

リウマチ性自己免疫疾患における fetal microchimerism の検討

宮下 祐子

リウマチ性自己免疫疾患 (rheumatic autoimmune diseases : RAD) と慢性 graft-versus-host disease (GVHD) には、免疫学的所見、臨床症状において共通点が多く、古くからその病因の近似性が指摘されている。近年、妊娠中に移行した胎児由来細胞が出産後の母体に生着する現象が見出され (fetal microchimerism : fMC), この fMC による graft-versus-host 反応が自己免疫疾患の病因に関与する可能性が議論されている。

本研究では、Y染色体特有の配列である DYZ 1 の検出を、男児出産歴のある全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE), シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome : Sjs), および全身性強皮症 (systemic sclerosis : SSc) 患者に対して行い、RAD 患者における fMC の頻度を検討した。加えて fMC の遺伝的背景を検討するため、SSc 患者の HLA クラス II 遺伝子型を検索した。結果、男児出産歴を有する SSc 患者では、対照に較べ有意に高頻度に DYZ 1 配列が検出された。一方、Sjs 患者の DYZ 1 配列検出率は対照と有意差はなく、SLE 患者からは DYZ 1 配列は検出されなかった。SSc 患者の HLA クラス II 遺伝子型は DRB1 *0101, DQB1 *0501 が日本人全体の頻度と較べ、高頻度に検出されたが、DYZ 1 検出群及び非検出群との差異は認めなかった。臨床像との比較では、Barnett III 型症例や高度な内臓病変を伴う症例において DYZ 1 配列が検出される傾向が見られた。これらの結果から、fMC が RAD の中でも特に SSc に高頻度であり、その臨床像は GVHD と類似すると考えられた。

(平成13年4月4日受理)

Fetal Microchimerism in Rheumatic Autoimmune Diseases

Yuko MIYASHITA

Some clinical features of rheumatic autoimmune diseases (RAD), such as systemic sclerosis (SSc), Sjögren's syndrome (Sjs) and systemic lupus erythematosus (SLE) resemble chronic graft-versus-host disease (GVHD).

Recent studies have shown fetal DNA to be found in post-maternal peripheral blood. This observation has led to a hypothesis that persistent fetal cells in the maternal circulation (fetal microchimerism) could mediate a graft-versus-host reaction, resulting in autoimmune disease. In this study, we examined frequency of fetal microchimerism in Asian-Japanese female patients with RAD who have a son by detection of the Y-chromosome specific sequence (DZY 1) in peripheral blood cells. As a result, DZY 1 was detected in 10 of 20 SSc patients (50.0%), 6 of 18 Sjs

patients (33, 3%), and 8 of 41 healthy volunteers (19, 4%). No DZY 1 was detected in 21 SLE. In an analysis of HLA class II genotypes, DRB 1*0101 and DQB 1*0501 were more frequently detected in SSc patients than in unrelated Japanese. However there were no differences between the DYZ 1 positive and negative groups. In a comparison of clinical features, DYZ 1 was detected in patients with a severe internal complication such as primary biliary cirrhosis, Scleroderma kidney, and pulmonary hypertension.

These findings suggest that fetal microchimerism is a phenomenon strongly related to SSc but not in SLE or Sjs. Patients with fetal microchimerism showed the clinical features resembling those of GVHD. (Accepted on April 4, 2001) *Kawasaki Igakkaishi* 27 (2) : 111-121, 2001

Key Words ① **Fetal microchimerism** ② **Systemic Sclerosis**
③ **Systemic erythematosus** ④ **Sjögren's syndrome** ⑤ **GVHD**

はじめに

リウマチ性自己免疫疾患 (Rheumatic autoimmune diseases : RAD) は、自己トレランスの破綻により、多彩な自己抗体が同時に認められることを特徴とする。自己トレランス破綻の機序として、Fas / FasL 機能異常不全による中枢性クローン除去及び activation induced cell death の異常^{1)~3)}, CTLA-4, IL-2を介する anergy 誘導の異常^{4)~6)}, 隔絶抗原の遊離, cryptic epitope の発現, 外来抗原と自己抗原の分子相同性などによる非寛容性無反応 T 細胞の活性化^{7), 8)}, Superantigen の関与^{9), 10)} など、様々な事象が推察されてきた。しかし、これらの仮説は免疫学の立場から実験動物を中心に検討されてきており、必ずしも臨床的観察と合致しない。一方、骨髄移植や大量輸血後にみられる graft-versus-host disease (GVHD) は、ドナー由来の免疫担当細胞がレシピエントに生着した後、組織適合抗原を認識して活性化し、複雑な臨床症状を呈すると考えられている。特に移植後約100日以降に発症する慢性 GVHD では B 細胞の polyclonal activation に伴う多彩な自己抗体の出現やサイトカインの産生異常がみられ、臨床的には全身性強皮症 (systemic sclerosis : SSc), 全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE), シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome : Sjs), 多発性筋炎, 原発性胆汁性肝

