

200/0-677

厚生科学研究費補助金

高度先端医療研究事業

人工ポリクローナルFv グロブリン製剤の 開発に関する研究

(H12-血液-006)

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

鈴木 和 男

平成14 (2002) 年 3 月

目 次

I. 総括報告

- 人工ポリクローナル Fv グロブリン製剤の開発に関する研究
鈴木和男 (国立感染症研究所生物活性物質部) 1

II. 分担研究者報告

1. 臨床、モデル動物班

- 1) ANCA 関連腎炎及び血管炎の好中球機能の検討と γ グロブリン療法の効果に関する研究
武曾 恵理 (北野病院) 9
- 2) 小児臨床におけるガンマグロブリン治療の評価
岡崎 富男 (広島市民病院) 21
- 3) *Candida albicans* (*C.albicans*)菌体抽出物マウス系統的血管炎誘発モデルを用いた免疫グロブリン投与による血管炎発生への影響
高橋 啓 (東邦大学医学部附属大橋病院病理学) 25
- 4) MPO-ANCA および好中球機能異常を示す血管炎動物モデルの検討
鈴木 和男、大川原明子 (国立感染症研究所生物活性物質部) 27
- 5) 真菌由来多糖による自己抗体の産生誘導機構の解析
大野 尚仁 (東京薬科大学薬学部) 33

2. 抗体作製班

- 1) MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究-1
新井 孝夫 (東京理科大学理工学部) 39
- 2) MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究-2
佐々木次雄 (国立感染症研究所安全性研究部) 39
- 3) MPO の立体構造に関する研究
田之倉 優 (東京大学大学院農学生命科学研究科) 43

III. 研究成果の刊行に関する一覧表および別刷 51

IV. 研究成果の刊行物・別刷 55

V. 研究班会議 183

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
主任者総括研究報告書

人工ポリクローナル Fv グロブリン製剤の開発に関する研究

主任研究者

鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質部・室長

分担研究者

1. 臨床、モデル動物班

武曾 恵理 財団法人田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科・部長
岡崎 富男 広島市民病院・副院長
高橋 啓 東邦大学医学部附属大橋病院病理学・助教授
鈴木 和男 国立感染症研究所生物活性物質部・室長
大野 尚仁 東京薬科大学薬学部・教授

2. 抗体作製班

新井 孝夫 東京理科大学理工学部・教授
佐々木次雄 国立感染症研究所安全性研究部・室長
田之倉 優 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学・教授

研究協力者

内田 隆史 東北大学加齢研究所・助教授
中田 光 国立国際医療センター研究所・室長
大川原明子 国立感染症研究所生物活性物質部・研究員
荒谷 康昭 横浜市立大学木原生物学研究所・助教授
小野 孝彦 京都大学大学院医学研究科循環病態学・助手
亀岡 洋祐 国立感染症研究所遺伝子解析室・主任研究官
猪原登志子 京都大学大学院医学研究科循環病態学・研究生
伊藤 三恵 国立国際医療センター研究所・流動研究員
鈴木倫太郎 海洋バイオテクノロジー研究所・流動研究員

アドバイザー

直江史郎（東邦大学医学部・教授）

研究概要

難病疾患としてあらわれる神経系疾患、橋本病、糖尿病、自己免疫性肝炎、血管炎、肺胞症、シェーグレンなどの自己免疫疾患は、好中球やマクロファージを主体とした炎症性細胞の浸潤による炎症を伴う。炎症性細胞の活性化が、対応分子との免疫複合体によって誘導され、病態は重篤化へと進展すると考えられている。その治療は、ステロイドパルスをはじめ、対応抗原の感作療法や透析法によっており、新たな治療法の開発が強く望まれている。血管炎である川崎病では、ステロイドパルスからガンマグロブリン製剤による治療に変えてから重篤な病態は激減し、その有効性が実証されている。一方、高齢者に多い川崎病以外の血管炎は、ステロイドのリスク軽減が要望されており、ヨーロッパでは、血管炎へのガンマグロブリン製剤治療がはじまり好成績を得ているとの報告がある。そこで、本研究では、血管炎の中でも MPO(myeloperoxidase)-ANCA 自己免疫疾患の治療にフォーカスをあて、血管炎モデル動物での有効性の検討、治癒機転の解明、および治療に有用な「人工ガンマグロブリン製剤」を開発することを目的とした。12年度は、Fv および Full ガンマグロブリン作製の方法を確立し、本年度は、臨床成績のまとめを行うとともに、治療効果を評価する系を確立した。具体的には、1) IVIG による血管炎治療の臨床検討、2)モデルマウスの IVIG 治療の予備的検討、3)それに加え、新たなモデルマウスを検討した。4) また、モデルマウスを利用して血管炎誘発機序を免疫学的に解析し、5) MPO ノックアウトマウスを利用したマウス MPO 特異的モノクロナール抗体(マウス MPO-ANCA)を得た。併せて、病態と関連する MPO 立体構造の解析も行った。今後は、これらの成果に基づき、ヒト型およびマウス型ポリクロナール MPO 抗体作製を完成させ、モデル動物に使用可能な量のポリクロナール抗体を得て、2つの血管炎モデルマウスを用いて IVIG 治療の評価をする。マウス MPO 特異的抗体投与による免疫学的指標を使って治療評価法を確立する。これを基に、血管炎・腎炎での IVIG 治療による臨床成績を評価することをめざす。

