

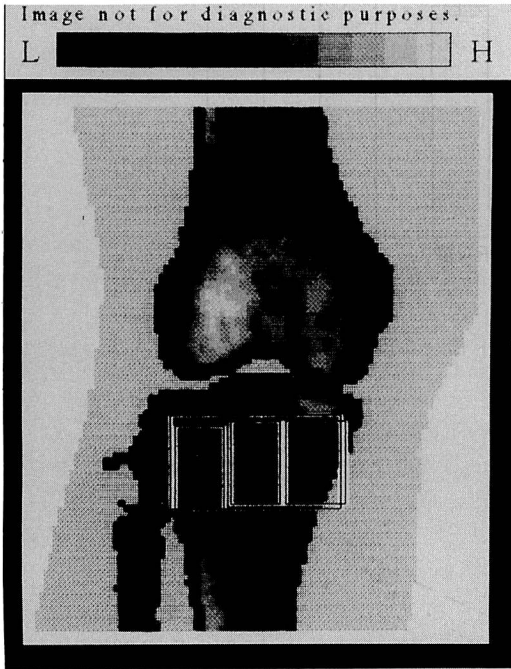
13

基礎

DEXAによる脛骨顆部の骨塩量測定

〔愛媛大学整形外科〕 山田 洋司・奥村 秀雄・柴田 大法
〔山田整形外科〕 山田 栄

図1 DEXAによる脛骨顆部の撮影部位



慢性関節リウマチ (RA) における骨病変の一つに、関節周囲の炎症に起因すると思われる骨粗鬆化があります。そこで、骨塩量を指標として RA、変形性関節症 (OA)、健常人 (コントロール) と比較し検討を加えたので報告します。

骨塩量の測定については、近年導入された二重エネルギーX線吸収測定法 (Dual Energy X-ray absorptometry = DEXA) の一つである Norland 社製 XR-26 を用いて行いました。

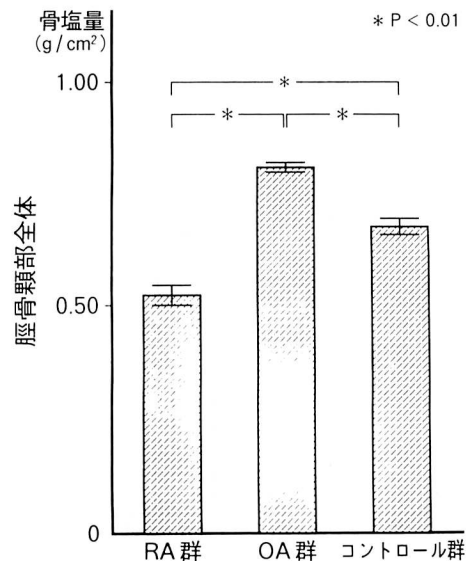
測定部位は、骨代謝回転の早いと思われる海綿骨主体である第3腰椎椎体側面、および脛骨顆部としました。脛骨顆部は内側、中央、外側に3等分計測し、また顆部の脛骨測定の際には下腿骨がX線と直角になるように固定しました。図1では、わかりやすいように少しずつずらしたかたちになっていますが、実際は全部合わせて測定しています。

検討対象は、全例女性で、RA 群は全例 Class 2 とし、OA 群は腰野の分類で Grade 2 としました。またコントロール群においては両膝関節の疼痛は認めていません。なお、

表1 対象

		症例数 (例)	平均年齢 (歳)
RA 群	Stage 2, Class 2	12	72.0
OA 群	Grade 2 (腰野の分類)	12	68.2
コントロール群		12	65.6

図2 脛骨顆部全体の骨塩量



全例、骨および骨代謝に影響を与えると思われる薬剤の服用の既往や、他の疾病の合併も認めていません。対象数の内訳は、RA 群12例 (平均年齢72歳)、OA 群12例 (同68.2歳)、コントロール群12例 (同65.6歳) の計36例です (表1)。

各群における左右においては統計学的に有意な差は認められませんでした。各骨塩量は、脛骨顆部全体において、RA 群0.519±0.113、OA 群0.803±0.016、コントロール群0.676±0.018でした。各群間には危険率0.01以下で有意な差を認めました (図2)。

RA 群は全身の骨粗鬆化の影響をうけているばかりではなく、関節主位の炎症による骨粗鬆化が加わり、骨塩量

図3 脛骨顆部内側の骨塩量

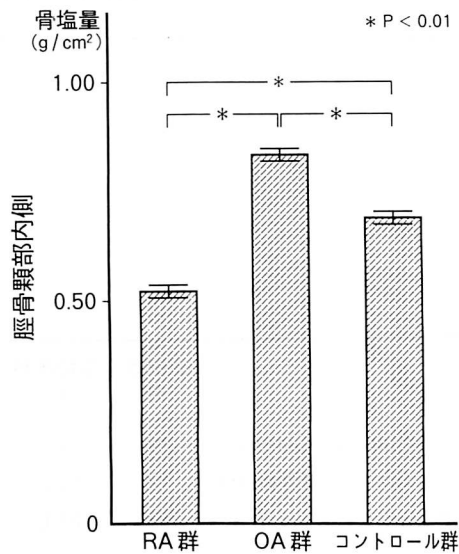


図5 脛骨顆部外側の骨塩量

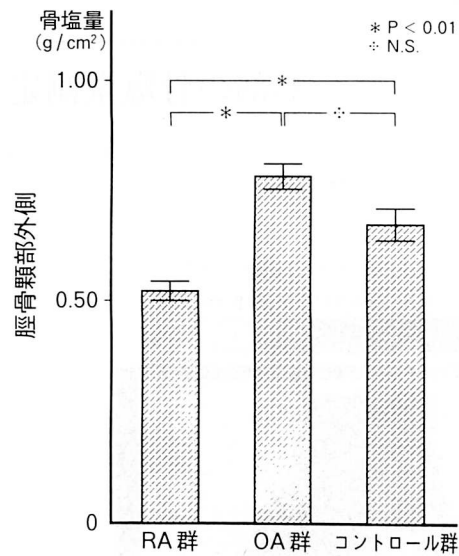


図4 脛骨顆部中央の骨塩量

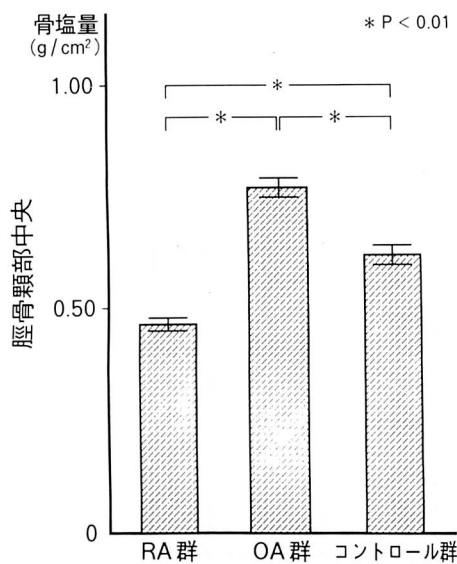
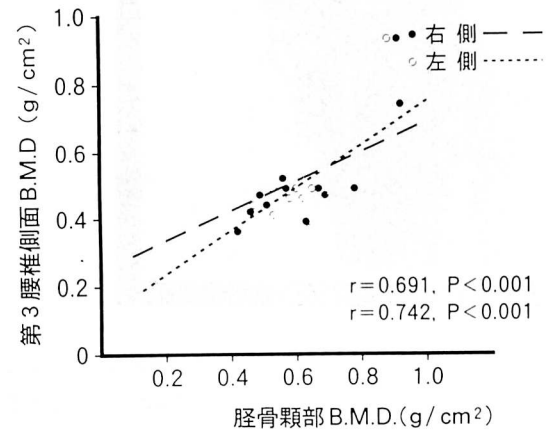


図6 コントロール群における相関



の減少をまねいたと考えました。また、OA群は全例が内側型であったためか、内側部の軟骨下骨の硬化が今回の結果を引き出したものと考えられました。

脛骨顆部内側でも同様に、OA群、コントロール群、RA群の順に骨塩量の減少が認められ、おのおの、危険率0.01以下で有意な差を認めました。このことより、RA群においては脛骨の部位には関係なく、炎症に起因する骨の粗鬆化が生じたことを反映しているのではないかと考えました。内側型OA群は軟骨下骨の硬化を反映し、骨塩量の増大を認めたと考えます(図3)。

脛骨顆部中央でも同様の結果となり、OA群、コントロー

ル群、RA群の順に骨塩量の減少を認め、危険率0.01以下で有意な差を認めました。RA群は以上のようなことが原因と考えられ、OA群がコントロール群より有意に骨塩量が多いのは、中央部のなかでも内側よりの骨塩量の有意な多さが影響していると考えられますが、他にも要因があるかどうかは不明です(図4)。

脛骨顆部外側においては、OA群、コントロール群、RA群の順に骨塩量の減少が認められましたが、OA群とコントロール群との間は統計学的な有意な差は認めませんでした。今回対象のOA群がすべて内側型であることが、脛骨外側における骨塩量での差異を示さなかった一因と考えました(図5)。

第3腰椎椎体側面と脛骨顆部の骨塩量の間には各群において統計学的に有意な相関関係を認めました。代表と

図7 第3腰椎におけるBMDの相関

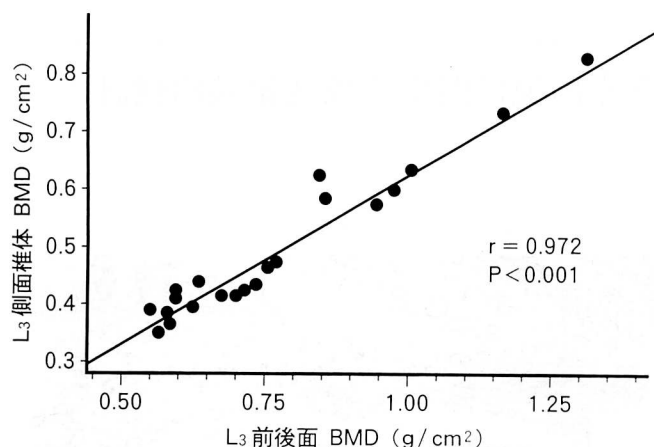


表3 まとめ

- 1) DEXA(二重エネルギーX線吸収測定法)を用いて脛骨顆部および第3腰椎椎体側面の骨塩量を測定した。
- 2) RA群はOA群およびコントロール群に比し、各部位において骨塩量の有意な低下を認めた。
- 3) 脛骨顆部外側においては、OA群とコントロール群との骨塩量には有意な差を認めなかった。
- 4) 脛骨顆部と第3腰椎側面椎体の骨塩量の間には統計学的に有意な相関関係を認めた。

表2 脛骨顆部の骨塩量

測定部位	(g/cm ²)		
	RA群	OA群	コントロール群
脛骨顆部 全体	0.519 ± 0.013	0.803 ± 0.016	0.676 ± 0.018
” 内側	0.528 ± 0.016	0.836 ± 0.010	0.689 ± 0.012
” 中央	0.464 ± 0.012	0.768 ± 0.025	0.614 ± 0.019
” 外側	0.523 ± 0.017	0.781 ± 0.027	0.678 ± 0.032

して、コントロール群における脛骨顆部と第3腰椎側面椎体の骨塩量の相関を図6に示します。荷重骨であることがこの相関に関係しているのではないかと考えます。

また、以前の検索により、第3腰椎前後像と同側面との骨塩量の間には有意な正の相関が認められていることより、スクリーニングのためには、特定時間の長い第3腰椎椎体側面よりも、同椎体前後面の測定のみでよいと考えました(図7)。

今回の脛骨顆部の骨塩量の測定結果をまとめると表2のようになります。各群のなかでの比較を行うと、脛骨顆部中央部が最も低い骨塩量を示しています。このことは、RA群、コントロール群において顕著です。脛骨顆部中央部は荷重の影響が少ないのではないかと報告もありますが、このことを支持する資料は、今回においては特にはもっていません。