硬変 (primary biliary cirrhosis : PBC) といった RAD に類似することが知られている^{11)~17)}。

臨床で遭遇するほとんどの RAD 患者には GVHD の原因となる輸血や移植歴がないため、RAD には GVHD とは別の未知なる発症機序が存在すると考えられてきた。しかし一方で1996年 Bianchi¹⁸⁾ は男児出産歴のある健康女性において、妊娠中に移行した胎児由来のアロ細胞が出産後母体に生着し、免疫担当細胞へ分化する事を見出した。これは医原性以外の現象としても GVHD のごとく生体へのアロ細胞の混入が起こり得る事を示している。現在ではこの胎児由来細胞が母体内から検出される現象を fetal microchimerism (fMC) と呼び、骨髄移植時の提供者細胞の混入と区別している。また Artlett¹⁹⁾ および Nelson²⁰⁾ は SSc と GVHD が臨床的に類似していること、SSc の発症年齢が45歳~55歳と出産後に集中していることに着目し、SSc における fMC の頻度を検討し、その結果男児出産歴のある SSc 女性患者の末梢血中では、Y 染色体を有する細胞の検出頻度及び細胞数が男児出産歴のある健常者女性に比べて有意に高いこと、検出された胎児由来細胞が T リンパ球であることを示した。また、Nelson²⁰⁾ は fMC を呈する遺伝的背景を検討し、母子間の HLA クラス II 遺伝子型が一致している症例で fMC を高頻度に認めたことを示した。その一方で PBC 患者においても、抗セントロメア抗体を有する PBC 患者では、Y 染

色体を有する細胞が高頻度に検出される事が示されている²¹⁾。しかし fMC を有する SSc の臨床的特徴や、SLE, Sjs などといった SSc, PBC 以外の GVHD 類似の臨床像を呈する自己免疫疾患との関連については検討がなされていない。また、SSc, PBC 患者と健常女性間の胎児由来細胞の検出率に有意差を認めないとする報告もなされており^{22), 23)}、fMC の病因性、病原性については未だ一定の見解は得られていない²⁴⁾。

本研究ではまず、fMC の RAD の各疾患における頻度を検討すべく、男児出産歴のある SLE, Sjs および SSc 患者について Y 染色体遺伝子 (Human Y-chromosome specific repetitive DNA family : DYZ 1)²⁵⁾ をマーカーとした fMC の検出を行った。また、SSc 患者については fMC 検出を行うと共に、その遺伝的背景を検討するため、HLA クラス II 遺伝子タイピングを行った。さらに、SSc が臨床的に多彩な病型を取ることをふまえ、fMC の有無による SSc の臨床像の違いを比較検討した。結果、fMC は SSc 患者で有意に高率に認められたが、Sjs 患者では有意差は認められず、SLE 患者では fMC は検出されなかった。また HLA クラス II 遺伝子タイピングでは、fMC の有無との相関はみられなかったが、臨床像の比較において広範な皮膚硬化を伴う症例で fMC の検出率が高い傾向にあり、更に PBC, 肺高血圧症、強皮症腎といった高度な内臓病変を合併した症例の全例で fMC が認められた。また血清学的にもこれらの内臓病変を反映する自己抗体をもつものに fMC が検出された。

対象と方法

1) 対象

川崎医科大学附属病院および千葉大学医学部附属病院にて観察中の男児出産歴のある女性患者、SSc 20名、SLE 21名、Sjs 18名の計59名を説明と同意のもと対象とした。診断は ARA もしくは厚生省特定疾患調査班の診断基準^{26)~28)}

Table 1. Patient's characteristics

	SSc	SLE	Sjs	Healthy controls
Patient Number	20	21	18	41
Age, y (Mean)	44-74 (56.1)	34-82 (50.2)	27-74 (54.8)	39-59 (53.2)
Duration of illness, y (Mean)	1-26 (10.2)	1-24 (11.9)	1-19 (8.7)	
DYZ1 positive (Percent)	10* (50.0)	0** (0)	6 (33.3)	8 (19.5)

* $p = 0.014$, SSc vs. Healthy volunteers
 ** $p = 0.028$, Healthy volunteers vs. SLE

に基づいて行った。平均年齢は SSc 56.1歳 (44~74歳)、SLE 50.2歳 (34~82歳)、Sjs 54.8歳 (27~74歳)、平均罹病期間は SSc 10.2年 (1~26年)、SLE 11.9年 (1~24年)、Sjs 8.7年 (1~19年)であった。また、対照は説明、同意のもと男児出産歴のある健常者女性41名から得た。健常者女性の平均年齢は53.2歳 (39~59歳)であった (Table 1)。患者群、対照群とも輸血および骨髄・臓器移植歴はなかった。

2) 末梢血ゲノム DNA の抽出

末梢血ゲノム DNA の抽出は、EDTA-2 Na を添加した末梢静脈血 5 ml から G NOME® Whole Blood DNA Isolation Kit (BIO 101, USA) を使用し、そのプロトコールに従って行った。