A. 研究目的

高度高齢社会に入ったわが国では、血管炎やリウマチなど生体防御異常による自己免疫疾患が増加しており、その対応が急務になっている。これらの疾病は、他の自己免疫性疾患と同様に、炎症性細胞の活性化により慢性化し、重篤な病態へと進展する。しかし、その発症機構や治癒機転は明確になっていない。そのため、治療はステロイ

ドパルスなどによっており、高齢者には危険性が高く、新たな治療法の開発が強く望まれている。最近、ヨーロッパにおいて、血管炎でのガンマグロブリン製剤治療 (IVIG) が好成績を得ている。その導入要因として、MPO(myeloperoxidase)-ANCA 関連血管炎のように、自己抗体の対応抗原が解明され、ガンマグロブリン療法と MPO-ANCA 抗体との関連を解明する手がかりが明らか

になりつつあるのも背景にある。このように、ヨーロッパで始まった IVIG による血管炎治療試験が好成績であるが、MPO-ANCA 関連血管炎は、ヨーロッパより日本で発症数が多いことから、日本での血管炎に適した人工ガンマグロブリンの開発が望まれている。本研究において行った血管炎患者の治療成績は、世界的にも先駆的な成果である。

これまで、主任研究者らは、自己免疫疾患の病因に関して研究し、患者血清中の自己抗体の病因性エピトープの同定および自己抗体産生の血管炎モデルマウス（川崎病および腎炎）を検討してきた。好中球に着目して病因の解明と予防・治療法に焦点をあてて検討し、病因の解明への糸口を見いだした。本疾患は、好中球の分子 MPO に対する抗体 (MPO-ANCA) を産生することから、そのエピトープを解析した結果、主として MPO の H 鎖の N および C 末端に単独で反応するエピトープをもつ MPO-ANCA 抗体が重症化と関連し、特定の反応部位が病態と関連することを認めた。この結果から、MPO-ANCA のクロナリティーは血管炎疾患および病態と関連があることが示唆され、新しい治療・病態評価法の指針を確立した (Tomizawa et al., J. Clin. Immunol, 1999; Fujii et al, Clin Neph, 2000)。

「国際 ANCA ワークショップ」など国際的な研究交流が進展している分野では、すでに本製剤による治療試験が開始され、治療機転は不明ではあるが良好であると報告されている。国内でも、本研究班において、血管炎・腎炎でのガンマグロブリン製剤による治療が検討され、有効な成績が得られ

ている（論文準備中）。また、川崎病では、すでにガンマグロブリン製剤の大量療法が功を奏し、重篤な病態の治療に成功しているが、血液製剤であることや高価であるなど、他の自己免疫疾患・血管炎への応用が進展しない状況である。また、川崎病の本製剤による治療でも本製剤不応答の場合もあり、ステロイド治療や好中球エラスターゼ阻害剤の併用やその単独投与も検討されはじめています。

一方、血管炎などの自己免疫疾患の治療法開発や病因の解析には、自己抗体を産生するモデルマウスを用いた原因究明や治療法の研究が現在の課題となっていることから、モデルマウスの開発も本研究を中心として着実に進んできている。本年度までには、モデル動物としては、NZB/WF1、MRL/lpr、SCG/Kj、IRF-8/ICSBP マウスおよび *Candida albicans* 由来物質誘発の冠状動脈炎マウスなどの疾患モデルマウスを用いて、MPO がどの様に関与しているかを解明するとともに (A. Ishida-Okawara, et al. Inflammation, 2001)、MPO-ANCA 産生モデルマウスでの治療の有効性を検討した。

本研究において、自己免疫疾患 MPO-ANCA 関連血管炎の治療法に目的をしぼり、人工ガンマグロブリン開発をめざしている。MPO-KO マウスを用いて、マウス MPO 特異的抗体産生ハイブリドーマを作製するとともに、その脾臓細胞の mRNA から MPO 抗体遺伝子をクローニングし、人工 Fv 抗体を作製する系をすでに構築するなど、本年度までにその準備研究は整った。すなわち、12 年度には、MPO-ANCA 産生モデルマウスの作製

およびヒト型モノクローナル抗体を作製し、人工ガンマグロブリン作製のための ScFv 遺伝子を発現させる系を確立した。また、われわれのグループで作製した MPO 欠損マウス (Aratani et al., Infection & Immunity, 1999, and Y. Aratani, et al. J. Infectious Diseases, 2000) を用いて、マウス MPO 特異的抗体産生ハイブリドーマを作製するとともに、その脾臓細胞の mRNA から MPO 抗体遺伝子をクローニングし人工 Fv 抗体を作製する系を構築している。

以上のように、血管炎治療に主眼をおいて、治癒機転が不明なガンマグロブリン製剤の欠点を最小限に抑えたとともに、大量に安定供給が可能な利点を利用出来る人工ガンマグロブリン作製することを目的とする。