まとめとして(表3)、

①DEXAを用いて脛骨顆部および第3腰椎椎体側面の骨塩量を測定しました。

②RA群はOA群およびコントロール群に比し、各部位

において骨塩量の有意な低下を認めました。

③脛骨顆部外側においては、OA群とコントロール群との骨塩量には有意な差は認めませんでした。

④脛骨顆部と第3腰椎側面椎体の骨塩量の間には統計学的に有意な相関関係を認めました。

DISCUSSION

白岡 RAの骨塩量の減少は炎症性によるものとのことですが、薬剤との関係等々から、他の部位での測定も必要ではないかと思いますが。

山田 今回、RAもOAもNSAIDしか使用していませんので、測定値の有意差においては、薬剤との関係は否定できると思います。

白岡 今回の測定作業は、どんな面に活用なさる計画ですか。

山田 これまでは概念的にRAの骨塩量は少ないといわれてきましたので、実際そうであるかどうか調べたということです。

リウマチ肺における線維化とS-100蛋白陽性細胞出現に関する免疫組織的検討

〔松山市民病院内科〕 吉野内 猛夫・水戸川 剛秀

表1 検討対象と検討方法

対 象			
RA lung	6例		
急性増悪	4例	剖 検	5例
慢性型	2例	開胸肺生検	1例
IPF	6例		
急性増悪	2例	剖 検	3例
慢性型	4例	開胸肺生検	3例
方 法			
Vimentin α -smooth muscle actin (α -SMA) S-100 proteinの各抗体を用いABC法にて免疫染色を行った。 評価は、++、+、+(-)、-(+)、-の5段階にて行った。			

図1 α -SMA染色 (RA肺急性増悪)

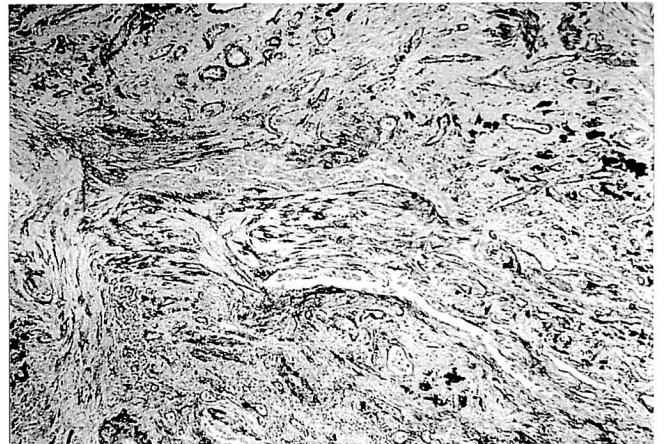
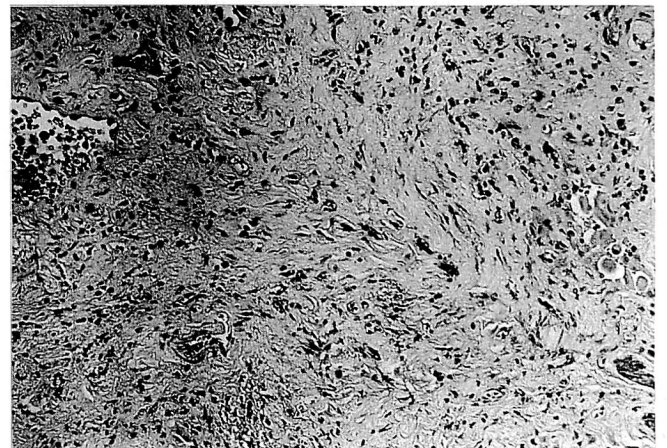


図2 α -SMA染色 (IPF)



特発性肺線維症(IPF)は alveolitis にはじまり interstitial fibrosis に進行する至死的疾患であり、その病理所見は UIP または DIP であり、急性増悪時には DAD を伴うとされています。一方、RA 肺の組織像はさまざまな病理所見から構成されており、Yousem は組織像を UIP、BOOP、BAD、cellular interstitial pneumonia、eosinophilic pneumonia などの各パターンに分類しています。しかしながら、IPF、RA 肺ともに大部分の病理所見は UIP パターンであり、基本的には IPF、RA 肺における間質性肺炎は同様の性状のものではないかといわれており、両者を決定的に区別することは困難です。

一方、S-100蛋白は1965年 Moore によってウシ脳で発見された蛋白質ですが、その後ヒトの各種組織に幅広く分布していることが知られており、リンパ網内系組織でも S-100蛋白陽性細胞が認められます。リンパ網内系細胞に S-100蛋白が存在することから、各種肺疾患、特に自己免疫と関連を有する免疫担当細胞が関与する間質性肺疾患において、S-100蛋白陽性細胞が出現する可能性が示唆されます。

そこで我々は、IPF と RA 肺における UIP 型間質性肺炎の鑑別点につき検討することを目的に、免疫染色を用いて、線維芽細胞の性状の違いおよび浸潤している S-100蛋白陽性細胞の有無や数、形態等について検討を行い、若干の知見を得たので報告します。

対象は、RA 肺は 6 例、うち急性増悪 4 例、慢性型 2 例

で、剖検 5 例、開胸肺生検 1 例です。IPF も 6 例のうち急性増悪 2 例、慢性型 4 例、剖検で 3 例、開胸肺生検 3 例です。

方法は、Vimentin、 α -SMA (α -smooth muscle actin)、S-100蛋白の各抗体を用い ABC 法にて免疫染色を行いました。評価は ++、+、+(-)、-(+)、-の 5 段階としました (表 1)。

図 1 は RA 肺の急性増悪時の α -SMA 染色ですが、茶色に染まっているのが SMA 抗体陽性細胞です。これはすべて Vimentin 陽性で Desmin 陰性で、 α -SMA 陽性の線維芽細胞です。すなわち筋線維芽細胞の性格を有しています。

表2 The distribution of α -smooth muscle actin antibody positive fibroblasts in RA lung and IPF

Case	Diagnosis	Honey-comb	UIP	BOOP
1	RA active	+	+	++
2	//	+	+	++
3	//	+	+	+
4	//	+	+	
5	RA inactive	++	+	++
6	//	+	(+)	++
7	IPF active	+	+	
8	//	+	++	
9	IPF inactive		+	
10	//	+	-(+)	
11	//	-	-	
12	//	-	-	

表3 S-100蛋白について

1965年	Mooreによりウシ脳で発見される。
性状	分子質 約2万、EF-band型Ca結合蛋白。 $\alpha \cdot \beta$ 鎖からなる二重体で $\alpha\alpha$ (S-100ao)、 $\alpha\beta$ (S-100a)、 $\beta\beta$ (S-100b)の3種類が有る。
組織存在	中枢神経、メラノサイト、軟骨細胞、脂肪細胞、筋上皮細胞、汗腺
ヒト腫瘍組織	悪性黒色腫、色素性母斑のマーカー 悪性神経鞘腫の診断 軟骨肉腫、脂肪肉腫の診断 histiocytosis Xでは陽性に染まる。 癌細胞でS-100陽性細胞が出現している症例は予後がよい。 suppressor/cytotoxic T細胞の一部で陽性 - 白血病、悪性リンパ腫 リンパ網内系細胞ではランゲルハンス細胞、リンパ節のintendingating cellに局在。

図2はIPFの α -SMA染色ですが、図1と違い α -SMA抗体では染まりません。これはVimentin抗体には染まりますので、Vimentin陽性の線維芽細胞です。

以上をまとめると表2になります。RA肺の場合は急性増悪例、慢性型ともに、Honey-comb、UIP、BOOPパターン等すべての組織で線維芽細胞が α -SMA抗体で染まります。すなわちRA肺では線維芽細胞は急性増悪例、慢性型のどちらも筋線維芽細胞の性格を有しています。

一方、IPFの場合は急性増悪では染まりますが、慢性型では(表では1例染まっていますが)一般にはあまり染まりません。ということは、IPFでは慢性型ではVimentin陽性の線維芽細胞ですが、それが急性増悪するとRAと同様筋線維芽細胞の増生が認められます。

S-100蛋白は、1965年にMooreによってウシの脳から発見された蛋白ですが、分子量が約2万のCa結合蛋白で、 $\alpha \cdot \beta$ の2種類の構造式があり、 $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ の3種類に分かれます。その後ヒトの組織にも存在することがわかってきており、特に中枢神経、皮膚、軟骨、脂肪、筋肉、

図3 S-100蛋白染色 (RA肺急性増悪)

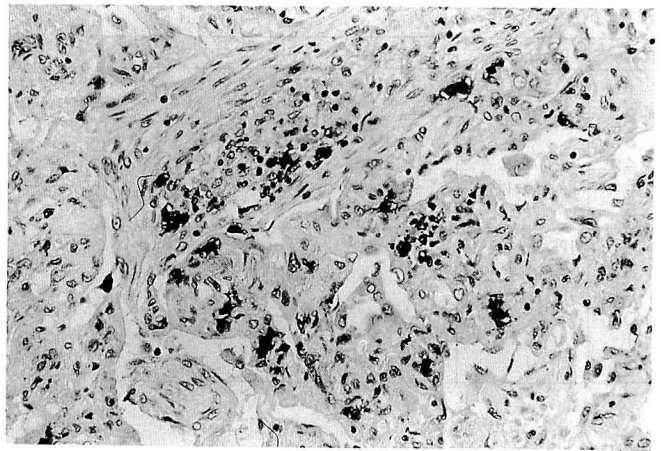
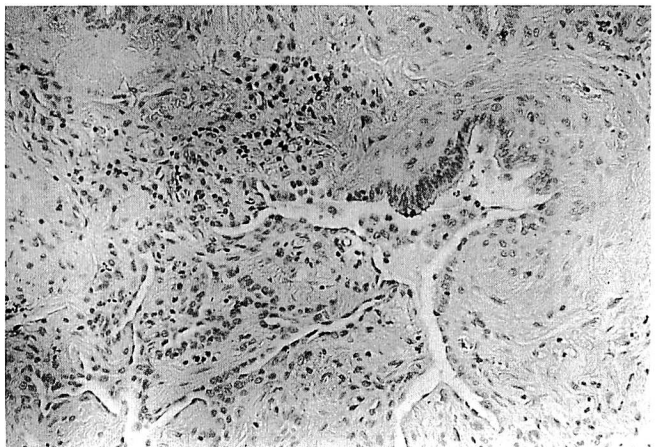


図4 S-100蛋白染色 (IPF)



汗腺などに多く分布しています。そこでこのような組織がガンになったときの診断として使われています。それ以外では、免疫担当細胞特に suppressor/cytotoxic T細胞の一部で陽性に染まり、活性型マクロファージ、CD8 T細胞でも陽性に染まります。またガンでS-100蛋白陽性細胞が多く出現している症例は予後がよいといわれています。しかし、臨床ではまだまだ研究が進んでおらず、特に間質性肺疾患でS-100蛋白の研究はありませんでした(表3)。

しかしながら免疫担当細胞でS-100蛋白が染まるのでRA肺でも染まるのではないかと思いました。図3はRA肺急性増悪時のUIP部分のS-100蛋白染色ですが、茶色に染まっているのがわかります。大小さまざまな細胞が染まっています。

図4はIPFのUIP部分ですが、S-100蛋白陽性細胞はまったくみられません。

上記をまとめたのが表4です。RA肺ではS-100蛋白陽性細胞が認められ、特に急性増悪例は各部に多くみられ

表4 The distribution of S-100 protein positive in RA lung and IPF

Case	Diagnosis	Honey-comb	UIP	BOOP
1	RA active	+	++	++
2	//	+	+	++
3	//	-(+)	+	+
4	//	++	+	
5	RA inactive	-(+)	-	++
6	//	-(+)	-	-
7	IPF active	-(+)	-	
8	//	-	-(+)	
9	IPF inactive		-(+)	
10	//	-	-	
11	//	-	-	
12	//	-	-	

表5 Relationship between RA, IPF activity

α -smooth muscle actin in UIP of RA lung and IPF				
		++~+	-(+)	-
RA	active (4)	4	0	0
	inactive (2)	2	0	0
IPF	active (2)	2	0	0
	inactive (4)	1	1	2

S-100 protein in UIP of RA lung and IPF				
		++~+	-(+)	-
RA	active (4)	4	0	0
	inactive (2)	0	0	2
IPF	active (2)	0	1	1
	inactive (4)	0	1	3

ます。また、BOOPにおいて非常に多くみられています。一方、IPFでは急性増悪、慢性型いずれにもS-100蛋白陽性細胞はみられません。

UIP部分だけを調べてみると(表5)、 α -SMA陽性の筋線維芽細胞はRAでは全例にみられ、IPFでは急性増悪のみに認められます。S-100蛋白はRAの急性増悪例では全例陽性、IPFでは全例陰性です。