3) 2段階 PCR 法

DYZ 1 の検出は Artlett ら¹⁹⁾、Patri ら²⁹⁾の方法に準じて行った。DYZ 1 検出用特異プライマーとして、一次 PCR : 5'-TCCACTTTATTC CAGGCCTGTCC-3', 5'-TTGAATGGAATGGG AACGAATGG-3', 二次 PCR : 5'-CAGGCCTG TCCATTACACTACA-3', 5'-GAATGGGAACG AATGGAGTGAA -3' を作成した (amersham pharmacia biotech 社)。増幅範囲は一次 PCR 154 bp, 二次 PCR 135 bp である。一次 PCR 反応は末梢血より抽出したゲノム DNA 0.1 μ g を試料とし、変性反応 : 94°C, 30秒間, アニーリング反応 : 60°C, 60秒間, ポリメライゼーション反応 : 72°C, 30秒間として、20サイクル行った。二次 PCR 反応は、一次 PCR 反応産物 1 μ l を試料とし、変性反応 : 94°C, 30秒間, アニーリング反応 : 54°C, 60秒間, ポリメライゼーション反応 : 72°C, 30秒間として、40サイクル行った。PCR 産物は、2%アガロースゲルにて展開し、

Ethidium bromide を用いて染色, 撮影した. さらにこのPCR産物の塩基配列を direct sequencing により確認した.

4) HLA クラス II 遺伝子タイピング

SSc 患者20例のうち19例の HLA クラス II 遺伝子型を検討した. HLA クラス II 遺伝子タイピングは PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法^{30), 31)} により DRB 1 及び DQB 1 を, PCR-amplification with sequence-specific primers (SSP) 法により DQA 1 を決定した (塩野義製薬). 今回の検討では家系調査を行っておらず, 実際のハプロタイプが不明であるため, フェノタイプの統計的有意性を検討した.

5) 臨床像の比較

SSc 患者20名について Barnett 分類, 皮膚所見, 内臓病変, 自己抗体の有無における DYZ 1 配列の検出率を検討した.

6) 統計

SSc, SLE, Sjs, 健常者女性の各群における DYZ 1 配列の有無, 及び DYZ 1 配列検出群, 非検出群間の HLA クラス II 遺伝子, 臨床像の有無による DYZ 1 配列の検出率について比較検討した. それぞれ有意差検定には χ^2 検定を用い, 症例数の少ないものは Fisher の直接確率計算法を用いた. 有意水準は $\alpha = 0.05$ とした.

結 果

1) DYZ 1 配列の検出

対照群から得た末梢血抽出ゲノム41検体中のうち8検体(19.5%)に DYZ 1 配列が検出された. 患者群では SSc 20検体中10検体 (50.0%) に DYZ 1 配列が検出され, 対照群と較べて有意に高頻度 ($p = 0.017$) であったが Sjs 18検体では6検体 (33.3%) に DYZ 1 配列が検出され, 対照群と統計学的に有意差を認めなかった. 一方, SLE 21例の末梢血抽出ゲノム DNA 中か

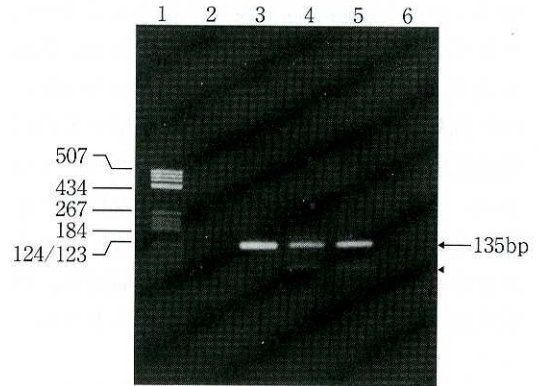


Fig. 1. PCR analysis of DYZ 1 in DNA extracted from peripheral blood in women with systemic sclerosis.

Lane 1 shows the DNA molecular weight marker V (Boehringer Mannheim); lane 2 is blank (contains no DNA); lane 3 shows DNA from a normal man; lane 4-6 shows DNA from patients. Lane 3, 4, and 5 show a band corresponding to the 135-bp product amplified from Y-chromosome DNA, as indicated by the arrow. Allow head indicated the primer dimer.

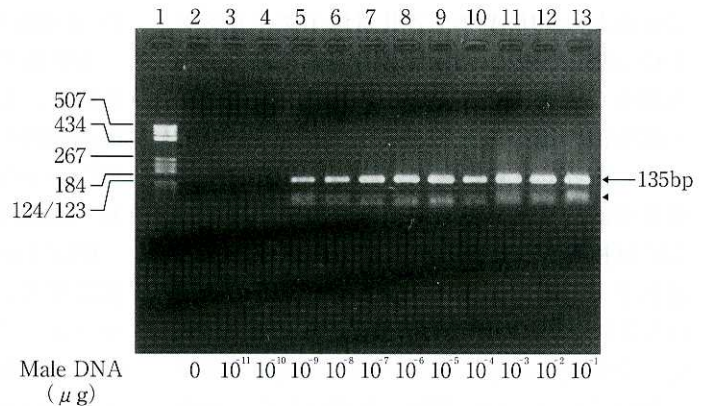


Fig. 2. PCR analysis of DYZ 1 in DNA extracted from peripheral blood in healthy woman and man.