B. 研究結果

各分担者の成果の概要を記す。

1. 臨床、モデル動物班

1) ANCA 関連腎炎及び血管炎の好中球機能の検討と γ グロブリン療法の効果に関する研究

ANCA 関連血管炎症候群の治療に大量ステロイド及び免疫抑制剤の投与は不可欠であるが、発症年齢が高いこと、免疫不全状態であることより、しばしば致命的な感染症など副作用による治療困難例が多いことも事実である。免疫グロブリン治療 (intravenous immunoglobulin

treatment : IVIG) は免疫能を低下させることなく、一部は ANCA のイディオタイプ

抗体を介して、炎症惹起作用を抑制する可能性があり従来の療法に対する有力な補助療法として期待される。今年度は MPO-ANCA 関連腎炎症例 8 例に本療法を施行し、前例で臨床所見、炎症症状、腎病変のいずれかの改善を見、更に一部では、ステロイド剤の用量を著明に減量できた。IVIG は現在増えつつある MPO-ANCA 関連腎炎症候群の有力な補助療法として、まず試みられるべき治療と考えられるが、更に症例を増やして検討することが必要である。(武曾恵理)

2) 小児臨床におけるガンマグロブリン治療の評価

広島市民病院における川崎病の臨床的検討をおこなった。対象期間は、平成元年 1 月—11 年 8 月の 10 年 7 ヶ月である。発症は 266 例で、その内、診断基準を満たす症例は 220 例であった。その内訳は、男 128、女 92 例で、発症年齢 1 ヶ月～10 歳 5 ヶ月 (平均 27.0 ± 21.3 ヶ月、中央値 22 ヶ月)。治療は、206 例についてガンマグロブリンを施行し、全症例アセチルサルチル酸あるいはフルルビプロフェンを併用した。初回ガンマグロブリン治療無効例となった 26 例については、ガンマグロブリン再投与、ウリナスタチン投与、ステロイド投与を施行した。ガンマグロブリン無効例の 19% は冠動脈病変を認めた。以上から、急性期治療に難渋したガンマグロブリン無効例では、冠動脈病変が多いと言える。このようなガンマグロブリン無効例になるケースは、どのような原因によっているかは検討されはじめたばかりであり、Fc γ レセプターの多型が関与している可能性も挙げられている。(岡崎富男)

3) *Candida albicans* (*C. albicans*)菌体抽出物マウス系統的血管炎誘発モデルを用いた免疫グロブリン投与による血管炎発生への影響

C. albicans 菌体抽出物接種によるマウス系統的血管炎モデルを用い、ヒト免疫グロブリンが血管炎発生に与える影響を検討した。ヒト免疫グロブリンはマウス冠状動脈炎を抑制し、炎症を軽減化させる傾向を示したが、投与時期、投与量など、より詳細な検討が必要と思われた。(高橋啓)

4) MPO-ANCA および好中球機能異常を示す血管炎動物モデルの検討

血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究が必須である。血管炎発症に伴い血中にMPO-ANCAが上昇するモデルマウスにおいて、血管炎の発症に関連する血清中のMPO-ANCA値、その対応分子MPOの性状および好中球機能を解析した。腎炎や血管炎を自然発症するNZB/WF1、MRL/lpr、SCG/Kj、IRF-8/ICSBP マウスや *Candida albicans* - derived substances (CADS)接種によって冠状動脈炎を誘発するマウスがある。CADSが誘発する冠状動脈炎マウスを用いてガンマグロブリン治療の予備的治療を行ったが、血管炎、腎炎を自然発症するマウスのガンマグロブリン治療モデルを作製する目的で、半月体形成性系球体腎炎を高率かつ急速に自然発症するSCG/Kjマウスの好中球機能、MPO-ANCA産生と、腎炎の発症、進行との相関を検討した。腎炎の発症、進行の初期段階(尿たんぱく

300mg/dl以下)の末梢好中球が無刺激でMPOの易放出性を示し、活性化状態になっていることを示した。また、ヒト好中球ライソゾーム酵素MPO放出を阻害するアセアノスタチンをマウスの好中球に作用させたところ無刺激MPO放出を阻害したことから、腎炎の治療評価として応用できる可能性が示唆された。尚、これらのモデルマウスにおけるMPOおよびMPO-ANCAの役割を解明するため、リコンビナントマウスMPO(rmMPO)およびマウスMPO(mMPO)特異的抗体を作製した。rmMPOは、ヒトと同様mMPOを *E. coli* に発現・精製し、native mMPOはマウス腹腔より調整した。(鈴木和男、大川原明子)

5) 真菌由来多糖による自己抗体の産生誘導機構の解析

Candida albicans のアルカリ抽出物(CADS)をマウスに腹腔内投与すると川崎病類似の冠状動脈炎を誘発することが報告されている。本研究では、完全合成液体培地で *C. albicans* を培養し、その培養上清から得られたmannoprotein- β -glucan複合体であるCAWSをマウスに接種し、冠状動脈血管炎の発症をCADSと比較すると共に、発症機序を解析した。また、抗MPO抗体を *in vitro* 培養系に添加し、その効果を評価した。CADSとCAWSの冠状動脈血管炎の発症率を比較すると、C3Hマウスにおいて、CADSは約60%の発症率であるのに対し、CAWSではほぼ全例に発症した。また、CBA/J並びにDBA/2マウスはCADSによる血管炎の誘導には抵抗性を示したが、CAWSはDBA/2マウスに対して高率に血管炎を発症させ、誘発物

