



# Plasma platelet-derived microparticles in patients with connective tissue diseases

大藪, 智奈美

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5203

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005203>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	大藪 智奈美
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 5203 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 23 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Plasma platelet-derived microparticles in patients with connective tissue diseases(膠原病患者における血小板マイクロパーティクル)

審 査 委 員

主 査	教 授	錦織 千佳子
	教 授	黒坂 昌弘
	教 授	南 康博

(課程博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### Plasma platelet-derived microparticles in patients with connective tissue diseases

#### 膠原病患者における血小板マイクロパーティクル

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

立証検査医学

(指導教員：熊谷俊一客員教授)

大藪智奈美

(緒言)

血小板マイクロパーティクル (Platelet-derived Microparticles, PDMP) はサイトカイン、トロンビンなどの刺激や高ずり応力による血小板の活性化反応に伴い、細胞膜から放出される微小な粒子である。PDMP は凝固促進作用を有し、血小板活性化の指標となるなど血栓性疾患のメカニズムを知る上で注目されている物質であり、種々の血栓性疾患 (虚血性心疾患、脳梗塞など) の病的な血栓形成にも関与している。PDMP は flip-flop と呼ばれる膜の反転化現象によりリン脂質が表面に発現しており、リン脂質が触媒となり組織因子の働きを強め、凝固を促進するようになる。以上のように、PDMP は生体内の凝固、血栓形成の有用なマーカーとなることが期待されている。

PDMP は腸炎、関節リウマチ、抗リン脂質抗体症候群および強皮症などで高値となる報告がいくつかあり、炎症、免疫に深く関わっていることが考えられる。膠原病は自己免疫という免疫の異常により炎症が起こる疾患であり、なおかつ多くの血管病変を伴い、多臓器病変がみられる疾患である。

従来 PDMP は主としてフローサイトメトリー (FCM) 法により測定されていたが、施設や機器間差の影響を受ける恐れがある。これに対し、ELISA 法はサンプルの凍結保存が可能であり、施設間差が少なく、標準化も可能であり ELISA 法を用いた検討が報告されている。

(目的)

膠原病患者における血中 PDMP 値と病態、特に Raynaud 現象との関連を ELISA 法にて検討する。

(対象と方法)

対象：対象患者数はそれぞれ、全身性エリテマトーデス (SLE) 88 人、強皮症 (SSc) 33 人、混合性結合組織病 (MCTD) 14 人、皮膚筋炎 (PM/DM) 18 人であり、平均年齢は  $48.0 \pm 16.4$  歳、男女比は 19/134 であった。34 名の健常人 (平均年齢:  $43.7 \pm 9.2$  歳、男女比 9/25) をコントロールとした。

サンプル前処理：抗凝固剤に ACD-EDTA を用いた専用採血管 (ニプロネオチューブ) にて真空採血により末梢血を採取した。1 時間以内にポリプロピレン製マイクロチューブへ 1.5ml 分注し、8000 g、5 分遠心後、斜めになった遠心物が再び舞い上がらないように速やかに垂直に立て、500  $\mu$ l 上清を採取し再び 8000 g、5 分遠心後、200  $\mu$ l 上清を保存用チューブに移し、 $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存しサンプルとした。

測定方法：2 種の抗体を用いたサンドイッチ ELISA を用いた PDMP 測定キット (ジムロテスト PDMP) により、PDMP を測定した。CD42a (抗 GPIX) が固相された 96 穴プレートに前処理液、サンプルを添加し、3 時間インキュベーションし、ペルオキシダーゼ標識 CD42b (GPIIb 抗体) を添加し、1 時間反応させ洗浄、基質液を添加、反応停止後の吸光度を測定した。

統計学的方法：Stat Flex ver. 6.0 および R version 2.10.1 (R Foundation for Statistical

Computing, Vienna, Austria)を用いた。正規化のためにPDMP を-0.5乗した値について、t 検定にて解析を行った。PDMP と関連の強い臨床的項目について、それぞれの患者の血小板数、ステロイド薬使用の有無、Raynaud 症状の有無、潰瘍の有無、抗血小板薬使用の有無を調べ、平均値の差の検定（t 検定）および重回帰分析により検討した。P 値は 0.05 以下を有意差ありとした。

#### （結果）

血中 PDMP の平均値(mean±SD)は、疾患別群では、MCTD 90.6±117.1 U/ml; PM/DM 27.0±68.91 U/ml; SLE 23.1±48.3 U/ml; SSc 52.2±92.8 U/ml に対し、健康人コントロール群は 7.0±4.6 U/ml であった。MCTD および SSc の PDMP 値は健康人よりも有意に高かったが、PM/DM と SLE では高値傾向であった。