Lane 1 shows the DNA molecular weight marker V (Boehringer Mannheim); lane 2 is blank (contains no DNA); lane 3-13 shows DNA from a normal man, which is serially diluted with DNA from a normal woman. Allow head indicated the primer dimer.

らは, DYZ 1 配列は1例も検出されず, 対照群に較べて有意に低頻度 ($p = 0.028$) であった (Fig. 1, Table 1).

出産歴のない女性から得た末梢血抽出ゲノム DNA に男性 DNA を混合, 希釈して検定したところ, この方法による DZY 1 の検出感度は 10^{-9} であった (Fig. 2).

2) HLA クラス II 遺伝子タイピング (Table 2

Table 2. Relative Frequencies of HLA-DRB1 alleles in Patients with SSc

Locus,	Patient with SSc			Unrelated Japanese Individuals (n=916) ^{#1}
	DYZ1		Total (n=19)	
DRB1	Positive (n=10)	Negative (n=9)		
*0101	10 (2) ^{#2}	16.7 (3)	13.2 (5)	4.8 ^{#3}
*1501	10 (2)	11.1 (2)	10.5 (4)	6.1
*1502	20 (4)	11.1 (2)	15.8 (6)	8.7
*0403	5 (1)	5.6 (1)	5.3 (2)	3.0
*0405	15 (3)	11.1 (2)	13.2 (5)	15.5
*0407	5 (1)	0 (0)	2.6 (1)	0.4
*1101	5 (1)	0 (0)	2.6 (1)	2.9
*1202	5 (1)	0 (0)	2.6 (1)	2.7
*1302	0 (0)	5.6 (1)	2.6 (1)	5.3
*1403	0 (0)	11.1 (2)	5.3 (2)	1.6
*0803	10 (2)	11.1 (2)	10.5 (4)	7.5
*0901	15 (3)	16.7 (3)	15.8 (6)	12.4

#1 adapted from ref. 28

#2 %, (number)

#3 p=0.015 Total vs. Unrelated Japanese Individuals

Table 3. Relative Frequencies of HLA-DQA 1 alleles in Patients with SSc

Locus,	Patient with SSc			Unrelated Japanese Individuals (n=916) ^{#1}
	DYZ1		Total (n=19)	
DQA1*	Positive (n=10)	Negative (n=9)		
0101	10 (2) ^{#2}	16.7 (3)	13.2 (5)	12.3
0102	10 (2)	16.7 (3)	13.2 (5)	12.1
0103	30 (6)	22.2 (4)	26.3 (10)	16.7
03 ^{#3}	40 (8)	33.3 (6)	36.8 (14)	42.3
05 ^{#4}	5 (1)	11.1 (2)	7.9 (3)	8.7
0601	5 (1)	0 (0)	2.6 (1)	3.1

#1 adapted from ref. 28

#2 %, (number)

#3 including DQA 1*03011.0302 and 0303 in the patient with SSc

#4 including DQA 1*0503 and 0505 in the patient with SSc

~4)

SSc19例全体では HLA DRB 1*0101 (13.2%), DQB 1*0501(13.2%) が本邦における検出頻度⁽³²⁾(HLA DRB 1*0101 4.8%, DQB 1*5.4%)に較べ、有意に高頻度に検出されたが DYZ1検出群、非検出群間には有意差は認められなかった。

3) 臨床像の比較

SSc 患者20例の Barnett 分類による内訳は

Type I 7例, Type II 8例, Type III 5例であった。それぞれの DYZ1 配列の検出率は、Type I 42.9% (3例), Type II 37.5% (3例) Type III 80% (4例) と Type III で最も高く検出された (Table 5)。

個々の臨床症状の有無による DYZ1 配列の検出率では有意差は認められなかったが (Table 6), 内臓病変のうち PBC, 肺高血圧症, 強皮症腎のいずれかを合併した 5例では全例に

Table 4. Relative Frequencies of HLA-DQB1 alleles in Patients with SSc

Locus,	Patient with SSc			Unrelated Japanese Individuals (n=916) ^{#1}
	Positive (n=10)	Negative (n=9)	Total (n=19)	
DQB1 *0501	10 (2) ^{#2}	16.7 (3)	13.2 (5)	5.4 ^{#3}
*0601	30 (6)	22.2 (4)	26.3 (10)	16.1
*0602	10 (2)	11.1 (2)	10.5 (4)	6.0
*0604	0 (0)	5.6 (1)	2.6 (1)	5.0
*0301	5 (1)	11.1 (2)	7.9 (3)	13.1
*0302	10 (2)	5.6 (1)	7.9 (3)	11.8
*0303	15 (3)	16.7 (3)	15.8 (6)	11.2
*0401	20 (4)	11.1 (2)	15.8 (6)	15.1

#1 adapted from ref.28

#2 %, (number)