質ごとに系統間の感受性に差のあることが明らかとなった。血管炎誘発の機序を解析するために、様々な活性スクリーニングを行ったところ、培養細胞に対する直接障害作用、サイトカイン産生抑制作用、血小板凝集促進作用、血管内皮細胞機能を示した。一方、脾細胞の培養系にポリクローナル抗 MPO 抗体を添加し活性化能を比較したが、対照として用いた抗体添加群との間に顕著な差を見出すことはできなかった。モノクローナル抗 MPO 抗体（佐々木次雄先生より分与）の特異性をスクリーニングしたところ、マンナンに対して特異性を示すクローンが見出され、MPO と CAWS が免疫化学的に共通抗原構造を有していることが強く示唆された。以上、本研究において、CAWS の冠状動脈血管炎誘発活性の特徴を明確にすると共に、抗 MPO 抗体の活性修飾作用について検討した。（大野尚仁）

2. 抗体作製班

1) MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究

ヒト MPO を免疫した正常マウスとマウス MPO を免疫した MPO ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を材料として、それぞれ 1 種類と 32 種類の抗 MPO モノクローナル抗体を作製した。そのうち、MPO に対する親和性の特に高かった 2 種類の抗体、3G7 と 18-7/5C について、それらの性質を解析した。両抗体ともに未変性の MPO と反応したが、18-7/5C のみが MPO 活性を阻害した。また、競合 ELISA により、両抗体の認識するエピトープは異なっていることを明らかにした。以上のことは、MPO 阻害活性と競合 ELISA

の測定することで、抗 MPO モノクローナル抗体が分類可能なことを示している。さらに、この分類により得られる知見は、MPO-ANCA 自己免疫疾患モデルマウスに対する抗 MPO 抗体の治療効果を評価する際に有用と思われる。（新井孝夫、佐々木次雄）

2) MPO の立体構造に関する研究

抗好中球細胞質抗体(ANCA)の一つである MPO-ANCA は、血管炎などの疾患においてその量が上昇する。本研究は、治療のためのブロック抗体の開発に資するために、MPO と MPO-ANCA の分子間相互作用の様式を明らかにし、これにより合理的なブロック抗体のデザインを行うことを目的としている。我々は立体構造上の特徴と MPO フラグメントのリスクの実験結果と比較することにより、MPO 上の MPO-ANCA との分子間相互作用部位を特定した。MPO はその活性部位周辺の分子表面とループおよび α ヘリックス領域で MPO-ANCA と結合すると考えられる。この結果をもとに MPO と抗体の複合体のモデル化を行った。分子中央のループとその近傍の α ヘリックスを合わせるとその大きさは抗体分子の抗原結合部位とほぼ同じであり、これらの領域が MPO-ANCA 結合部位であることを強く示唆している。本研究により、MPO の MPO-ANCA 結合部位は MPO の活性部位周辺の溶媒に露出したループおよび α ヘリックスであることが予測された。現在の所、MPO-ANCA が疾患にどのように関わるかは明らかになっていないので、MPO の活性と疾患との関係も不明である。しかし、MPO-ANCA により MPO の活

性が阻害など何らかの影響を受け、これにより疾患が起きると考えるのが自然である。予測された結合では、抗体は活性部位のヘムの近傍を覆うようにして結合しており、MPO の活性阻害が疾患に関することを示唆するものと言える。（田之倉優）

E. 結論

難病疾患としてあらわれる血管炎をはじめ、神経系疾患、橋本病、糖尿病、自己免疫性肝炎、肺胞症、シェーグレンなどの自己免疫疾患は、好中球やマクロファージを主体とした炎症性細胞の浸潤による炎症を伴う。炎症性細胞の活性化が、対応分子との免疫複合体によって誘導され、病態は重篤化へと進展すると考えられている。その治療は、ステロイドパルスをはじめ、対応抗原の感作療法や透析法によっており、新たな治療法の開発が強く望まれている。血管炎である川崎病では、ステロイドパルスからガンマグロブリン製剤による治療に変えてから重篤な病態は激減し、その有効性が実証されている。一方、高齢者に多い川崎病以外の血管炎は、ステロイドのリスク軽減が要望されており、ヨーロッパでは、血管炎へのガンマグロブリン製剤治療がはじまり好成績を得ているとの報告がある。そこで、本研究では、血管炎の中でも MPO-ANCA 自己免疫疾患の治療にフォーカスをあて、本疾患モデル動物での有効性の検討、治癒機転の解明、治療に有用な「人工ガンマグロブリン製剤」を開発することを目的とした。12 年度は、Fv および Full ガンマグロブリン作製の方

法を樹立してきており、本年度は、治療効果を評価するとともに評価する系を確立した。1) IVIG による血管炎治療の臨床検討、2)モデルマウスの IVIG 治療の予備的検討、3)新たなモデルマウスを検討、4)モデルマウスを利用した血管炎誘発機序を免疫学的に解析、5) MPO ノックアウトマウスを利用したマウス MPO 特異的モノクローナル抗体(マウス MPO-ANCA)を得た。6)併せて、病態と関連する MPO 立体構造の解析も行った。