血清(バイオプシー直前の)のLDHとの相関をみたのが表6です。急性増悪というのは臨床病理学的診断名ですから急性増悪の目安として、LDHが500以上かどうかで判断することにしました。結果は表5と同様に、RAでは全例が α -SMA陽性筋線維芽細胞で、IPFではLDH>500では全例、LDH<500では1例が α -SMA陽性筋線維芽細胞でした。

S-100蛋白においては、RAではLDH<500で2例が陰

表6 Relationship between RA, IPF and LDH

α -smooth muscle actin and LDH				
		++~+	-(+)	-
RA	LDH>500 (3)	3	0	0
	LDH<500 (3)	3	0	0
IPF	LDH>500 (2)	2	0	0
	LDH<500 (4)	1	1	2

S-100 protein and serum LDH				
		++~+	-(+)	-
RA	LDH>500 (3)	3	0	0
	LDH<500 (3)	1	0	2
IPF	LDH>500 (2)	0	1	1
	LDH<500 (4)	0	1	3

表7 結語

1. RA肺における線維芽細胞は全例が α -SMA陽性の筋線維芽細胞であった。
2. IPFの線維芽細胞は急性増悪例を除けばVimentin陽性の線維芽細胞であった。
3. S-100蛋白陽性細胞はRA肺ではBOOPパターンを伴う急性増悪例において顕著であった。IPFでは一般に認められなかった。
4. 以上の結果からRA肺とIPFにおけるUIP型間質性肺炎は、線維芽細胞、S-100蛋白陽性細胞共に異なっており、両者により鑑別できる可能性が示唆された。

性ですがそれ以外はすべて陽性です。IPFでは全例陰性でした。

まとめますと(表7)、

RA肺における線維芽細胞は全例が α -SMA陽性の筋線維芽細胞の増生でした。また、IPFの線維芽細胞は急性増悪を除く慢性型ではVimentin陽性の線維芽細胞であり、筋線維芽細胞ではありません。

S-100蛋白陽性細胞は、RA肺で特にBOOPパターンを伴う急性増悪において著明に認められますが、IPFでは急性、慢性に関係なくまったく認められません。

以上のことから、RA肺とIPFにおけるUIP型間質性肺炎は、線維芽細胞、S-100蛋白陽性細胞を検討することによって、両者を鑑別できる可能性が示唆されました。

DISCUSSION

奥田 RAの滑膜でのS-100蛋白、および特発性BOOPの場合は文献的にありますでしょうか。

吉野内 滑膜については正常の軟骨細胞がS-100陽性と思いますが、急性RAで活動性のあるときの滑膜細胞のS-100に関してはあまり検討されていないのではないかと思います。しかし、滑膜細胞も免疫担当細胞の性格をもっていますから、S-100陽性である可能性はあると思います。BOOPの場合は、筋線維芽細胞とそうでないものの2種類がありますが、S-100陽性細胞はでてこないと思います。

柴田 私も以前、S-100に興味をもち、S-100陽性ということさまざまな場面で鑑別材料としてきたのですが、骨細胞にもでる(染まる)し神経細胞にもでる、どこにでもでるような感じで、実際、S-100をどこまで信じ活用したらよいか疑問視するよう

になったのです。

吉野内 これまでのS-100は診断学として利用されてきて、どの細胞にも(S-100がどこの組織にもあるので)染まるということで、確かに研究が薄れてきています。しかし、肺についてはほとんど研究されていません。例えば、正常肺では細気管支の4次分岐まではS-100陽性細胞があるようですが、間質については正常肺ではまったくありません。間質性肺炎はどうかと調べてみたら、IPFではどの切片をみても染まっていない、一方RA肺ではよく染まったということで、同じ間質性肺炎でもIPFのものかRAのものかを判断する材料になるのではないかと思います。

しかし、S-100自体はなんの細胞かということまでは、私たちにもわかりません。免疫担当細胞のひとつと捉えて発表しましたが、本当のところは、実態がつかめていないのです。

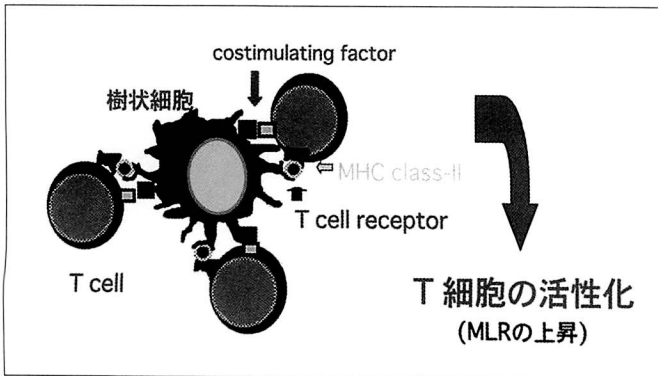
原発性胆汁性肝硬変における樹状細胞機能異常

(愛媛大学第三内科) S.M.F. アクバル・山本 和寿・谷本 憲治・二宮 常之・舩本 俊一
道堯 浩二郎・堀池 典生・恩地 森一

図表1 PBCの自己免疫疾患としての特徴

- *胆管上皮細胞への MHC class II の異常発現
- *胆管上皮細胞周囲への免疫担当細胞の浸潤
- *AMA を始めとする自己抗体の出現
- *IgM が高値
- *他の自己免疫疾患の合併
- *HLA-DR 依存性 (HLA-DRB1 0803, 0405)

図表2 樹状細胞による T 細胞の活性化



私たちは、抗原提示細胞のなかで最も強力である樹状細胞について、これまで B 型肝炎、C 型肝炎、肝硬変、肝細胞癌において研究してきました。この度、原発性胆汁性肝硬変における樹状細胞機能について検討しましたので報告します。

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は自己免疫疾患のひとつであることは周知の通りです。その特徴としては、胆管上皮細胞への MHC class II の異常発現、胆管上皮細胞周囲への免疫担当細胞 (リンパ球) の浸潤、AMA をはじめとする自己抗体の出現、IgM の高値、他の自己免疫疾患の合併、HLA-DR の依存性などがあげられます (図表 1)。

自己免疫疾患の場合、リンパ球の異常について様々な報告がありますが、私たちは、リンパ球が活性化する前段階に注目し抗原提示細胞の異常について検討しました。

図表 2 は免疫反応の機序を示したものです。これら T cell、MHC class II、costimulating factor などが反応し、

図表3 対象

	PBC	Normal Control	CH-C
Number	29	22	17
Age (years)	55.0 ± 2.2	44.0 ± 3.0	55.4 ± 3.3
Sex (M:F)	3:26	12:10	9:8
ALT (9-37 IU/l)	47.8 ± 6.6	26.9 ± 2.5	53.8 ± 8.2
AST (3-49 IU/l)	55.0 ± 10.7	31.3 ± 2.0	66.8 ± 12.2
IgM (35-220 mg/dl)	430.0 ± 60.0	ND	110.5 ± 0.5
ALP (57-194 IU/l)	358.0 ± 36.0	156.7 ± 19.9	167.4 ± 15.2
Platelet (x10 ⁴ /μl)	23.2 ± 1.8	27.4 ± 2.6	17.0 ± 1.1

mean ± SE
ND; not done

図表4 末梢血からのリンパ性樹状細胞の分離法

末梢血からのリンパ性樹状細胞の分離法
(cytokine-enrichment method)
(Romani et.al, J.Exp.Med,1994)

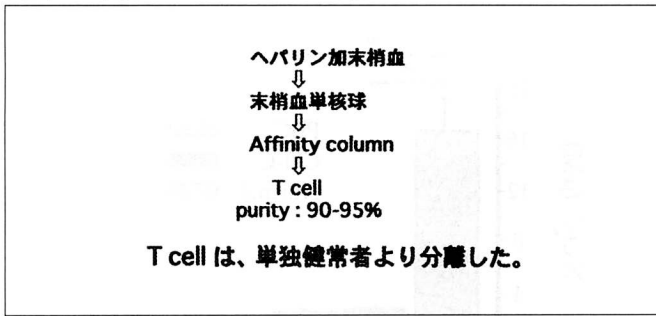
ヘパリン加末梢血 20~30ml
↓
末梢血単核球
↓
30mm plastic dish 上で 2 時間培養
↓
非附着細胞を除去
↓
IL-4 (500U/ml) ・ GM-CSF(800U/ml) 下で 8 日間培養
↓
リンパ性樹状細胞 enriched 分画
2x10⁵~1x10⁶ cells from 20~30ml peripheral blood
purity : 75-85%

活性化されたリンパ球が出てきます。こうした細胞反応のところで問題があれば当然、異常が出てくるわけです。そこで今回、この樹状細胞に着目しました。

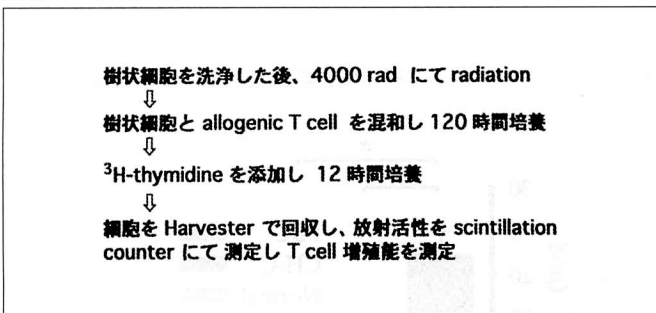
図表 3 は検討対象例を表にしたものです。PBC 29例、CH-C 17例、Normal Control 22例です。年齢の差異はほとんど認められませんが、性別において PBC は女性が顕著でした。その他 IgM と ALP においても PBC が顕著でした。

樹状細胞は末梢血由来としました。もともと樹状細胞は非常に少ない細胞であり、リンパ球1000個当たり 1~5 個しかありません。単離は 2 通りで行いましたが、まず、図表 4 はサイトカインを用いた方法です。ヘパリンを加えた末梢血 20~30ml を図表の順に処理し、最後に IL-4、GM-CSF で 8 日間培養し、purity 75~85% の樹

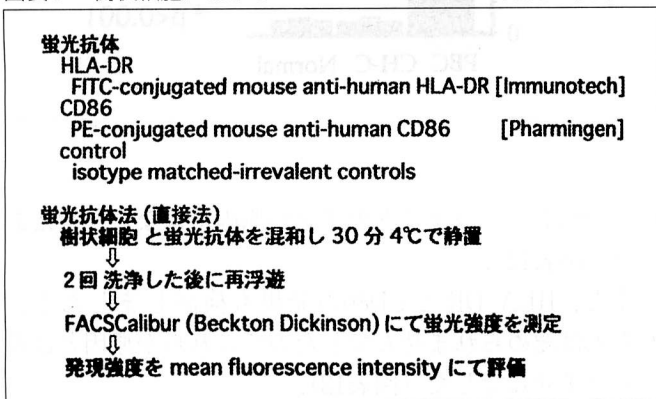
図表5 末梢血からの T cell の分離法



図表6 検討方法



図表7 樹状細胞における HLA-DR と CD86 の発現の検討



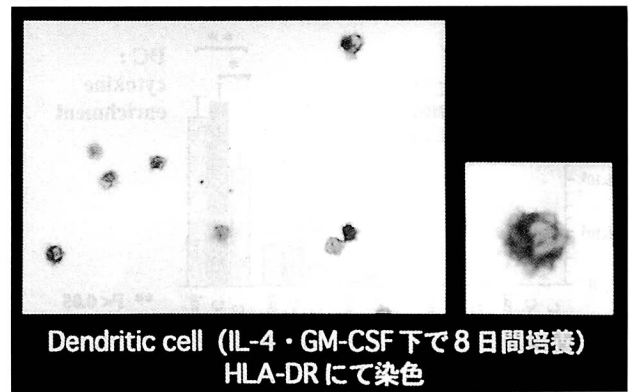
状細胞を単離しました。

末梢血からの T 細胞の抽出は図表5のように行い、purity90~95%の T 細胞を得ました。なお、単離にあたり、単独健常者のものを使用しました。

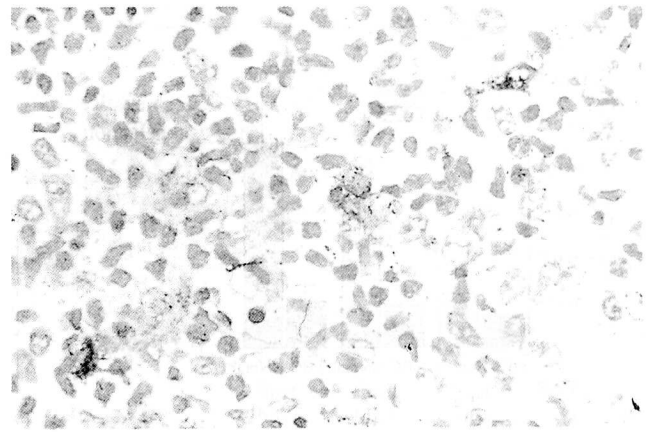
樹状細胞を洗浄した後、4000rad にて radiation、樹状細胞と allogenic T 細胞を混和して120時間培養、それに³H-thymidine を添加し12時間培養し、細胞を Harvester で回収、放射性活性を scintillation counter にて測定し T 細胞増殖能を測定しました(図表6)。