膠原病全症例を Raynaud 症状あり、なしの 2 群と健康人について PDMP 平均値を比較したところ Raynaud 症状あり群 58.9±97.5 U/ml, Raynaud 症状なし群 20.4±43.4 U/ml, 健康人コントロール群は 7.0±4.6 U/ml であった。Raynaud 症状ありの群はなし群および健康人群に比較し、有意に高値であった（ともに p<0.005）。

また、PDMP を目的変数、年齢、性別、血小板数、ステロイド使用の有無、Raynaud 症状の有無、潰瘍の有無、抗血小板薬使用の有無、を説明変数として重回帰分析を行ったところ、Raynaud 症状が最も関連が強い項目であった。さらに 18 症例に関して、PDMP 値の経時的な変化を調べたところ、PDMP ≤25 IU/ml (N=12) の症例群および PDMP >25 IU/ml (N=6) の症例群いずれにおいても、季節的変動はみられなかった。

#### （考察）

これまでの PDMP については、本報告と同様に MCTD, SSc の PDMP 値は健康人コントロールよりも有意に高値との報告があるが、MCTD においては PDMP 値を検討した報告はない。平均値の差の検定および重回帰分析において、PDMP 値は Raynaud 症状ありの群で有意に高値であり、Raynaud 症状のみが PDMP と強い関連を示した。また、経時的に PDMP 値を測定した結果、季節変化などにも関係は見られず、常に PDMP 値は同程度の値を示した。

SSc および MCTD では Raynaud 症状の有無で 2 群に分けたとき、PDMP 値はあり群で有意に高値であったが、SLE 患者群では有意差は見られなかった。今回の検討では、動脈硬化の因子など検討されていないこともあり、さらなる検討が必要であると考えられる。

患者ごとの PDMP 値は経時的に大きな変化が見られなかったことから、Raynaud 症状ありの患者では慢性的に血管が損傷しており、血小板が常に活性化している状態にあると考えられた。Raynaud 現象の病因は不明な点が多く、主に交感神経系を主とする自律神経系の異常により寒冷暴露などにより指尖動脈など末梢血管のれん縮が誘発される説と、血管内皮細胞の器質的障害より血小板活性化や血管収縮、赤血球形態異常、血液粘稠度の増加などにより末梢血管に一過性の循環障害が惹起されるという説がある。従って、Raynaud 症状を

有する患者では、血管のれん縮や血管壁の変化により血小板活性化が生じ、その結果 PDMP が血栓を促進し、手指の梗塞や潰瘍形成に関与していると考えられる。しかしながら、今回の検討においても過去の報告と同様に、手指の潰瘍と PDMP 値との有意の関連は認められず、手指の潰瘍発生における Raynaud 現象の関与については未だ明らかではない。

PDMP は MCTD, SSc において健康人よりも有意に高値であり、また Raynaud 症状と強い関連があることが明らかになった。ELISA 法による PDMP の測定は、サンプルの長期保存が可能であり、簡易に測定ができ FCM 法のように施設間差を考慮することなく PDMP 値を評価することが可能であることから臨床的に有用である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2170号	氏 名	大藪 智奈美
論文題目 Title of Dissertation	膠原病患者における血小板マイクロパーティクル Plasma platelet-derived microparticles in patients with connective tissue diseases		
審査委員 Examiner	主 査 錦織 41子 Chief Examiner 副 査 黒坂 昌弘 Vice-examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

血小板マイクロパーティクル (Platelet-derived Microparticles, PDMP) はサイトカイン、トロンピンなどの刺激や高ずり応力による血小板の活性化反応に伴い、細胞膜から放出される微小な粒子である。PDMP は凝固促進作用を有し、種々の血栓性疾患（虚血性心疾患、脳梗塞など）の病的な血栓形成にも関与している。PDMP は flip-flop と呼ばれる膜の反転化現象によりリン脂質が表面に発現しており、リン脂質が触媒となり組織因子の働きを強め、凝固を促進するようになる。

PDMP は腸炎、関節リウマチ、抗リン脂質抗体症候群および強皮症などで高値となり、炎症、免疫に深く関わっていることが考えられる。膠原病では血管病変を伴うことが多い。

従来 PDMP は主としてフローサイトメトリー (FCM) 法により測定されていたが、施設や機器間差の影響を受ける恐れがある。これに対し、ELISA 法はサンプルの凍結保存が可能であり、施設間差が少なく、標準化も可能である。