今後は、これまでの成果に基づき、1)ヒト型およびマウス型ポリクローナル MPO 抗体作製を完成させ、モデル動物に使用可能な量のポリクローナル抗体を得る。2)2つの血管炎モデルマウス(川崎病、腎炎)を用いて IVIG 治療の評価をする。3)血管炎・腎炎での IVIG 治療による臨床成績を評価する。4)マウス MPO 特異的抗体による治療と連動した免疫学的指標を確立する。5)病態エピトープの解析からみた分子構造を解析するなどこと計画している。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

各分担者の項参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請：

- 1) ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス
- 2) LECT2 欠損マウス

分担研究課題

ANCA 関連腎炎及び血管炎の好中球機能の検討と
γグロブリン療法の効果に関する研究

分担研究者：武曾恵理 財団法人田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科部長

主任研究者：鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質部室長

研究協力者：猪原登志子 京都大学大学院医学研究科循環病態学研究生

研究協力者：小野孝彦 京都大学大学院医学研究科循環病態学助手

研究概要 ANCA 関連血管炎症候群の治療に大量ステロイド及び免疫抑制剤の投与は不可欠であるが、発症年齢が高いこと、免疫不全状態であることより、しばしば致命的な感染症など副作用による治療困難例が多いことも事実である。免疫グロブリン治療（intravenous immunoglobulin treatment:IVIG）は免疫能を低下させることなく、一部はANCAのイディオタイプ抗体を介して、炎症惹起作用を抑制する可能性があり従来の療法に対する有力な補助療法として期待される。今年度はMPO-ANCA 関連腎炎症例8例に本療法を施行し、前例で臨床所見、炎症症状、腎病変のいずれかの改善を見、更に一部では、ステロイド剤の用量を著明に減量できた。IVIGは現在増えつつあるMPO-ANCA 関連腎炎症候群の有力な補助療法として、まず試みられるべき治療と考えられるが、更に症例を増やして検討することが必要である。

1. ANCA 関連血管炎に対するヒト免疫グロブリン(IVIG, Intravenous Immunoglobulin)治療効果の検討（8症例のまとめ）

A. 研究目的

半月体形成性腎炎や血管炎に好中球自己抗体MPO-ANCA(Myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody)の上昇が認められ、臨床マーカーとして利用されている。本抗体の対応抗原である Myeloperoxidase(MPO)は好中球に固有のライソゾーム酵素で、殺菌、殺ウイルス作用に重要な働きをしている。また、抗体価の上昇に伴って血中には活性化好中球が循環していることが明らかになっている。この活性化された好中球は、さらに炎症や感染によって腎炎や血管障害を誘発すると推察される。

ANCA 関連血管炎症候群の治療には大量ステロイド療法や、cyclophosphamide を用いた強力

な免疫抑制療法が必要である。しかしながら、ANCA 関連血管炎症候群は高齢者に多く発生し、治療副作用で致命的となることもしばしば経験される。特に高齢者においては強力な免疫抑制を行うことにより、感染症の発症、増悪が問題となる。また、大量ステロイド療法特有の副作用として、糖尿病の発症、増悪や、肝炎ウイルス保持者では大量ステロイド投与後の減量時期におけるウイルス再増殖によって、致命的な肝炎を発症することもしばしばである。

免疫グロブリン治療 (intravenous immunoglobulin treatment; IVIG)はANCAのイディオタイプ抗体を介して作用し本抗体の炎症惹起作用を抑制することなど、本疾患特異的な免疫能の調整を行い従来の治療法の問題点を補う有力な補助療法として期待される。

【目的】MPO-ANCA 関連腎炎、血管炎症候群に

における IVIG 療法の治療効果を臨床的に判定するとともに、IVIG 治療前後における好中球機能について検討した。

B.対象と方法

【対象患者】(Table 1) 京都大学医学部附属病院ならびに北野病院に入院となった MPO-ANCA 関連血管炎症例 8 例(男性 4 名、女性 4 名)。平均年齢 73 歳(61-84 歳)。

全例とも血清学的に MPO-ANCA 陽性例であり、全例とも治療前腎生検を施行し、組織学的に ANCA 関連腎炎あるいは血管炎と診断した。腎生検所見を Activity Index, Chronicity Index を用いて評価した (Table 2, 3)^{1) 2)}。症例 2 (75 歳男性) は再発症例であった。症例 3(77 歳男性) は膜性増殖性腎炎との合併例であった。症例 4 は (65 歳男性) 抗糸球体基底膜抗体も陽性であり、組織学的には ANCA 関連血管炎と抗糸球体基底膜抗体腎炎の合併例であった。

【投与方法】(Table 4) 腎生検後、初期治療として IVIG (乾燥スルホ化ヒト免疫グロブリン)400mg/kg/day, 5 日間の治療を施行した後、後療法として経口ステロイド療法 (oral corticosteroids, CS) あるいは経口 cyclophosphamide (CPM) 投与を行った。治療前と、IVIG 後 (CS / CPM 投与開始前) に臨床的治療効果判定を Birmingham vasculitis activity score (BVAS)³⁾ を用いて評価した。

【好中球機能測定】

各患者群の IVIG 治療前後における好中球機能を測定した。

1) 好中球からの MPO 放出活性 (MPO release)