#3 p=0.037 Total vs. Unrelated Japanese Individuals

Table 5. Detection of DYZ1 by the clinical features in SSc patients (1)

Barnett's type,	Total (n=20)	Detection of DYZ1 %, (n)
I	7	42.9 (3)
II	8	37.5 (3)
III	5	80.0 (4)

DYZ1配列が検出され、上記内臓病変のいずれも持たない患者15例のDYZ1検出率(26.7%; 4例)に較べ有意に高頻度であった(p=0.0081)。

自己抗体の検討では、抗RNP抗体陽性患者で抗体陰性患者に較べて、高頻度にDYZ1配列が検出された(p=0.043)。また有意差は認めなかったが、抗平滑筋抗体、抗ミトコンドリア抗体を持つ患者全例にDYZ1配列が検出された。抗セントロメア抗体陽性患者でのDYZ1配列の検出率は抗体陰性患者に較べ有意に低頻度であった(p=0.034)。抗セントロメア抗体が検出された3例は全例PBCを合併していた(Table 7)。

考 察

本研究では、SSc, SLE, Sjs患者を対象に胎児由来細胞の検出を行い、その検出頻度を比較検討した。更にSSc患者について、fMCの有

無による臨床像及びHLAクラスII遺伝子型を比較した。結果、胎児由来細胞は対照群と比較し、SSc患者にのみ高頻度に認められ、Sjs患者では有意差を認めなかった。更に、今回検討を試みたSLE患者から胎児由来細胞は検出されなかった。SSc患者の臨床像と胎児由来細胞の検出率との対比では、皮膚硬化が広範なもの、高度な内臓病変を伴うものでより高頻度に認められた。またHLAクラスII遺伝子型による胎児由来細胞の検出率には相関を認めなかった。

骨髄移植後慢性GVHDは移植後100日目の患者の約25~45%に出現するとされ³³⁾、先に述べたように自己免疫疾患様の病態を呈することが知られている。その標的臓器は全身に及ぶが、なかでも皮膚病変は慢性GVHD患者の80%と最も高率に認められ³⁴⁾、その臨床像は初期の扁平苔癬様皮疹から1年前後で関節拘縮を伴う四肢・体幹の皮膚硬化へと移行する^{35), 36)}。また内臓病変は、肺線維症・PBC・逆流性食道炎・腸管病変といった線維性変化や、唾液腺炎、筋炎などが認められ、更に血清学的には免疫グロブリンの増加やCoombsテスト陽性、抗核抗体・抗ミトコンドリア抗体・抗Topoisomerase I抗体・抗平滑筋抗体・抗マイクロゾーム抗体などの自己抗体の出現といった種々の免疫異常所見が認められる^{11), 14), 16), 35)~38)}。これら慢性GVHD患者の臨床像は、全身広範囲に皮膚硬化を認める点、肺線維症・食道病変・PBCと

Table 6. Detection of DYZ 1 by the clinical features in SSc patients (2)

Clinical features, (n=20)	Detection of DYZ1, %, (n)
Oral and/or ocular sicca	
+ (n=6)	66.7 (4)
- (n=14)	42.9 (6)
Proximal scleroderma	
+ (n=11)	63.6 (7)
- (n=9)	33.3 (3)
Sclerodactily	
+ (n=18)	50.0 (9)
- (n=2)	50.0 (1)
Cutaneous ulcer	
+ (n=4)	75.0 (3)
- (n=16)	43.8 (7)
Pitting scar	
+ (n=6)	50.0 (3)
- (n=14)	50.0 (7)
Lung fibrosis	
+ (n=12)	58.3 (7)
- (n=8)	37.5 (3)
Esophageal hypomotility	
+ (n=5)	80.0 (4)
- (n=15)	40.0 (6)
Primary biliary cirrhosis	
+ (n=3)	100 (3)
- (n=17)	41.2 (7)
Pulmonary hypertension	
+ (n=2)	100 (2)
- (n=18)	44.4 (8)
Scleroderma kidney	
+ (n=1)	100 (1)
- (n=19)	47.4 (9)

いった内臓諸臓器の線維性変化を合併する点で SSc との間の類似性が強く指摘されている¹⁷⁾。一方、Sjs に特徴的である眼および口腔内の乾燥症状も慢性 GVHD 患者の 65~85% に認められるが、ほとんどの症例が皮膚病変を合併しており、乾燥症状が単独で出現することは少ない^{17), 33)}。更に SLE との関連については、GVHD マウスモデルで糸球体腎炎や自己抗体が出現するなど SLE 様病態を呈する事が多々示されているが^{15), 39), 40)}、実際の骨髄移植後慢性 GVHD 症例においては、血清中の抗 DNA 抗体のみを認めた症例、関節痛と漿膜炎を呈した症例など、いわゆる SLE で見られる臨床像の一部が認められるのみであり、またその報告も SSc に較べ少ない^{35), 41)}。本研究で示した RAD 各疾患における胎児由来細胞の検出頻度は SSc 患者で特異的に高頻度であった。これ