本研究は膠原病患者における血中 PDMP 値と病態、特に Raynaud 現象との関連を ELISA 法にて検討したものである。対象患者数はそれぞれ、全身性エリテマトーデス (SLE) 88 人、強皮症 (SSc) 33 人、混合性結合組織病 (MCTD) 14 人、皮膚筋炎 (PM/DM) 18 人であり、平均年齢は  $48.0 \pm 16.4$  歳、男女比は 19/134 で、34 名の健常人 (平均年齢:  $43.7 \pm 9.2$  歳、男女比 9/25) をコントロールとした。

抗凝固剤に ACD-EDTA を用いた専用採血管にて真空採血により末梢血を採取し、1 時間以内にポリプロピレン製マイクロチューブへ分注し、8000 g、5 分遠心後、速やかに垂直に立て、500  $\mu$ l 上清を採取し再び 8000 g、5 分遠心後、200  $\mu$ l 上清を保存用チューブに移し、 $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存しサンプルとし、2 種の抗体を用いたサンドイッチ ELISA を用いた PDMP 測定キット (ジムロテスト PDMP) により、PDMP を測定した。CD42a (抗 GPIIb/IIIa) が固相された 96 穴プレートに前処理液、サンプルを添加し、3 時間インキュベーションし、ペルオキシダーゼ標識 CD42b (GPIIb 抗体) を添加し、1 時間反応させ洗浄、基質液を添加、反応停止後の吸光度を測定した。

統計学的解析は Stat Flex ver. 6.0 および R version 2.10.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いた。正規化のために PDMP を  $-0.5$  乗した値について、t 検定にて解析を行った。PDMP と関連の強い臨床的項目について、それぞれの患者の血小板数、ステロイド薬使用の有無、Raynaud 症状の有無、潰瘍の有無、抗血小板薬使用の有無を調べ、平均値の差の検定 (t 検定) および重回帰分析により検討した。P 値は 0.05 以下を有意差ありとした。

血中 PDMP の平均値 (mean±SD) は、疾患別群では、MCTD 90.6±117.1 U/ml; PM/DM 27.0±68.91 U/ml; SLE 23.1±48.3 U/ml; SSc 52.2±92.8 U/ml に対し、健常人コントロール群は 7.0±4.6 U/ml であった。MCTD および SSc の PDMP 値は健常人よりも有意に高かった。

膠原病全症例を Raynaud 症状あり, なしの 2 群と健常人について PDMP 平均値を比較したところ Raynaud 症状あり群 58.9±97.5 U/ml, Raynaud 症状なし群 20.4±43.4 U/ml, 健常人コントロール群は 7.0±4.6 U/ml であった。Raynaud 症状ありの群はなし群および健常人群に比較し、有意に高値であった (ともに  $p<0.005$ )。

また、PDMP を目的変数、年齢、性別、血小板数、ステロイド使用の有無、Raynaud 症状の有無、潰瘍の有無、抗血小板薬使用の有無、を説明変数として重回帰分析を行ったところ、Raynaud 症状が最も関連が強い項目であった。

本報告は MCTD、SSc の PDMP 値は健常人コントロールよりも有意に高値であること、PDMP 値が Raynaud 症状ありの群で有意に高値であることを示した。

SSc および MCTD では Raynaud 症状の有無で 2 群に分けたとき、PDMP 値はあり群で有意に高値であったが、SLE 患者群では有意差は見られなかった。今回の検討では、動脈硬化の因子など検討されていないこともあり、さらなる検討が必要であると考えられる。

患者ごとの PDMP 値は経時的に大きな変化が見られなかったことから、Raynaud 症状ありの患者では慢性的に血管が損傷しており、血小板が常に活性化している状態にあると考えられた。Raynaud 現象の病因は不明な点が多く、主に交感神経系を主とする自律神経系の異常により寒冷暴露などにより指尖動脈など末梢血管のれん縮が誘発される説と、血管内皮細胞の器質的障害より血小板活性化や血管収縮、赤血球形態異常、血液粘調度の増加などにより末梢血管に一過性の循環障害が惹起されるという説がある。今回の結果は、Raynaud 症状を有する患者では、血管のれん縮や血管壁の変化により血小板活性化が生じ、その結果 PDMP が血栓を促進し、手指の梗塞や潰瘍形成に関与しているとする仮説を支持するものである。

本研究は PDMP が MCTD、SSc において健常人よりも有意に高値であり、また Raynaud 症状と強い関連があることを明らかにし、臨床的な有用性も示したものとして、価値ある集積であると思われる。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を取得する資格があると認める。