ヘパリン加全血 20ml よりリンホブレップデキストラン法にて好中球を分離。好中球 2×10^6 個を Hank's balanced salt solution (HBSS) に浮遊させた好中球懸濁液を作成。その後、脱顆粒誘発のための Cytochalasin B (CB) $5 \mu\text{g/ml}$ と細菌由来ペプチド fMet-Leu-Phe (FMLP) 10^{-6}mol/L を用いて刺激。細胞外液と Cell homogenate を作成。

MPO 活性はテトラメチルベンジジンおよび H_2O_2 を基質として用い、650nm の吸光度の増加を分光高度計を用いて測定した^{4) 5)} (Table 5)。求められた MPO 放出活性より、%MPO release と FMLP 感受性を計算にて求めた (Table 6)。

2) 活性酸素産生の初速度

ヘパリン加全血 20ml より HBSS 浮遊好中球懸濁液 (2×10^6 個) を作成。Cytochrome C とともに 37°C で加温後、Cytochalasin B と FMLP を添加し、活性酸素 (O_2) 産生を Cytochrome C の還元能を用いて 550nm の吸光度の変化からその初速度を計算した^{4) 5)} (Table 7)。

C.結果

Table 8 に示すとおり、ANCA 関連血管炎に関連する症状、検査所見の改善を認めた。解熱 (3 例)、食欲回復 (3 例)、CRP 低下 (7 例)、腎機能低下の停止 (3 例)。治療前後の BVAS は、IVIG 後に有意に低下した (Table 9, $P < 0.01$)。

初期治療としての IVIG 治療の後、抗 GBM 抗体腎炎を合併していた 1 例のみ (症例 4) ステロイドパルス療法施行したが、他 7 例においては、比較的少量の経口ステロイド治療と最小限の cyclophosphamide で血管炎の病態を抑制できた。重篤な副作用の発現は認めなかった。

D.考察

各種血管炎に対する IVIg の報告は限られてはいるが一定の効果を見ている^{6) 7) 8) 9) 10) 11)} (Table 10)。その効果発現機序に 1) 免疫抑制の上昇、2) Fc レセプターのブロック、3) 補体調節、4) T 細胞機能調節、5) イディオタイプネットワークの調節などが挙げられている。ANCA 陽性の腎炎・血管炎における ANCA の病変への関与については議論のあるところであるが少なくとも一部の ANCA は病態活動性と連動しており、これらに対する IVIg のおそらく一部は抗イディオタイプ抗体としての抑制的な働きが期待される。

IVIg 治療は MPO-ANCA 関連腎炎・血管炎において免疫能を調整し、IVIg 後の従来の治療法の薬用量を抑え得る、有効な補助療法と考えられた。

E. 参考文献

- 1) Austin HA 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TA, Kullick ME, Klippel JH, Decker JL, Balow JE. Prognostic factors in lupus nephritis. Contribution of renal histologic data. *Am J Med.* 1983 Sep;75(3):382-91.
 - 2) Nieuwhof C, Kruytzer M, Frederiks P, van Breda Vriesman PJ. Chronicity index and mesangial IgG deposition are risk factors for hypertension and renal failure in early IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 1998 Jun;31(6):962-70.
 - 3) Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, Janssen BA, Pall A, Emery P, Savage C, Adu D. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM.* 1994 Nov;87(11):671-8.
 - 4) Suzuki K et al. Measurement of active phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes by fluorescence liberation from phagocytized microspheres. *J Leuko Biol* 1986; 39:475-88
 - 5) Suzuki K et al. Assay method for myeloperoxidase In human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biol* 1983; 132: 345-52
 - 6) Jayne DRW, Davies MJ, Fox CJV, Black CM, Lockwood CM: Treatment of systemic vasculitis with pooled intravenous immunoglobulin. *Lancet* 1991;337:1137-1139.
 - 7) Richter C, Schnabel A, Csernok K, Reinhold-Keller E, Gross WL: Treatment of Wegener's granulomatosis with intravenous immunoglobulin. *Adv Exp Med Biol* 1993;336:487-489.
 - 8) Jayne DR, Lockwood CM: Pooled intravenous immunoglobulin in the management of systemic vasculitis. *Adv Exp Med Biol* 1993;336:469-472
 - 9) Richter C, Schnabel A, Csernok E, De-Groot K, Reinhold-Keller E, Gross WL: Treatment of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis with high-dose intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Med Biol* 1993;336:469-472.
 - 10) Jayne DRW, Lockwood CM: Intravenous immunoglobulin as sole therapy for systemic vasculitis. *Br J Rheumatol* 1996;35:1150-1153.
 - 11) Levy Y, Sherer Y, George J, Langevitz P, Ahmed A, Bar-Dayyan Y, Fabbrizzi F, Terryberry J, Peter J, Shoenfeld Y: Serologic and clinical response to treatment of systemic vasculitis and associated autoimmune disease with intravenous immunoglobulin. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;119(3):231-238
- ## 2. ANCA 関連急速進行性腎炎患者に対するγグロブリン療法の効果(症例呈示)
- ### A. 研究目的
- 急速進行性糸球体腎炎の像を呈し、IVIg 治療前 Cre 8.4mg/dl と重篤な腎障害を来したが、IVIg 療法により腎機能低下の停止を認め、良好な治療経過を観察し、さらにこの療法による好中球機能の変化を経過を追って観察し得た症例を紹介する。
- ### B. 症例 : 64 才女性
- 主訴 : 高熱、食欲不振、咳