樹状細胞における HLA-DR と CD86 の発現の検討をしました(図表7)。図表に記した方法にて樹状細胞の蛍光強度を測定し、発現強度を mean fluorescence inten-

図表8 HLA-DR 染色樹状細胞



図表9 PBC 症例の肝組織 CD83染色(門脈域)



sity にて評価しました。

図表8は IL-4、GM-CSF 下8日間培養で採取した樹状細胞を HLA-DR にて染色したものです。小さいので突起がわかりにくいと思います。B 細胞・T 細胞のマーカーは陰性でした。しかし最近、樹状細胞のもう1つのマーカー、CD83が認められましたので、PBC 群の肝内に CD83があるかどうか調べました。

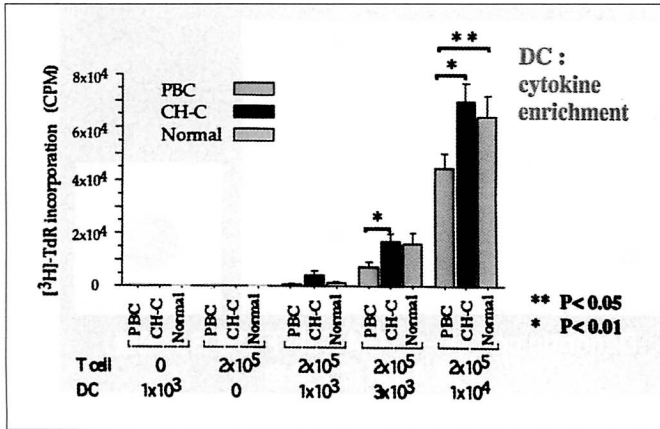
図表9では PBC 症例の肝組織 CD83陽性の樹状細胞がパラパラと点在しており、破壊された胆管周辺にも樹状細胞の存在を認めました。

結果、CH-C と健常者に比べ、PBC 群の blastogenesis は非常に低いことがわかりました(図表10)。

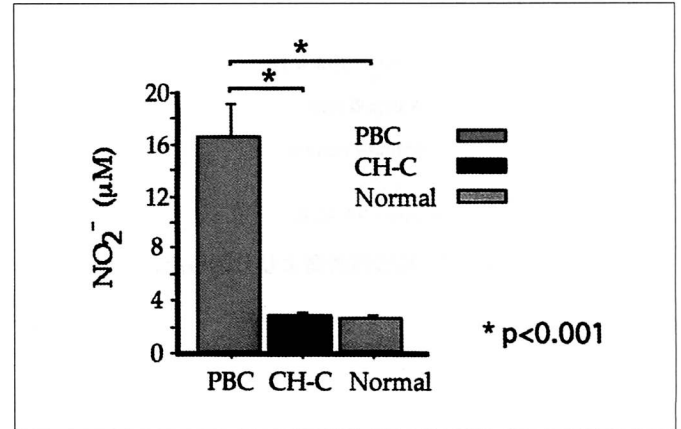
もう一方の手法(negative selection)でも健常者に比べ blastogenesis が PBC 群において有意に低い結果となりました(図表11)。

PBC において blastogenesis のレベルが低い原因として、IL-10、IL-12の allogenic MLR supernatant の中で産生をみましたが有意差はありませんでした。DC(樹状細胞) supernatant でも IL-12において産生をみましたが有意差はありませんでしたので、一応、PBC 樹状

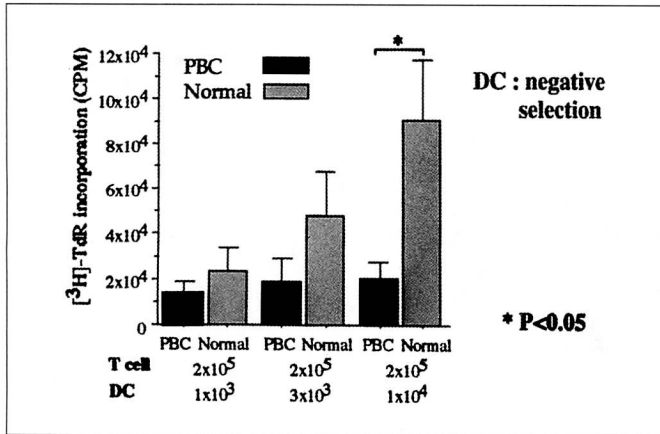
図表10



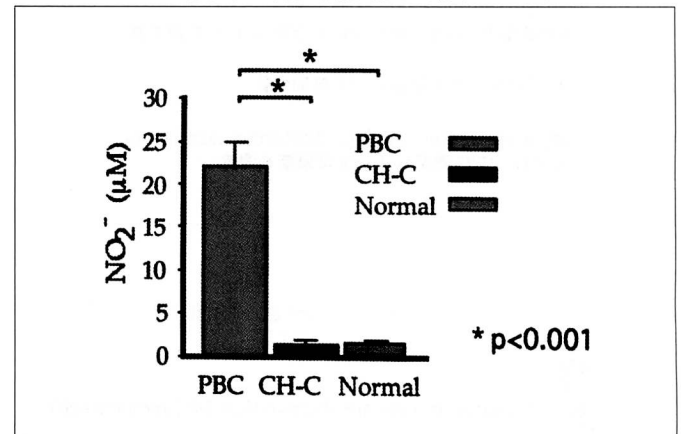
図表14 Allogenic MLR 培養上清中の NO 産生



図表11



図表15 SACS 刺激下の樹状細胞培養上清中の NO 産生



図表12

	Allogenic MLR Supernatant		DC supernatant
	IL-10 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)
PBC	27.5 ± 8.3 (13)	65.0 ± 20.8 (11)	132.9 ± 75.1 (7)
CH-C	31.9 ± 9.0 (11)	111.9 ± 51.0 (10)	173.3 ± 96.0 (6)
Normal	29.9 ± 12.9 (8)	61.1 ± 21.9 (7)	237.0 ± 105.6 (5)

Mean ± SE

細胞の機能低下はサイトカインが原因ではないと考えました (図表12).

また、HLA-DR と CD86 の発現も検討しましたが、有意差は認められませんでしたのでこれらが原因とは考えられませんでした (図表13).

次に、方法は提示しませんが、allogenic MLR 中の NO の産生を検討しましたら、PBC の樹状細胞が低下したところで、CH-C、Normal より NO の産生が約 4 倍と有意に差がありました (図表14).

SACS 刺激下の樹状細胞の NO の産生をみたところ、PBC は CH-C、Normal より約 10 倍と有意差がありました (図表15).

そこで、NO が allogenic MLR に関与しているかどうか検討するために、NO のインヒビター L-NMMA を用いたところ NO の産生も減少しましたし、allogenic MLR も高くなりました (図表16) ので、樹状細胞の機能に NO が働いていると考えられました。

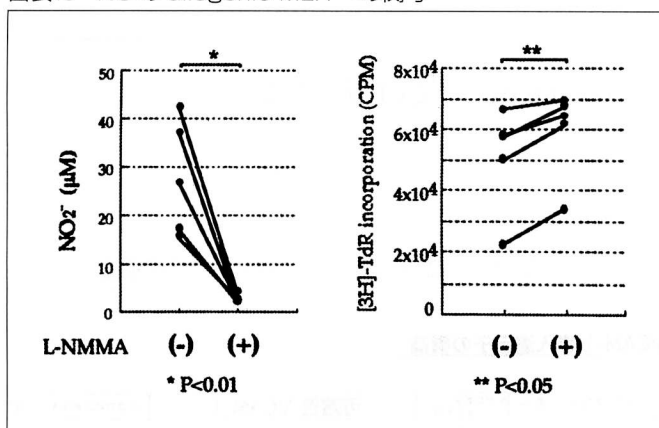
iNOS 染色では、健常者の樹状細胞、同 T 細胞、PBC

図表13 Dendritic cell surface marker の変化

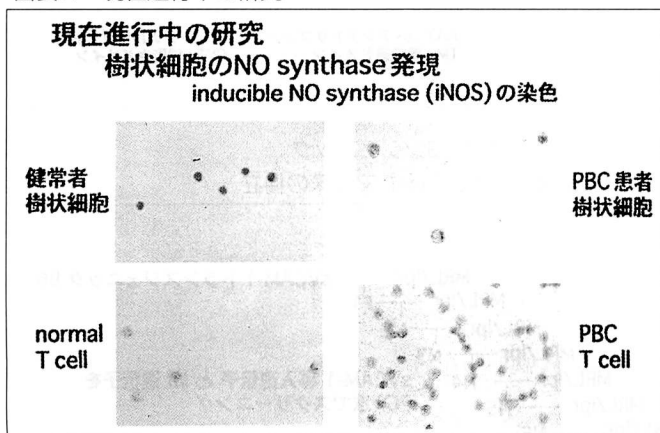
	HLA-DR		CD86	
	mean ± SE	NS	mean ± SE	NS
PBC (3)	116 ± 27	NS	156 ± 32	NS
CH-C (4)	132 ± 28		117 ± 45	
normal (5)	117 ± 45		176 ± 34	

mean fluorescence intensity
mean ± SE
NS : not significant

図表16 NOのallogenic MLRへの関与



図表17 現在進行中の研究



図表18 まとめ

1. PBC では Allogenic MLR の培養上清と、樹状細胞からの NO 産生が著明に増加していた。

2. NO inhibitor である L-NMMA の添加により、PBC で低下していた allogenic MLR の回復がみられた。

の T 細胞は染色していませんが、PBC の樹状細胞は染色されていました (図表17)。

以上の結果をまとめますと、PBC では allogenic MLR で樹状細胞機能の低下の原因の1つは NO の関与が明らかになったと思われます。iNOS でも同様の結果が得ました。今まで、PBC では胆管破壊がありますが、胆管のところでも iNOS の発現がありましたので、NO による PBC では胆管の破壊も可能性として考えられます。現在、NO のインヒビター L-NMMA を用いて PBC の新しい治療法を検討中です (図表18)。

なお、本発表の内容は次の論文に載っております。

- 1) Yamamoto et. al. clin Exp Immunol 1998 ; 114, 94
- 2) Shinomiya et. al. Hepatol Res 1998 ; 11, 84
- 3) Tanimoto et. al. Pathoe Res Prac 1999 ; 195, 157

DISCUSSION

内 海 PBC の患者の DC からの推論はできない？
 アクバル それはできると思います。例えば樹状細胞はひとつは抗原提示する、もうひとつ樹状細胞は免疫刺激するといわれていましたが、トレランスに一番重要な細胞といえます。もし、トレランスのある樹状細胞のファンクションが減少すると自己免疫が発生する可能性が残ると思います。

内 海 論理的に難しい論理だと思いますが。
 アクバル ヒト樹状細胞が分離可能となったのは最近のことですし、サブタイプのこと最近のことです。樹状細胞のファンクションが下がるのは、すべて抗原提示を刺激する細胞のファンクションが下がっているのか、トレランスに関する樹状細胞のファンクションが下がっているかはっきりわかりません。

内 海 iNOS は普通 induction によって発病しますが、この例の DC はコスチュータイプに iNOS をエクソプレスしてますね。これは遺伝子レベルの問題ですか。

アクバル はい。そのため、樹状細胞は末梢血から採取した後、IL-4、GM-CSF 下で8日間培養しました。現在、1日目2日目と連続して iNOS の発現の実験をしています。

