗体97.26% (675例)、抗核抗体 (ANA) 94.24% (654例)、リウマトイド因子 (RF) 89.19% (619例) であった (図1)。

3. SS例と非SS例の診断に関する3つの基準の感度・特異度

1) 解析①: 全症例694例 (SS476例、非SS218例)

JPN基準の感度は79.6%、特異度は90.4%、AECG基準の感度は78.6%、特異度は90.4%、ACR基準の感度は77.5%、特異度は83.5%であった (表3) (Tsuboi H, et al. *Mod Rheumatol*.

2012 Dec 28. [Epub ahead of print])。

2) 解析②：一次性 SS＋一次性 SS 疑い（他の膠原病合併なし）499 例（一次性 SS302 例、非 SS197 例）

JPN 基準の感度は 82.1%、特異度は 90.9%、AECG 基準の感度は 83.1%、特異度は 90.9%、ACR 基準の感度は 79.1%、特異度は 84.8%であった（表 3）（Tsuboi H, et al. *Mod Rheumatol*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print])。

3) 解析③：二次性 SS＋二次性 SS 疑い（他の膠原病合併あり）195 例（二次性 SS174 例、非 SS21 例）

JPN 基準の感度は 75.3%、特異度は 85.7%、AECG 基準の感度は 70.7%、特異度は 85.7%、ACR 基準の感度は 74.7%、特異度は 71.4%であった（表 3）（Tsuboi H, et al. *Mod Rheumatol*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print])。

4. κ 係数による 3 つの基準の一致率の解析
全 SS476 例、一次性 SS302 例、二次性 SS174 例に関して、JPN 基準と ACR 基準による診断の一致率はいずれも κ 係数 0.74 であり、良好な一致率であった。一方で、AECG 基準と他の 2 つの基準の一致率は κ 係数 0.10～0.46 であり、良好な一致率ではなかった（表 4）（Tsuboi H, et al. *Mod Rheumatol*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print])。

D. 考察

本研究では、JPN 基準、AECG 基準、ACR 基準を、日本人 SS 患者の診断に関して比較検証した。主治医による臨床診断をゴールドスタンダードとした場合、全 SS（一次性＋二次性 SS）の診断に関して、感度は JPN 基準、特異度は JPN 基準、AECG 基準が優れていた。一次性 SS の診断に関しては、感度は AECG 基準、特異度は JPN 基準、AECG 基準が優れていた。二次性 SS の診断に関しては、感度は JPN 基準、特異度は JPN 基準、AECG 基準が優れていた。

また、3 つの基準による診断の一致率に関しては、JPN 基準と ACR 基準の一致率は高く、AECG 基準と他の 2 つの基準の一致率は低かった。

JPN 基準と ACR 基準は、 κ 係数による診

断の一致率は高いものの、感度・特異度はいずれも JPN 基準が優れていた。一次性 SS302 例のうち、14 例は JPN 基準と AECG 基準の両方を満たしたが、ACR 基準は満たさなかった。これらの 14 例のうち、50%は生検病理組織検査が陰性であり、70%は眼科検査が陰性、さらに 50%は自己抗体検査が陰性であった（図 2）。以上より、こういった生検病理組織検査陰性、眼科検査陰性、自己抗体陰性の一次性 SS は、ACR 基準では診断されにくい可能性が示され、ACR 基準の感度が低い一因と考えられた。

E. 結論

JPN 基準、AECG 基準、ACR 基準を、日本人 SS 患者の診断に関して比較検証した。日本人 SS 患者の診断に関して、JPN 基準は AECG 基準、ACR 基準よりも優れている可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsuboi H, Matsuo N, Iizuka M, Tsuzuki S, Kondo Y, Tanaka A, Moriyama M, Matsumoto I, Nakamura S, Sumida T.: Analysis of IgG4 class switch-related molecules in IgG4-related disease. *Arthritis Res. Ther.* 14(4):R171, 2012

2) Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Matsumoto I, Sumida T.: Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjogren's syndrome in Japanese patients. *Mod. Rheumatol* 2012 Dec 28. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1) 坪井 洋人, 萩原 晋也, 松本 功, 住田 孝之: シェーグレン症候群の診断基準の検証 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会（品川）4 月 26 日、2012

2) 坪井 洋人、萩原 晋也、浅島 弘充、松本 功、住田 孝之、梅原 久範、川上 純、一瀬 邦弘、佐野 統、坪田 一男、小川 葉子、高村 悦子、斉藤 一郎、井上 裕子、中村 誠司、森山 雅文、竹内 勤、田中 良哉、平田 信太郎、三森 経世：日本人シェーグレン症候群患者の診断における3つの診断基準の比較 第21回日本シェーグレン症候群学会学術集会（京都）9月8日、2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 3つの基準に含まれる項目の比較

	乾燥 自覚症状	眼検査		口腔唾液腺 生検	口腔検査			自己抗体				
		シルマー	染色検査		唾液腺シンチ	耳下腺造影	唾液分泌量	SS-A	SS-B	ANA	RF	
JPN基準	×	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×
AECG基準	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×
ACR基準	×	×	○	○	×	×	×	○	○	○	○	○

(Tsuboi H, et al. *Mod Rheumatol*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print])

表2 対象患者の主治医による臨床診断

		他の膠原病(CTD)合併		合計
		なし	あり	
臨床診断	SS (SS確定)	302 (一次性SS)	174 (二次性SS)	476
	SS疑い (非SS)	197	21	218
合計		499	195	694

(Tsuboi H, et al. *Mod Rheumatol*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print])

表3 SS例と非SS例の診断に関する
3つの基準の感度・特異度

厚生省基準の項目 施行症例 694例	解析① 全症例694例 全SS(一次性+二次性)		解析② CTD合併なし499例 一次性SS		解析③ CTD合併あり195例 二次性SS	
	SS確定例476例 非SS例218例		SS確定例302例 非SS例197例		SS確定例174例 非SS例21例	
	感度	特異度	感度	特異度	感度	特異度
JPN基準	79.6	90.4	82.1	90.9	75.3	85.7
AECG基準	78.6	90.4	83.1	90.9	70.7	85.7
ACR基準	77.5	83.5	79.1	84.8	74.7	71.4

(Tsuboi H, et al. *Mod Rheumatol*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print])

表4 κ係数による3つの基準の一致率

一致率の比較 (κ係数)	解析① 全症例694例	解析② CTD合併なし499例	解析③ CTD合併あり195例
	全SS476例	一次性SS302例	二次性SS174例
JPN vs AECG	0.31	0.46	0.10
JPN vs ACR	0.74	0.74	0.74
AECG vs ACR	0.30	0.42	0.12

κ係数 一致の程度
 0~0.40 poor
 0.41~0.60 moderate
 0.61~0.80 good
 0.81~ excellent

(Tsuboi H, et al. *Mod Rheumatol*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print])

図1 診断に必要な検査項目の実施率

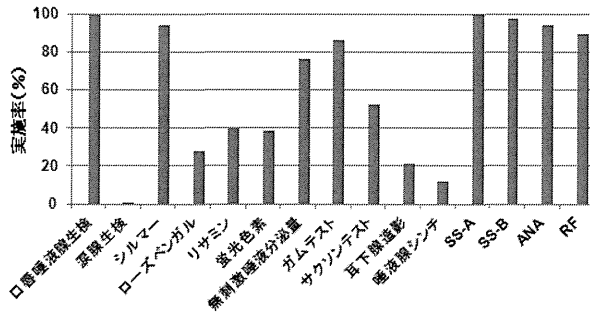


図2 一次性SS302例中、ACR基準のみを満たさなかった14例の臨床的特徴