家族歴：特記事項無し

既往歴：特記事項無し

現病歴：平成 13 年 9 月中旬より発熱、喀痰を伴う咳、下腿浮腫を認めた。近医にて検査をうけ、尿蛋白、潜血強陽性であり、平成 13 年 10 月 2 日入院。CRP、ANCA の高値を認め、精査のため平成 13 年 10 月 31 日北野病院へ転院。

現症：身長、150cm。体重、52.0kg。血圧、138/82mmHg。体温 37.8℃。

両下肺野に coarse crackle を聴取する。両下肢に浮腫あり。

入院時検査所見(Table 11)：尿潜血+++、蛋白++、一日蛋白量 2.66g。

赤沈 118mm/hr.、Htc 24.8%、Hb 7.8 g/dl、WBC15400/ μ l、血小板 55.4 万/ μ l。フィブリノゲン 536mg/dl。GOT 16 IU/L、GPT 10 IU/L TP 6.5g/dl、Alb 2.8 g/dl、Cr 8.34 mg/dl、Ccr 6.0 ml/min、CRP15.4mg/dl、抗核抗体陽性、MPO-ANCA 276 U、PR-3ANCA<10 EU、抗 GBM 抗体 <10 EU。

胸部 X- P：右胸水貯留像。肺出血が疑われる左下肺野浸潤影。

腎エコー：右腎、113mm、左腎、105mm。表面平滑

腎生検所見(Fig.1)：26 個の糸球体を検査したが、全硬化に陥っている 5 個をのぞく 21 個のうち 17 個の糸球体に細胞性または細胞線維性半月体形成を認め(65.3%)、一部は壊死性病変を伴っていた。これらを取り巻く間質も細胞浸潤が強く、好中球、リンパ球ともに浸潤していた。間質衝動脈への明らかな血管炎所見は無かった。蛍光抗体法検査では明らかな免疫グロブリンや補体の沈着はなく、pauci-immune タイプの壊死性半月体形成性腎炎と診断した。

入院後経過 (Fig.2)：他院にて抗生剤を投与され、CRP はやや低下傾向を示していたが、高熱は持続し、腎機能は急速に低下し急速進行性糸球体腎炎像を呈し、北野病院入院時には Cre 8.34mg/dl と重篤な腎機能低下をきたしていた。腎生検施行、同日より IVIg 療法を施行すること

とし、乾燥スルホ化人免疫グロブリン G (献血ベニロン I) 400mg/kg/day を 5 日間投与した。これにより発熱、喀痰を中心とする自覚症状の改善のみならず、CRP は低下し始め、Cre 低下を認めた。その後、内服のステロイド (プレドニン 50mg/day) とエンドキサン 50mg/day の併用を行い、さらなる炎症反応の低下、腎機能の改善を得、MPO-ANCA13 EU の値で退院された。

IVIg 前後での好中球機能の変化を Table 12 に示す。

C. 考察

各種血管炎に対する IVIg の報告は限られてはいるが一定の効果を見ている。その効果発現機序に 1) 免疫抑制の上昇、2) Fc レセプターのブロック、3) 補体調節、4) T 細胞機能調節、5) イディオタイプネットワークの調節などが挙げられている。ANCA 陽性の腎炎・血管炎における ANCA の病変への関与については議論のあるところであるが少なくとも一部の ANCA は病態活動性と連動しており、これらに対する IVIg のおそらく一部は抗イディオタイプ抗体としての抑制的な働きが期待される。

本症例では IVIg 後の炎症反応の低下は明らかで、同時に急速に進行していた腎機能の悪化も停止した。本症例は ANCA を伴う急速進行型腎炎の典型例であり、通常 60%以上の細胞性半月体形成を伴っている例では腎不全へ進展する確率はきわめて高い。又、喀血など肺病変も合併しており、生命予後も悪いことが多い。本症例で強力な免疫抑制療法の前に IVIg を行うことにより炎症反応の改善を導入できることは IVIg の種々の免疫修飾作用の結果と考えられる。IVIg の施行によりそれ以後の免疫抑制療法の副作用が軽減されることもあり、試みられるべき療法と考えられる。

D. 結論

免疫抑制剤の使用困難な ANCA 陽性半月体腎炎・血管炎にたいし、IVIg は試みるべき療法の

一つと考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 猪原登志子、武田敏也、陶山勝郎、小野孝彦、武曾恵理、篠山重威、橋本ゆき、大川原明子、鈴木和男：糸球体腎炎における好中球機能についての検討。Pharma Medica 2001,19(4):97-98.

2. 学会発表

1) Toshiko Ito-Ihara, Takahiko Ono, Eri Muso, Toshiaki Matsuoka, Akiko.Ishida-Okawara, Yuki.Hashimoto, Kazuo.Suzuki: Treatment of ANCA associated glomerulonephritis with intravenous gammaglobulin ---effect on the neutrophil function. Workshop on Dysfunction of Host-Defense, 22-25 March 2001, Chiba, Japan.