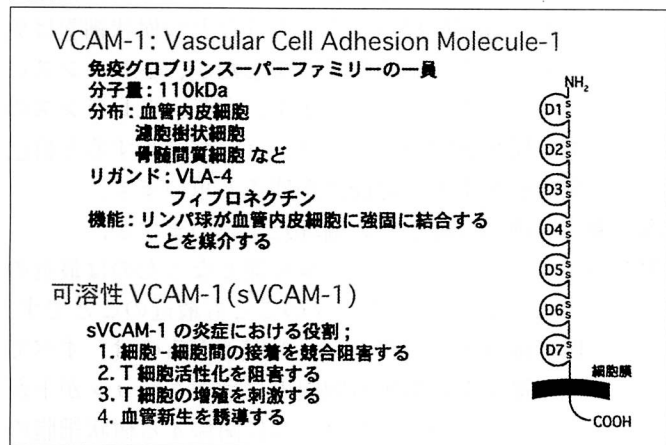
内 海 末梢血から DC を採取して検討した結果がこの (発表の) ようだった、胆道のライニング DC も NO が高値だったわけですね。するとこれは全身のシステミックな現象だとお考えなのですか。末梢血からの DC は大方はスキン (皮膚) 由来のもの、ランギュラハウスがニクロードに戻ってブラッド経由で組織に送られる、その過程のものをつかまえたものがほとんどだと思うのです。まあ、そればかりではないと思いますけれど、それで皮膚の病変が起こらないというのは？

アクバル この樹状細胞が皮膚経由であるかまっすぐきた CD34陽性の樹状細胞であるかはっきりわかりません。皮膚病変がないから皮膚経由ではないのではと推測はできますが、いれずにしても今後の実験、検討により明らかにしたいと思います。

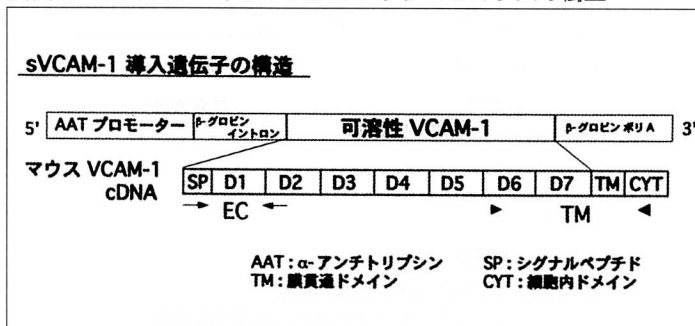
可溶性 VCAM-1 の過剰発現が MRL/lpr マウス関節炎に及ぼす影響

〔愛媛大学整形外科¹、第2病理²〕 水木 伸一^{1,2}・鴨川 淳二^{1,2}・大石 久史^{1,2}・寺田 美穂²・奥村 秀雄¹
柴田 大法¹・能勢 真人²

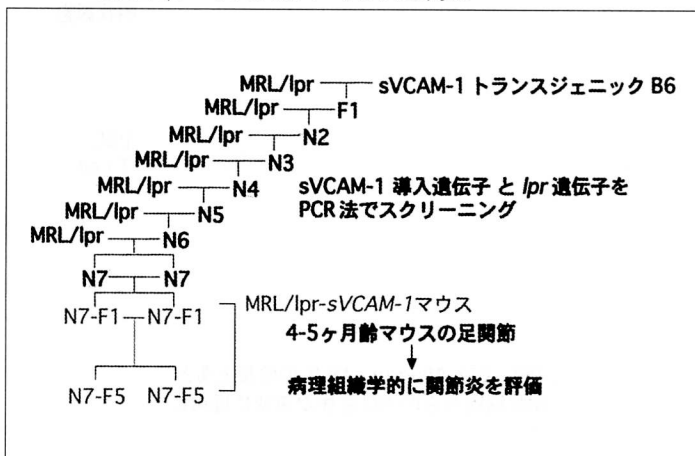
図表 1



図表 2 sVCAM-1 トランスジェニック B6 マウスの樹立



図表 3 リコンビナント コンジェニック MRL/lpr-sVCAM-1 マウスの樹立



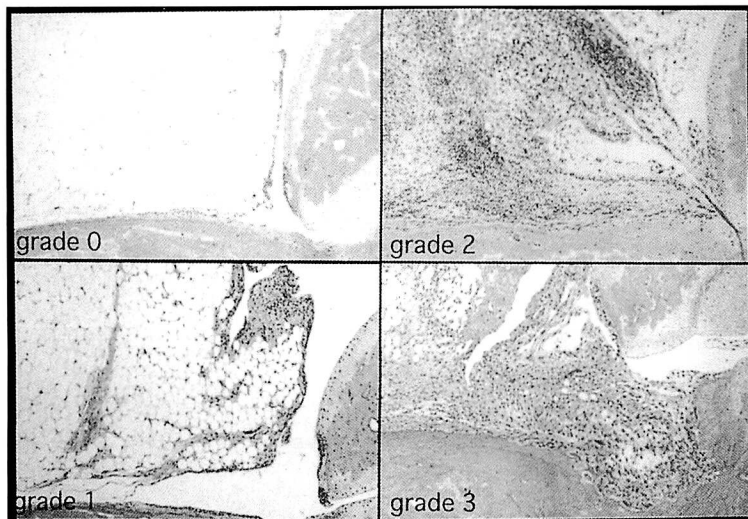
MRL/lpr マウスは常染色体劣性遺伝形式をとる Fas の欠変異遺伝子 *lpr* を有しており、同一固体内に糸球体腎炎や血管炎とともに慢性関節炎など多彩な病像を自然発症します。今回我々は、このマウスに可溶性接着分子である可溶性 VCAM-1 (sVCAM-1) を過剰に発現できるマウスを作製して、その関節炎に及ぼす効果を解析しましたので報告します。

VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) は免疫グロブリンスーパーファミリーの一員で、分子量は 110kDa、細胞外に 7 つのドメインを有する膜結合型の蛋白です。血管内皮細胞やリンパ節濾胞樹状細胞上にサイトカインによって誘導され発現されます。その機能としては、リンパ球上のリガンドである VLA-4 と強固に結合することで、リンパ球の遊走やホーミングを誘導します。その可溶性蛋白である sVCAM-1 は、細胞表面より酵素的に分断されることによって産生されると考えられています。近年これらの可溶性接着分子は慢性関節リウマチなどの種々の炎症性疾患の患者血清中で上昇していると報告されています。sVCAM-1 の炎症における役割として考えられているものに、細胞間接着を競合的に阻害し、また T 細胞活性化を阻害し炎症を終息させていく作用、その一方で、T 細胞の増殖を刺激し、血管新生を誘導する作用などが報告されています (図表 1)。

我々はまず、マウスの VCAM-1 の cDNA より細胞外ドメイン部分のみをコードする領域 (図表 2 の SP~D7) を sVCAM-1 として、αアンチトリプシンプロモーター (AAT プロモーター) 下に B6 マウスに導入して sVCAM-1 transgenic マウスを作製しました。AAT プロモーターは肝細胞で特異的に働くプロモーターであり、この transgenic マウスでは肝細胞より sVCAM-1 が過剰に血中に分泌されます。

この transgenic マウスを用いて、sVCAM-1 の導入遺伝子を MRL/lpr マウスにさらに導入するために、図表 3 に示すように、戻し交配の方法により導入しました。まず、transgenic マウスと MRL/lpr マウスとを交配させ、その子供を再び MRL/lpr マウスに交配させてでき

図表4 関節炎の病理組織学的 grade



図表6

結語

1. MRL/lpr-sVCAM-1マウスを樹立した。

2. sVCAM-1 は、MRL/lpr マウス関節炎の発症及び進行に対して増悪効果を示した。

図表5 結果

grade	sVCAM-1(+) MRL/lpr		MRL/lpr		χ^2	P
	1, 2, 3	0	1, 2, 3	0		
	88 (89.8)	10 (10.2)	79 (74.5)	27 (25.5)	8.0	0.005
grade	2, 3	0, 1	2, 3	0, 1	χ^2	P
	47 (48.0)	51 (52.0)	22 (20.8)	84 (79.2)	16.8	0.00004
grade	3	0, 1, 2	3	0, 1, 2	χ^2	P
	8 (8.2)	90 (91.8)	4 (3.8)	102 (96.2)	1.8	0.18
No. of mice (%)						

た子供を PCR 法で確認して sVCAM-1 導入遺伝子と *lpr* 遺伝子をもった個体をさらに MRL/lpr マウスに交配させていきます。この交配を7世代繰り返した後に兄妹交配させて MRL/lpr マウスで sVCAM-1 を過剰に発現できる新たな congenic マウス MRL/lpr-sVCAM-1 マウスを作製しました。このマウスの4~5ヵ月齢で足関節を採取して病理組織学的に、関節炎の程度を評価しました。

評価に用いた grading を図表4に示します。grade 0 = 正常、grade 1 = 軽度の炎症細胞浸潤を伴う滑膜増殖を認めるもの、grade 2 = grade 1 に加え滑膜下組織に肉芽形成を伴うもの、grade 3 = grade 2 に加えパンス形成を認めるもの、この4段階で評価しました。

結果を図表5に示します。組織学的に grade 2 以上を示した個体は、MRL/lpr マウスでは100匹中22匹20.8%であったのに対して MRL/lpr-sVCAM-1 マウスでは98

匹中47匹48.0%で有意差を認め、sVCAM-1 は関節炎に進行的に働いていると考えられます。また、組織学的に grade 0 と正常にとどまった群は、MRL/lpr マウスは27匹25.5%であったのに対し MRL/lpr-sVCAM-1 マウスは10匹10.2%と、こちらも有意差を認め、関節炎の発症に対しても促進的に sVCAM-1 が働いていると考えられました。

まとめ (図表6)

今回我々は、MRL/lpr マウスに sVCAM-1 を過剰に発現できる新たな congenic マウスを作製しました。

sVCAM-1 は関節炎の発症および進行に対して増悪的に働いていることが示されました。

今後、この作用機序について解析していく予定です。

DISCUSSION

内海 sVCAM-1 の遺伝子の導入により他の、例えば、膜型 VCAM-1 の expression が増強されたということはないですか。

水木 関節局所では調べていませんが、肝細胞では亢進していませんでした。

内海 予測では抑制するだろうということだったんですか。

水木 はいそうです。

内海 soluble な接着因子が、例えば膜型のそれよりも100倍産生されたとしても膜型 VCAM-1 のファンクションはそれほど影響を受けないと思います。相当のオーダーの違いがあって、はじめて抑制するだろうと思います。つまり、細胞と細胞が接着して、その接着に VCAM-1 がファンクショ

ンしている面と、solubleなものが付いたり離れたりしているが力としては雲泥の差だと思ったのです。solubleのVCAM-1が多量に産生されても軽快はしないだろうという予測はしていましたが、むしろ増悪したというのは驚きました。

横 田 他に質問がありますでしょうか、なければ今回の研究会での前半の発表を終わらせていただきます。

超早期 RA 関節局所における滑膜病変と TCR レパトアの解析 (症例報告)

〔愛媛大学病理学第二¹・整形外科²〕 鴨川 淳二^{1,2}・大石 久志^{1,2}・山本 晴康²・能勢 真人¹
 〔松山赤十字病院リウマチセンター〕 田窪 伸夫・山本 純己

図表 1 早期 RA の診断基準 (日本リウマチ学会, 1994)

<ol style="list-style-type: none"> 1. 3 関節以上の圧痛または他動関節痛 2. 2 関節以上の腫脹 3. 朝のこわばり 4. リウマトイド結節 5. 赤沈 20mm 以上の高値または CRP 陽性 6. リウマトイド因子陽性 <p style="text-align: center;">以上 6 項目中 3 項目以上を満たすもの</p>
--

図表 2

<h3>早期 RA の病理組織評価における問題点</h3> <ol style="list-style-type: none"> 1. 病型 (Group) 2. 病変の時間軸 (Stage) 3. 選択した治療法
--

図表 3 目的と方法

目的	超早期 RA 滑膜での免疫反応と関節病理を解明すること
患者対象	発症 1 ヶ月以内の超早期 RA 患者で未治療のもの
材料と方法	<ol style="list-style-type: none"> 1. 膝関節関節鏡視下に部位別に滑膜組織を採取し (Target Biopsy)、病理組織学的な評価を行う。 一般染色 : H&E 特殊染色 : PAS, Elastica & Masson 免疫染色 : CD3, CD4, CD15, CD68, L26, PCNA 2. 滑膜凍結標本 (-80℃) を用いて、RT-PCR 法による病変局所の免疫反応を解析する。 TCR-V β レパトア サイトカイン : IL-1beta, IL-6, TNF-alpha ケモカイン : FKN, MCP-1, RANTES, IL-8, 接着分子 : E-selectin, ICAM-1, VCAM-1