は骨髄移植後の慢性 GVHD 患者で最も高頻度に認められる RAD 様病態が SSc に類似していることと一致していた。

また、SSc 患者の各臨床像における胎児由来細胞の検出頻度は、Barnett III 型症例の 80% に胎児由来細胞が検出され、更に PBC・肺高血圧症・強皮症腎といった高度な内臓病変を合併する症例、これらの内臓病変と関連の深い抗 RNP 抗体・抗ミトコンドリア抗体・抗平滑筋抗体を持つ症例のすべてに胎児由来細胞が認められる結果となった。これらの所見は皮膚および内臓の広範な線維化を意味し、fMC を持つ SSc 患者がより慢性 GVHD に近い病態を示すことをあらわしていた。以上の結果は SSc の病因として生着した胎児由来細胞が母体内で GVH 反応を起こしているとするこれまでの仮説を支持するものと思われる。

これに対し Sjs 患者では健常者女性との間に胎児由来細胞の検出頻度に有意差を認めなかった。このことは慢性 GVHD 患者で Sjs 様病態を単独で呈する頻度が少ない事に一致する。

一方、健常者女性の約 20% に胎児由来細胞が検出されたにも関わらず SLE 患者では胎児由来細胞が一例も検出されなかった。現在のところ、この結果の意義は不明であるが、SLE が妊娠・出産に伴って増悪もしくは発症すること^{42), 43)}、病初期や活動期にはしばしばリンパ球減少が認められること^{44), 45)}などを踏まえると、SLE 患者では妊娠時に流入した胎児由来細胞が生着しにくい、もしくは除去されやすい状態にあるのかもしれない。

fMC を生じる遺伝的背景について、本研究では fMC を生じやすい HLA フェノタイプを検討するため、SSc 患者の HLA クラス II 遺伝子の検索を行い、胎児由来細胞の有無によりその遺伝子型を比較した。しかし fMC と HLA クラス II 遺伝子型の間には有意差は認められず、fMC に関与する HLA フェノタイプを特定し得なかった。これまで fMC を生じる遺伝的背景については前述の通り SSc 患者と出生男児間の HLA クラス II 遺伝子の検討がなされ、その

Table 7. Detection of DYZ 1 by the autoantibodies in SSc patients

Autoantibodies	Detection of DYZ1, %, (n)
ANF	
+ (n=18)	55.6 (10)
- (n=2)	0 (0)
Topoisomerase I	
+ (n=5)	80.0 (4)
- (n=15)	40.0 (6)
Centromere #1	
+ (n=11)	27.3 (3)
- (n=9)	77.8 (7)
RNP#2	
+ (n=4)	100 (4)
- (n=16)	47.5 (6)
SS-A(Ro)	
+ (n=5)	40.0 (2)
- (n=15)	53.3 (8)
SS-B(La)	
+ (n=0)	0 (0)
- (n=0)	0 (0)
RA	
+ (n=4)	75.0 (3)
- (n=16)	56.2 (7)
ssDNA	
+ (n=3)	66.7 (2)
- (n=17)	47.1 (8)
Mitochondria	
+ (n=2)	100 (2)
- (n=18)	44.4 (8)
Smooth Muscle	
+ (n=1)	100 (1)
- (n=19)	47.4 (9)

#1. $p = 0.034$ anti centromere antibody positive vs. negative

#2. $p = 0.043$ anti RNP antibody positive vs. negative

結果 HLA-DRB 1, DQA 1 が母子間で一致する症例²⁰⁾, 特に母子共に DQA 1*0501を呈する症例⁴⁶⁾で fMC が高頻度に出現する事が示されている。本研究では出生男児の HLA クラス II 遺伝子の検索は行っていないが、これらの事実をあわせると、胎児由来細胞の生着には患者自身の遺伝子型ではなく、母子間の組織適合性が重要である事が考えられる。

本研究では、男児出産歴のある RAD 患者末梢血から Y 染色体マーカーを用いて胎児由来細胞の検出を行い、fMC が RAD の中でも SSc に特異的に高頻度との結果を得た。また、臨床的に広範囲な皮膚・内臓病変をもつ症例において fMC の検出率が高いことを示した。臨床的に骨髄移植後慢性 GVHD では強皮症腎や Raynaud 症状などが認められず、標的臓器の組織学的所見にも SSc と異なる点があること^{47)~49)}, 骨髄移植後に体内を循環するドナー由来細胞に比べ、SSc 患者における胎児由来細胞は母体末梢リンパ球 5×10^5 個中に1個とごく少数であること、アロ細胞の流入から発症までの期間が慢性 GVHD では約100日であるのに対し、SSc では妊娠・出産から20年前後と長期にわたることなど両者の病態は必ずしも一致しておらず fMC による GVH 反応が SSc の病因であると結論するためには更なる検討が必要である。しかしながら本研究の結果は、fMC を持つ SSc 患者がより慢性 GVHD に近い病態を呈することを示しており、fMC による GVH 反応が SSc 発症の病因となる可能性を支持するものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜った川崎医科大学皮膚科学教室 植木宏明教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に直接ご指導いただきました同皮膚科学教室 小野雅史講師に感謝いたします。また研究にご協力いただきました、千葉大学医学部第二内科 倉沢和宏先生に心から御礼申し上げます。なお本論文の要旨の一部は The Society for Investigative Dermatology 61st Annual Meeting (2000年5月10~14日 Chicago) において発表した。

文 献

- 1) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S: Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediated apoptosis. *Nature* 356: 314-317, 1992
- 2) Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S: Generalized lymphoproliferative

- disease in mice, caused by point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76 : 969–976, 1994
- 3) Russell JH, Rush B, Weaver C, Wang R : Mature T Cells of autoimmune lpr / lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 : 4409–4413, 1993
 - 4) Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH : Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3 : 541–547, 1995
 - 5) Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW : Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 270 : 985–988, 1995
 - 6) Sadlack B, Lohler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, Noelle RJ, Horak I : Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD⁴⁺ T cells. *Eur J Immunol* 25 : 3053–3039, 1995
 - 7) Mamula MJ, Fatenejad S, Craft J : B cells process and present lupus autoantigens that initiate autoimmune T cell responses. *J Immunol* 152 : 1453–1461, 1994
 - 8) Fujinami RS, Oldstone MB : Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus : mechanism for autoimmunity. *Science* 23 : 1043–1045, 1985
 - 9) Friedman SM, Posnett DN, Tumang JR, Cole BC, Crow MK : A potential role for microbial superantigens in the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 34 : 468–480, 1991
 - 10) Wucherpfennig KW, Ota K, Endo N, Seidman JG, Rosenzweig A, Weiner HL, Hafler DA : Shared human T cell receptor V beta usage to immunodominant regions of myelin basic protein. *Science* 248 : 1016–1019, 1990
 - 11) Rouquette-Gally AM, Boyeldieu D, Prost AC, Gluckman E : Autoimmunity after allogeneic bone marrow transplantation : a study of 53 long-term-surviving patients. *Transplantation* 46 : 238–240, 1988
 - 12) Anderson BA, Young PV, Kean WF, Ludwin SK, Galbraith PR, Anastassiades TP : Polymyositis in chronic graft vs. host disease. *Arch Neurol* 39 : 188–190, 1982
 - 13) Tanei R, Yamamoto T, Yokono H, Motoori T : Scaling lichenoid eruptions and Sjogren-like syndrome : manifestations of nonfatal postoperative transfusion-associated graft-versus-host disease? *J Dermatol* 24 : 514–521, 1997
 - 14) Epstein O, Thomas HC, Sherlock S : Primary biliary cirrhosis is a dry gland syndrome with features of chronic graft-versus-host disease. *Lancet* : 1166–1168, 1980
 - 15) Gleichmann E, Van Elven EH, Van der Veen JPW : A systemic lupus erythematosus (SLE) - like disease in mice induced by abnormal T-B cell cooperation. Preferential formation of autoantibodies characteristic of SLE. *Eur J Immunol* 12 : 152–159, 1982
 - 16) Furst DE, Clements PJ, Graze P, Gale R, Roberts N : A syndrome resembling progressive systemic sclerosis after bone marrow transplantation. A model for scleroderma? *Arthritis Rheum* 22 : 904–910, 1979
 - 17) Bell SA, Faust H, Mittermuller J, Kolb HJ, Meurer M : Specificity of antinuclear antibodies in scleroderma-like chronic graft-versus-host disease : clinical correlation and histocompatibility locus antigen association. *Br J Dermatol* 134 : 848–854, 1996
 - 18) Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, Demaria MA : Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years post-partum. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 705–708, 1996
 - 19) Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA : Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Eng J Med* 338 : 1186–1191, 1998
 - 20) Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, Bean MA, Ober C, Bianchi DW : Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 351 : 559–562, 1998
 - 21) Invernizzi P, De Andreis C, Sirchia SM, Battezzati PM, Zuin M, Rossella F, Perego F, Bignotto M, Simoni G, Podda M : Blood fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 122 : 418–422, 2000
 - 22) Murata H, Nakauchi H, Sumida T : Microchimerism in Japanese woman patients with systemic sclerosis. *Lancet* 354 : 220, 1999