図表 4 対象患者

Patient	Age/sex	Diagnosis & Complication	Disease duration	Autoantibody	Sampling date
1.	K. N. 65/F	RA	1 mo.	AMA 抗平滑筋抗体	980729
2.	E. W. 41/F	RA	4 mo.	-	981216
3.	Y. K. 39/F	RA	6 mo.	-	990728
4.	M. I. 35/M	RA	1 mo.	-	991011
5.	M. S. 21/F	RA, polymyositis ミオマイシシ内服	1 mo.	ANA	990811
6.	S. S. 61/F	SLE, RA	8 mo.	RF, AMA, 抗 Gal 欠損 IgG 抗体 抗 dsDNA 抗体	991013
7.	K. M. 27/F	RA, 結節性紅斑	3 weeks	-	000126
8.	K. K. 64/F	RA, OA	2 mo.	抗 Gal 欠損 IgG 抗体	000315

今回、超早期 RA の滑膜病理所見を RA の御専門の先生方に見ていただこうと思い、ここに提示する。

図表 1 は早期 RA の診断基準であるが、ここに示した 6 項目中 3 項目を満たすものを早期 RA と診断する。通常慣習的に発症 1 年未満ととらえる先生方も多いようである。多くの膠原病の診断基準のなかには病理組織所見を入れたものもあるが、通常、診断基準は、簡便で使いやすいという意味合いのものなので、早期 RA の診断基準に病理所見が入っていても当然であると考えられる。

しかしながらここでいう「早期」という言葉は、臨床的な概念であるので、病理学的または免疫学的に何が、

早期の RA に特異的であるのかは不明である。またそれを決める問題点として RA の group (病型) や stage (病期)、選択した治療法を考えなければならない(図表 2)。

今回の研究の目的は、超早期 RA (この言葉は適切であるかわからないが、ここでは、この表現を使用する) 滑膜での免疫反応と関節病理を解明することである。その対象は、発症 1 ヶ月以内の超早期 RA 患者で未治療のものとした。方法は①膝関節関節鏡視下において部位別に滑膜組織を採取 (Target Biopsy) して病理学的な評価を行う。②手術時に取った滑膜凍結標本を用いて RT-PCR 法により病変箇所の免疫反応を解析する。という

図表 5 RA の組織病理所見

Synovial lining layer	multi-layer: 3-4 layers 5-6 layers* palisading : typical* non-typical giant cell : foreign body type non-foreign body type*	* : specific in RA:
Sublining layer	neutrophil infiltration plasma cell infiltration* lymphocyte infiltration : diffuse infiltrates focal aggregates lymphoid follicles* macrophage infiltration* fibrin deposition* neo-vascularization mesenchymoid transformation* fibrosis	

鴨川他、病理と臨床 Vol.17 1999

図表 6 滑膜組織所見 (症例 No.1, H&E)



図表 7 図表 6 の強拡大 (H&E)



方法で、まず、TCR-V β レパトアを調べることにした (図表 3)。

一昨年の夏より、日赤リウマチセンターの協力を得て、現在まで未治療の早期 RA 患者 8 名を登録し、滑膜組織をサンプリングした (図表 4)。このうち今回は図表中 1、4、7 の発症 1 ヶ月未満の患者 3 症例について症例報告の形で提示する。

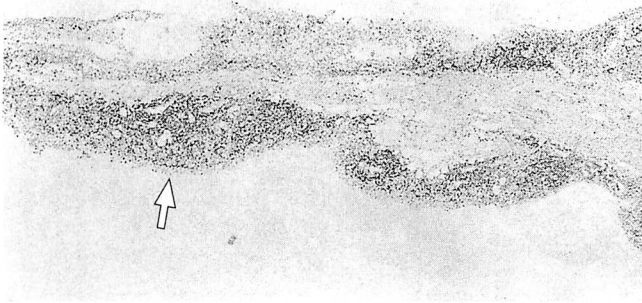
No 1 の症例は 65 歳女性で、抗平滑筋抗体が陽性である。No 4 は 35 歳男性で、自己抗体はなく、No 7 の症例は 27 歳女性で、皮膚病変があり、発症 3 週目に Biopsy を行った。

最初に、病理組織学的解析結果を提示する。まず preliminary に OA と RA の滑膜を比較して既に報告している (鴨川他、病理と臨床) が、図表 5 に示すごとく病理所見を見る際には、2、3 層の滑膜細胞からなる、最

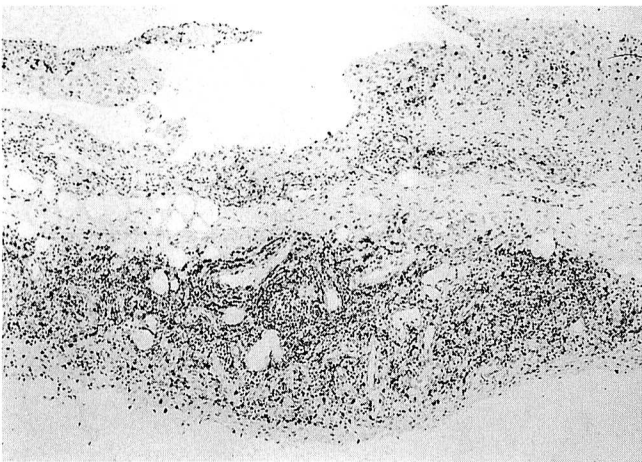
表層の lining layer と、その下にある sublining layer に分けて考えると、オリエンテーションが付きやすいかと思われる。図表の [] で示した所見が、OA と比して RA に比較的特異的である。たとえば lining の層では最表層の滑膜細胞は 5~6 層に多層化し、典型的な柵層配列がみられる (最表層の細胞は何十層になったりするものではない)。sublining の変化はもっと重要で Plasma cell macrophage の浸潤、リンパ濾胞の形成、そして Mesenchymoid transformation という最も RA に特徴的な病理所見を呈してくる。

図表 6 は No 1 の症例の滑膜組織の HE 所見だが、この (⇒) ように病変は滑膜表層とその直下に局限している。矢印の部分が強拡大してみると (図表 7)、滑膜細胞の典型的な柵層配列 (➡) と、その直下 (⇨) に形質細胞、リンパ球の浸潤を認めている。

図表8 免疫染色 (CD3)



図表9 図表8の強拡大 (CD3)

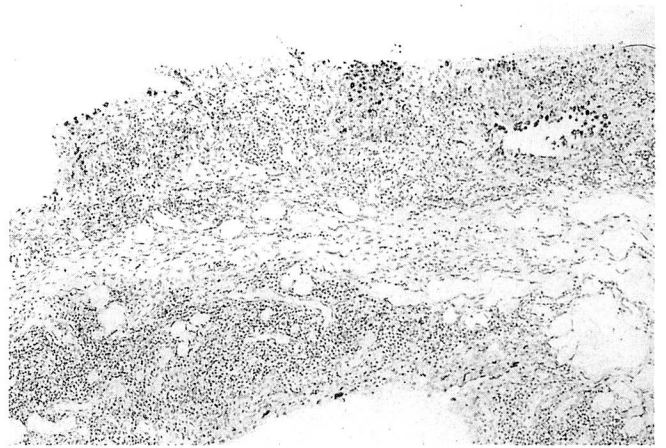


図表10 免疫染色 (L26)

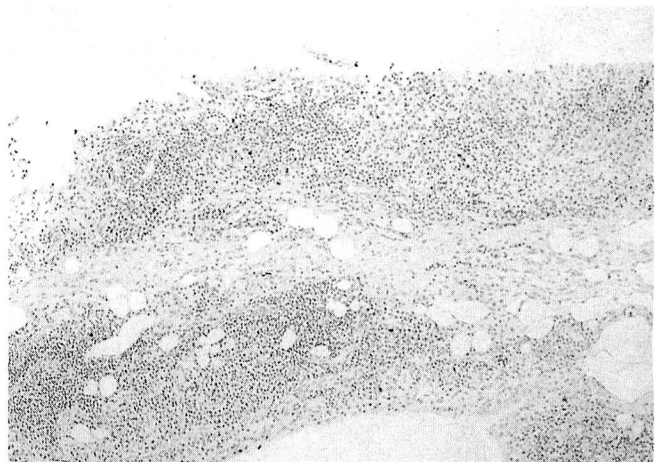


ここから免疫染色であるが、以下すべての染色で陽性の細胞は茶色に確認ができる(本紙上では黒色)。まずT細胞(CD3)を染めてみると(図表8)、病変部位に一致して滑膜表層にび慢性に浸潤していることがわかる。矢印のあたりを強拡大してみると(図表9)、この

図表11 免疫染色 (CD68)



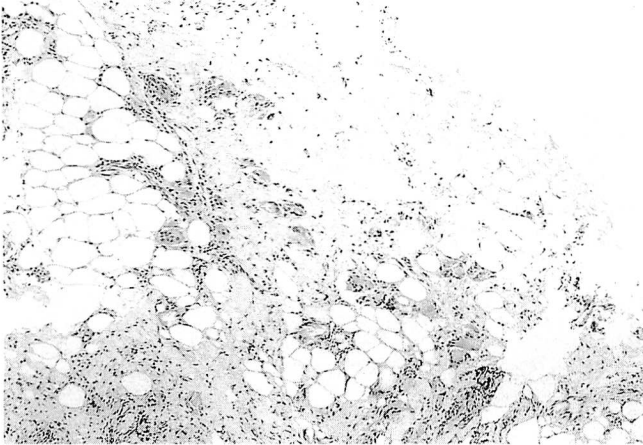
図表12 免疫染色 (CD15)



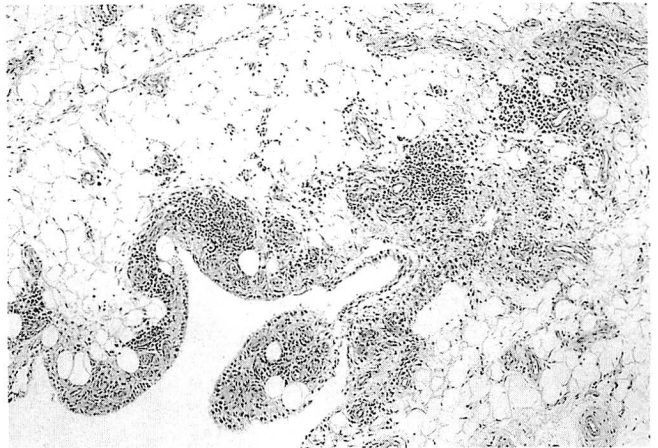
ように早期からT細胞が多数浸潤しているのがわかる。一方、図表10はB細胞(L26)のマーカであるが、矢印の部位に一部みられるにすぎない。次にmacrophage(CD68)のマーカで染めてみると(図表11)、表層のA細胞に加えてsubliningにび慢性に染まっている。図表12は好中球(CD15)であるが、ほとんど滑膜組織内には認められない。後で、これらは関節液中にあることがわかった。別の所見として滑膜深部に「多核の大型の細胞」が多数認められた(図表13)。またStageの進んだところでは図表14のようにRAに最も特徴的な「mesenchymoid transformation」の像を認める。PCNAを染めていくと強陽性になってくる。

次はNo4の患者さんである。この症例は血液データでは炎症反応のみですべての自己抗体は陰性であった。この患者さんの滑膜においても、図表15のように滑膜表層のみに病変が局限していた。つまり病変の進展に局性があることがわかった。矢印の部分強拡大すると図表16のようにmatureな形質細胞が多数浸潤していることが

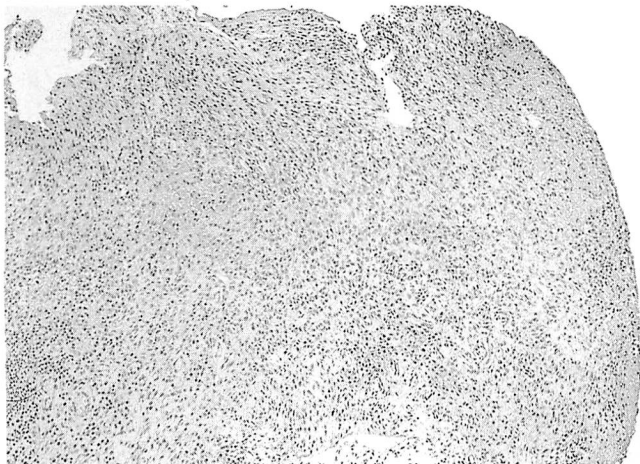
図表13 滑膜深部の多核巨細胞 (H&E)