- 23) Tanaka A, Lindor K, Gish R, Batts K, Shitatori Y, Omata M, Nelson JL, Ansari A, Coppel R, Newsome M, Gershwin ME : Fetal microchimerism alone does not contribute to the induction of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 30 : 833 - 838, 1999
- 24) Nelson JL : Maternal-fetal immunology and autoimmune disease. In some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmune? *Arthritis Rheum* 39 : 191 - 194, 1996
- 25) Nakahori Y, Mitani K, Yamada Y, Nakagome Y : A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ 1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Res* 14 : 7569 - 7580, 1986
- 26) Subcommittee for scleroderma criteria of the American rheumatism association diagnostic and therapeutic criteria committee : Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 23 : 581 - 590, 1980
- 27) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ : The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25 : 1271 - 1277, 1982
- 28) 大藤 真 : シェーグレン病診断基準 厚生省特定疾患シェーグレン病調査研究班昭和52年度研究業績集 : 3, 1979
- 29) Patri S, Daheron L, Kitzis A, Chomel JC : Evaluation of bone marrow transplantation efficiency by competitive PCR on Y sequences. *PCR Methods Appl* 3 : 361 - 364, 1994
- 30) 兼重俊彦, 稲川 明, 福森泰雄, 猪子英俊 : 最新 PCR-RFLP 情報 : 1995年版 Nomenclature for factors of the HLA system を対象とした, PCR RFLP 法による DRB 1, DPB 1 タイピング. *MHC* 2 : 22 - 30, 1996
- 31) Senger DPS, Goldstein R : Comprehensive typing of DQB1 alleles by PCR-RFLP. *Tissue antigens* 43 : 242 - 248, 1994
- 32) Hashimoto M, Kinoshita T, Yamasaki M, Tanaka H, Imanishi T, Ihara H, Ichikawa Y, Fukunishi T : Gene frequencies and haplotypic associations within the HLA region in 916 unrelated Japanese individuals. *Tissue Antigens* 44 : 166 - 173, 1994
- 33) Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, Weiden PL, Witherspoon RP, McDonald GB, Schubert MM, Atkinson K, Thomas ED : Chronic graft-versus-host disease in 52 patients : adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood* 57 : 267 - 276, 1981
- 34) Ferrara JL, Deeg HJ : Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 324 : 667 - 674, 1991
- 35) Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, Hackman R, Tsoi MS, Storb R, Thomas ED : Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 69 : 204 - 217, 1980
- 36) Chosidow O, Bagot M, Vernant JP, Roujeau JC, Cordonnier C, Kuentz M, Wechsler J, Andre C, Touraine R, Revuz J : Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. Analysis of seven cases. *J Am Acad Dermatol* 26 : 49 - 55, 1992
- 37) Graze PR, Gale RP : Chronic graft versus host disease : a syndrome of disordered immunity. *Am J Med* 66 : 611 - 620, 1979
- 38) Lawley TJ, Peck GL, Moutsopoulos HM, Gratwohl AA, Deisseroth AB : Scleroderma, Sjogren-like syndrome, and chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med* 87 : 707 - 709, 1977
- 39) van Dam AP, Meilof JF, van den Brink HG, Smeenk RJT : Fine specificities of anti-nuclear antibodies in murine models of graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol* 81 : 31 - 38, 1990
- 40) Rolink AG, Gleichmann H, Gleichmann E : Diseases caused by reactions of T lymphocytes to incompatible structures of the major histocompatibility complex. VII. Immune-complex glomerulonephritis. *J Immunol* 130 : 209-215, 1983
- 41) Smith CI, Norberg R, Isenberg D, Staines NA, Gahrton G, Ringden O, Hammarstrom L : Anti - DNA antibody synthesis after bone marrow transplantation : implications for IgG subclass restrictivity and pathogenicity of auto antibodies. *Bone Marrow Transplant* 3 : 583 - 588, 1988
- 42) Petri M, Howard D, Repke J : Frequency of lupus flare in pregnancy. The Hopkins Lupus Pregnancy Center experience. *Arthritis Rheum* 34 : 1538 - 1545, 1991

- 43) Ruiz-Irastorza G, Lima F, Alves J, Khamashta MA, Simpson J, Hughes GR, Buchanan NM : Increased rate of lupus flare during pregnancy and the puerperium : a prospective study of 78 pregnancies. *Br J Rheumatol* 35 : 133 - 138, 1996
- 44) Rivero SJ, Llorente L, Diaz-Jouanen E, Alarcon-Segovia D : T-lymphocyte subpopulation in untreated SLE. Variations with disease activity. *Arthritis Rheum* 20 : 1169 - 1173, 1977
- 45) Rivero SJ, Diaz-Jouanen E, Alarcon-Segovia D : Lymphopenia in systemic lupus erythematosus. Clinical, diagnostic, and prognostic significance. *Arthritis Rheum* 21 : 295 - 305, 1978
- 46) Lambert NC, Evans PC, Hashizumi TL, Maloney S, Gooley T, Furst DE, Nelson JL : Cutting edge : persistent fetal microchimerism in T lymphocytes is associated with HLA-DQA 1*0501 : implications in autoimmunity. *Immunol J Immunol* 164 : 5545 - 5548, 2000
- 47) Aractingi S, Dausset J, Carosella ED : Microchimerism and scleroderma. *Lancet* 351 : 2886, 1998
- 48) Janin Mercier A, Devergie A, Van Cauwenberge D, Saurat JH, Bourges M, Lapiere CM, Gluckman E : Immunohistologic and ultrastructural study of the sclerotic skin in chronic graft-versus-host disease in man. *Am J Pathol* 115 : 296 - 306, 1984
- 49) McDonald GB, Sullivan KM, Schuffler MD, Shulman HM, Thomas ED : Esophageal abnormalities in chronic graft-versus-host disease in humans. *Gastroenterology* 80 : 914 - 921, 1981