図表16 図表15の強拡大



図表14 Mesenchymoid transformation (H&E)



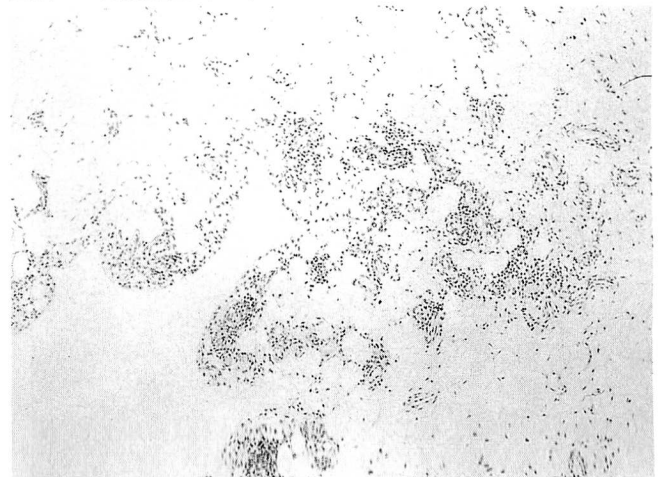
図表17 免疫染色 (CD 3)



図表15 滑膜組織 (症例 No. 4、H&E)



図表18 免疫染色 (L26)



わかった. あとで述べるが同部位にB細胞は認められていない. 図表17は同じセクションでT細胞 (CD3) を染めたものだがやはり、び慢性に浸潤していることがわかる. 図表18は同じ部位のBリンパ球である. 驚いたことに、先ほど形質細胞が多かったところでもその前

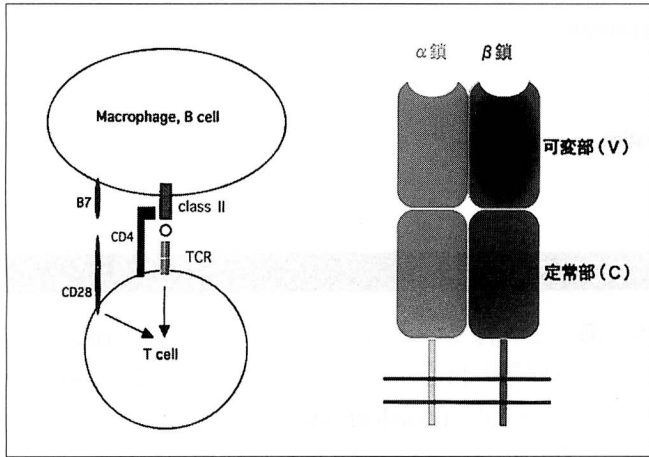
段階のB細胞はほとんどいないことがわかった. つまりリンパ濾胞もBリンパ球も介さずに plasma cellが多数浸潤していることがわかった. 今回の病理の解析でも興味深かったことである.

以上、今回の評価をまとめると (図表19)、発症後1

結論 1

- 1) 発症後1ヶ月目であっても、病理組織学的にはすでにRAに特異的な病像を呈する。ただし、リンパ濾胞やフィブリノイド壊死は認めない。
- 2) 病変は滑膜表層に限局する。
- 3) その滑膜表層領域には主としてT細胞及び形質細胞、マクロファージが集積する。
- 4) 初期に血管新生はすでに顕著である。
- 5) 多核巨細胞は初期から滑膜下軟部組織内に優位に存在する。
- 6) 早期RAの関節液中には、多数の顆粒球が認められるが、滑膜組織内にはこれらはほとんど存在しない。

図表20 T cell receptor モデル



ヵ月目であっても、病理組織学的にはすでにRAに特異的な病像を呈していた。ただし、リンパ濾胞やフィブリノイド壊死は認めない。また、病変は滑膜表層に限局しており、その滑膜表層領域には主として、T細胞および形質細胞、マクロファージが集積していた。初期に血管新生はすでに著明で、また、多核巨細胞は初期から滑膜下軟部組織内に優位に存在していた。早期RAの関節液中には、多数の顆粒球が認められるが、滑膜組織内にはこれらはほとんど存在しなかった。

続いて、滑膜局所におけるTCR-Vβレパトアと各種炎症関連蛋白の解析(RT-PCR法による)を行った。

まず図表20はT cell receptorをモデルにしたものであるが、左図のように抗原提示細胞のclass II分子上に表出された、抗原ペプチドをT細胞上のTCRで認識し、T細胞が活性化される。右図はTCRの構造であるが、図のようにα鎖、β鎖からなる4量体で、β鎖のVariable lesionを調べることでT細胞クロナリティーの1つの指標になる。平たく言うと、関節局所に集積しているT細胞にクロナリティーがあるか、ひいては共通の

図表21 TCR-Vβレパトアの定性結果(RT-PCR法)

	Case 1 not determined	Case 2 HLA-A2, A24, B46, B48 CW1, CW3 DR14, DR8	Case 3 HLA-A2, A33 B44, B62 CW3 DR13, DR9
1	+	+	+
2	-	-	-
3	+	+	-
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	-	-	-
8	+	-	-
9	+	+	+
10	-	-	-
11	-	-	-
12	+	+	-
13	-	+	-
14	-	+	+
15	-	-	-
16	-	-	-
17	+	+	-
18	+	+	-
19	+	-	-
20	-	-	-
21	+	+	+
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-

図表22 各種炎症関連蛋白の定性結果(RT-PCR法)

	Case 1(65/F)	Case 2(35/M)	Case 3(27/F)
IL-1 beta	+	+	+
IL-6	+	+	+
TNF-alpha	+	+	+
FKN	+	+	+
MCP-1	+	+	+
RANTES	+	+	+
IL-8	+	+	negative
E-selectin	+	+	+
ICAM-1	+	+	+
VCAM-1	+	+	+

抗原を認識しているかという目安になる。そこで、表出抗原を認識するVβのクロナリティーを調べてみた。

TCR-Vβレパトアの定性結果を図表21に示す。Vβ24までであるなかで1・3・4・5・6・8・9・12・17・18・21のVβが同定された。

図表23 結論 2

結論 2

1. 早期より滑膜組織に集積しているT細胞はポリクローナルなTCR-Vβレパトアを示していた。
2. RAのChronic Phaseで関節局所に見出される代表的な炎症関連蛋白は、発症1ヶ月の時点においても、滑膜組織に強く発現している。

図表24 考察

考察

“Is one year early, or too late?”	Kontinen YT, 1997, Arthritis Rheum
“Is one month too late?”	Kamogawa J et al. in preparation

図表22はRT-PCR法による各種炎症関連蛋白の定性結果である。RAの病態上、重要と思われるもののみ示している。対象3症例においてこれら蛋白はすべて陽性であった。

以上より、早期より滑膜組織に集積しているT細胞は、ポリクローナルなTCR-Vβレパトアを示していた。またRAのChronic Phaseで関節局所に見出される代表的な炎症関連蛋白は、発症1ヶ月の時点においても、滑膜組織に強く発現していることが判明した(図表23)。

1997年にKontinenが「発症後1年のRAは早期か? 遅過ぎるか?」というコメントをしている。しかしながら、1ヶ月の時点における症候学的な早期RAは、RAの病態においてはすでに早期でない可能性が示唆された(今回対象は3症例ではあるが)。こういった意味からも、RAの早期診断と、早期からの強力な治療が重要であると考えられる(図表24)。

DISCUSSION

内海 1ヵ月という時点に着目し、組織に着眼したのは問題の核心に迫ったものだと思います。mesenchymoid transformationはOAなどにまったくみられないというわけではないですね。

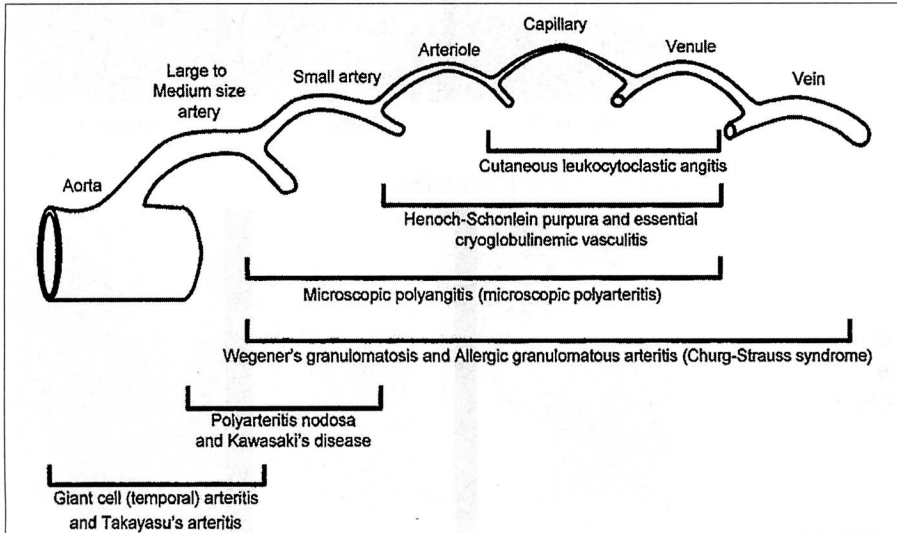
鴨川 RAに特異的です。

内海 ではそれが説得力ある所見ですね。B細胞を染めたら少数であったとうのは重要な意味合いがあったのでは(数の問題ではなく)…。plasma cellはどこからきているとお考えですか。浸潤がそこだけにおきているのか、ほかにも、例えば感染などで炎症があればそこにも浸潤していたかなどが大事だと思います。

能勢 あれだけのplasma cellの浸潤があるというのは、すでにプライムされたB細胞がPCVを通過して局所に入ったとたんにplasma cellに分化していくのではという見解にいたりました。

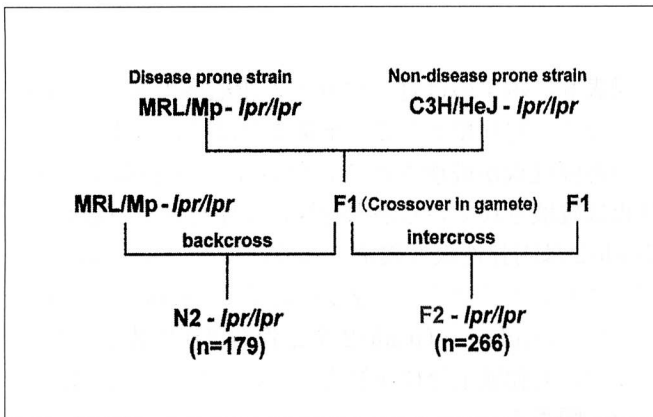
血管炎のキャリバー特異的感受性遺伝子座の解析

〔愛媛大学医学部第二病理¹・第三内科²〕 山田 明弘^{1,2}・宮崎 龍彦¹・路 靈敏¹・曲 衛敏¹・寺田 美穂¹
恩地 森一²・能勢 真人¹

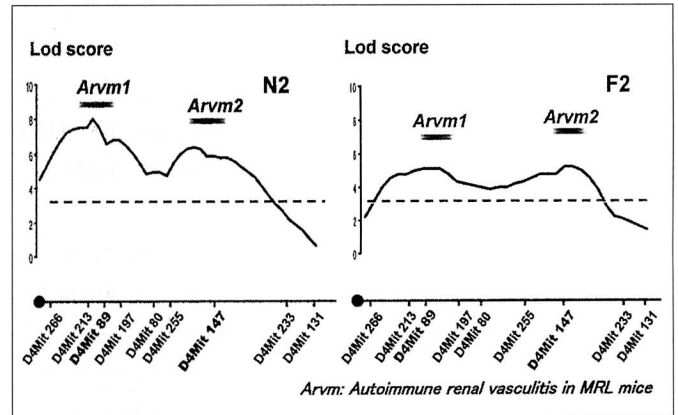


図表1 血管のキャリバーに基づく血管炎の分類

図表2 Genome wide screening using intercrosses and/or backcross



図表3 Lod score in QTL analysis of Vasculitis in the Kidneys (n=266)



MRL/lpr マウスは膠原病疾患モデルとしてよく知られている。この MRL/lpr マウスにおいて臓器または血管径つまりキャリバー特異的な血管炎感受性遺伝子座について発表する。

現在、系統的血管炎の疾患カテゴリーは、血管のキャリバーによる分類に基盤が置かれている。しかし、実際には個々のカテゴリーには臨床症状、病理所見ともに種々のバリエーションを示す症例もしばしば認められ、炎症が特定の太さの血管に限局せず、キャリバーによるカテゴリーを超えて複数の疾患基準を包含することもあ

る。そこで血管炎症候群を含む膠原病疾患モデルとしてよく知られている MRL/lpr マウスを用いて、臓器またはキャリバー特異的な血管炎感受性遺伝子座を検索した(図表1)。

まず、血管炎を発症するモデル MRL/lpr マウスと血管炎を発症しない系である C3H/lpr マウスと交配させ、戻し交配 N2 世代179匹と兄妹交配 F2 世代266匹を対象にゲノムワイドスクリーニングを行った(図表2)。

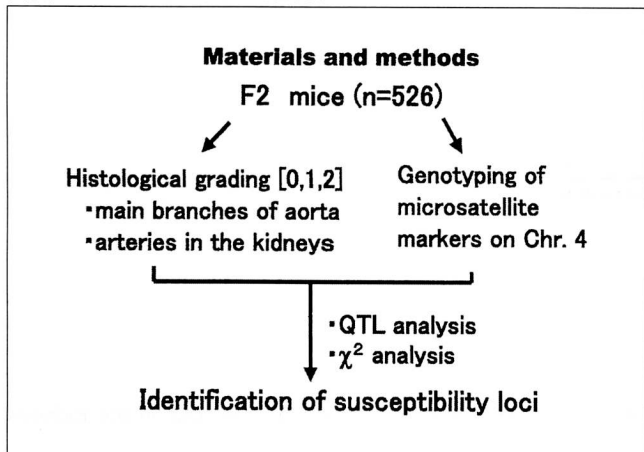
戻し交配 N2 世代と兄妹交配 F2 世代のどちらにおいても腎内血管炎ではマイクロサテライトマーカーが D4

図表4 目的

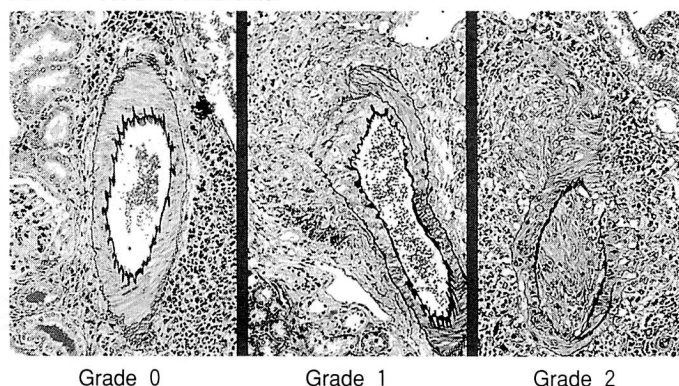
目的

腎血管炎の感受性遺伝子座のある第4染色体について、大動脈主分枝血管炎の感受性遺伝子座を検索し、腎内血管炎感受性遺伝子座との関連について解析する。

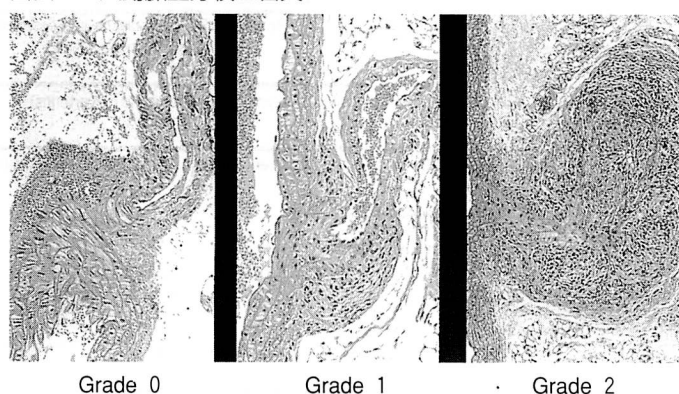
図表5 Materials and methods



図表6 腎内血管炎組織像



図表7 大動脈主分枝血管炎



Mit89、*D4Mit147* の近傍で劣性感受性遺伝子座を認め、それぞれ *Autoimmune renal vasculitis in MRL mice1*、つまり「*Arvm1*」、「*Arvm2*」と定義した(図表3)。

〔目的〕

血管炎のキャリアーないし臓器特異性の遺伝要因を明らかにするために、腎血管炎の感受性遺伝子座 *Arvm1*、*Arvm2* のある第4番染色体について検索することである。そして、大動脈主分枝血管炎の感受性遺伝子座と、腎内血管炎感受性遺伝子座との関連について解析することである(図表4)。

〔材料と方法〕

血管炎発症マウスの MRL/lpr とそうでない C3H/lpr の F1 マウスを兄妹交配させた F2 マウス526個体を4ないし5ヵ月齢で屠殺して組織標本を作製し、後で述べる基準で、大動脈主分枝と腎血管の動脈について血管炎を組織学的にスコア化した。また、tail DNA を用いて第4染色体のマイクロサテライトマーカーのタイピングを行い、血管炎スコアとの連鎖解析を行った。以上の結果を量的形質の解析である QTL 解析と χ^2 検定を用いて解析した(図表5)。

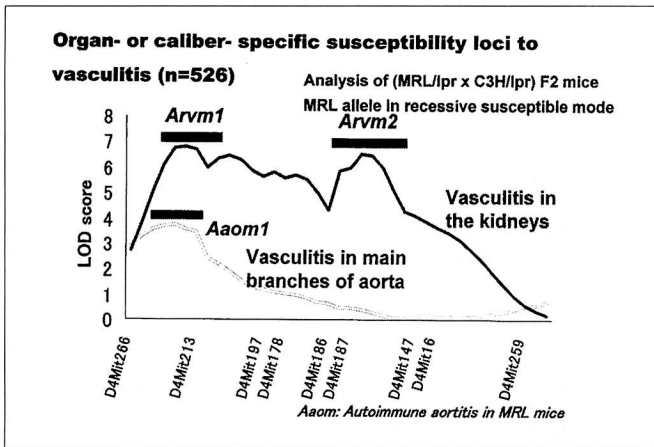
図表6に示すのは腎内血管炎の組織像である。Grade 0は組織学的分類として、正常またはリンパ球浸潤があるが外弾性板が破壊されていないもの、Grade 1は外弾性板は破壊されているが内弾性板は保たれているもの、Grade 2は内弾性板も破壊されているものまたは内膜肥厚を認めたものとした。 χ^2 検定では Grade 0 を血管炎非発症、Grade 1・Grade 2 を血管炎発症個体とした。

また、大動脈主分枝血管炎についても同様に分類を行った(図表7)。

図表8は第4番染色体について QTL 解析した結果である。腎内血管炎は *Arvm1* と *Arvm2* の2ヵ所にそれぞれ LOD score 6.8 および 6.5 の significant linkage を、大動脈主分枝血管炎は 13-28cM に LOD score 3.7 の significant linkage を認めた。この遺伝子座を *Autoimmune aortitis in MRL mice1* つまり「*Aaom1*」と名付けた。ここで強調したいところは、*Arvm1* と *Aaom1* とは遺伝子座は共有しているが、*Arvm2* は腎内血管炎に固有であったということである。

Arvm1 の位置的候補遺伝子 *Pax5*・*Cd72* はそれぞれ、B細胞の分化、B細胞活性化抑制に関与し、*Arvm2*

図表8 QTL 解析



図表9 Candidate genes of Vasculitis on *Arvm1.2*

locus	candidate gene	cDNA polymorphism
Arvm1	<i>Pax5</i> (B-cell specific transcription factor)	(-)
	<i>Cd72</i> (B-cell differentiation antigen)	(+)
Arvm2	<i>Csf3r</i> (colony stimulating factor 3 receptor)	(-)
	<i>Lck</i> (lymphocyte protein- tyrosine kinase)	(-)

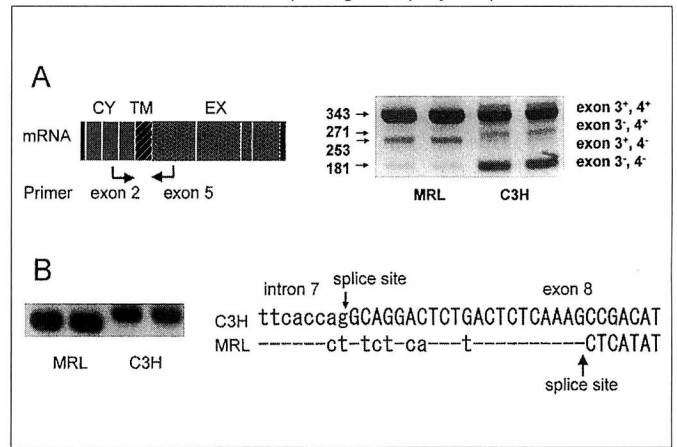
の位置的候補遺伝子 *Csf3r*、*LCK* はそれぞれ GCSF 受容体と、抗原刺激による T 細胞分化に参与している。そこでこれらの cDNA を解析したところ *Cd72* のみに遺伝子多型を認めた (図表9)。

Cd72 のメッセンジャー mRNA の解析では exon 2 と exon 5 の間に選択的スプライシングを認め、その variant の発現頻度に MRL/lpr と C3H/lpr 間で差を認めた。つまり、MRL 系では表現型 *Cd72^c* であり、C3H 系では *Cd72^b* であった。また、ゲノムレベルの解析で position966から986の間で21塩基対の欠失を認めた (図表10)。

結語

腎内血管炎感受性遺伝子座の1つである *Arvm1* は大動脈主分枝血管炎感受性遺伝子座の *Aaom1* と遺伝子座を共有していたが、*Arvm2* は腎内血管炎固有の遺伝子座であった。

図表10 *Cd72* alternative splicing and polymorphism



図表11 結語

1. 腎内血管炎感受性遺伝子座の一つである *Arvm1* は大動脈主分枝血管炎感受性遺伝子座の *Aaom1* と遺伝子座を共有していたが、*Arvm2* は腎内血管炎固有の遺伝子座であった。
2. 血管炎の臓器またはキャリアー特異性は異なる血管炎感受性遺伝子の組み合わせにより規定されていることが示唆された。

血管炎の臓器またはキャリアー特異性は異なる血管炎感受性遺伝子の組み合わせにより規定されていることが示唆された (図表11)。

DISCUSSION

内海 病変の原因を血管にあるとするのか血管以外のファクターにリンクしているとするのか。先生の研究の着想は。

山田 どうして臓器特異的に (その部位を狙って) 発症するかです。

内海 少し飛躍的かな、との印象を受けたので…

山田 確かに多少そういう面もあるかもしれませんが。遺伝子のうえでのアプローチの仕方であり、捜してきた分子がそれであるかどうかという点もあります。これからも検索しつつ長く続く研究だと思っています。

能勢 共同研究者として申し上げますと、ゲノムから

攻めるとそこに「座」があるかないかということ
で、その座を攻めれば原因のプロセスが解明する
という考え方です。

今 井 従来、一般にはRAの血管炎の場合、侵される
血管のサイズにより分類してきました。今回の発
表では座が共有しているものがありました。とす
ると従来の分類の仕方では解決しないと思われま
すが…。

山 田 リウマチとの関連はまだ検討していません。多
分、発症の機序は1つではないと思います。今回
のマウスではこういう結果でしたが、そのままヒ
トに当てはめて考えるのはまだまだ早計だと考え
ています。

能 勢 遺伝子のイントロの本当の役割についてまだよ
くわかっていないと思います。言ってみればまだ
闇の世界ですが、そのへんの部分に病因が潜んで

いるという予測のもとでの研究と思われませんが、
現状、その分野（遺伝子のイントロの解明）では
どの程度まで進んでいるのか教えてください。

能 勢 ご指摘の通り、まだほとんどわかっていないと
思います。ただイントロンにスニップとかあり、
それをリトロで様々に実験している系はありま
す。例えばトランスクリプションのスタビリティ
の問題では、イントロンに全然関係ないところに
スニップがあってもそのためにトランスクリプシ
ョンが起りにくいというようなことがわかって
きています。そこで、スニップから攻めている人
達はそこに病理発生の原因があるのではとする
ケースなどもあります。

今 井 ほかにご質問ありますか。ないようでしたら終
りにさせていただきます。ありがとうございます。