2) 猪原登志子、渡邊壽規、三宅あかり、小林いけい、野村啓子、渡部仁美、草野仁、野垣文昭、陶山勝郎、小野孝彦、鈴木和男、武曾恵理、：経静脈的γグロブリン療法 (IVIg) が効果的であった ANCA 関連糸球体腎炎の一症例。第 31 回京都腎臓免疫研究会 平成 13 年 5 月 12 日、京都

3) 猪原登志子、小野孝彦、武曾恵理、篠山重威、大山敦嗣、八城正知：透析導入後に確定診断あるいは発症した ANCA 関連血管炎症候群の 4 症例。第 46 回日本透析医学会学術集会・総会 平成 13 年 6 月 24 日、大阪。

4) 猪原登志子、渡邊壽規、三宅あかり、小林いけい、野村啓子、草野仁、野垣文昭、小野孝彦、武曾恵理：経静脈的γグロブリン療法 (IVIg) が効果的と思われた ANCA 関連急速進行性腎炎の一症例。第 31 回日本腎臓学会西部学術大会 平成 13 年 10 月 6 日、金沢。

5) 猪原登志子、五味美智子、山本聡、米本智美、鈴木和男、武曾恵理：経静脈的γグロブリン療法 (IVIg) が効果的であった ANCA 関連血管炎の一症例。第 7 回 MPO 研究会 平成 13 年 10 月 13 日～14 日、横浜。

F.健康危険情報

なし

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1

Patients

No.	age/sex	Histological diagnosis	AI (max. 16)	CI (max. 15)	ANCA(titer, EU)
1	82/F	CrGN	10	3	MPO (239)
2	75/M	MPN recurrence	5	11	MPO (636)
3	77/M	MPGN, MPN	7	4	MPO (25)
4	65/M	CrGN, anti-GBM GN	8	6	MPO (80)
5	61/F	MPN, CrGN	14	6	MPO (244)
6	82/M	MPN, CrGN	11	10	MPO (159)
7	64/F	CrGN	11	8	MPO (269)
8	84/F	CrGN	11	3	MPO (69)

MPN, microscopic polyangiitis; CrGN, crescentic glomerulonephritis;
MPGN, membranoproliferative glomerulonephritis; GBM, glomerular basement membrane

Table 2

ACTIVITY INDEX (AI)

1. Glomerular cell proliferation	3. Ratio of interstitial mononuclear infiltration
0= no	0= no
1= mild	1= mild
2= moderate	2= moderate
3= severe	3= severe
2. Ratio of cellular and fibrocellular crescent	4. Vasculitis
0= 0%	0= no
1= 0 to 20%	1= cell infiltration
2= 20 to 50%	2= necrotizing vasculitis
3= >50%	

Cellular crescent scores were multiplied by 2.
Vasculitis scores were multiplied by 2.
The maximum activity index amounted to 16.

Austin H et.al. *Am J Med* 1983;75:382-391

Table 3

CHRONICITY INDEX (CI)

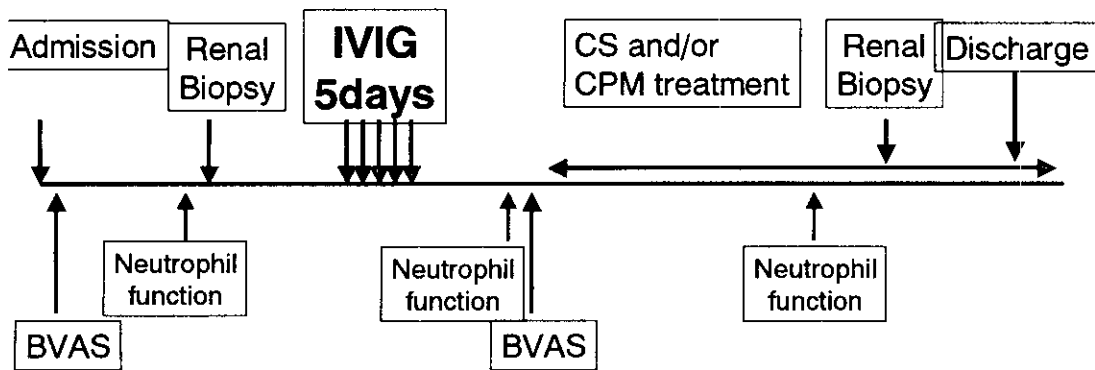
<p>1. Matrix expansion</p> <p>0= no 1= mild 2= moderate 3= svere</p> <p>2. Ratio of fibrous crescent</p> <p>0= 0% 1= 0 to 20% 2= 20 to 50% 3= >50%</p>	<p>3. Ratio of tubulointerstitial change</p> <p>0= no 1= mild 2= moderate 3= severe</p> <p>4. Ratio of global sclerosis</p> <p>0= 0% 1= 0 to 20% 2= 20 to 50% 3= >50%</p>
---	--

Fibrous crescent scores were multiplied by 2
The maximum chronicity index amounted to 15.

Austin H et.al. *Am J Med* 1983;75:382-391

Table 4

IVIG treatment protocol



IVIG, intravenous immunoglobulin (400mg/kg/day)

BVAS, Birmingham vasculitis activity score

CS, oral corticosteroids; CPM, cyclophosphamide

Table 5

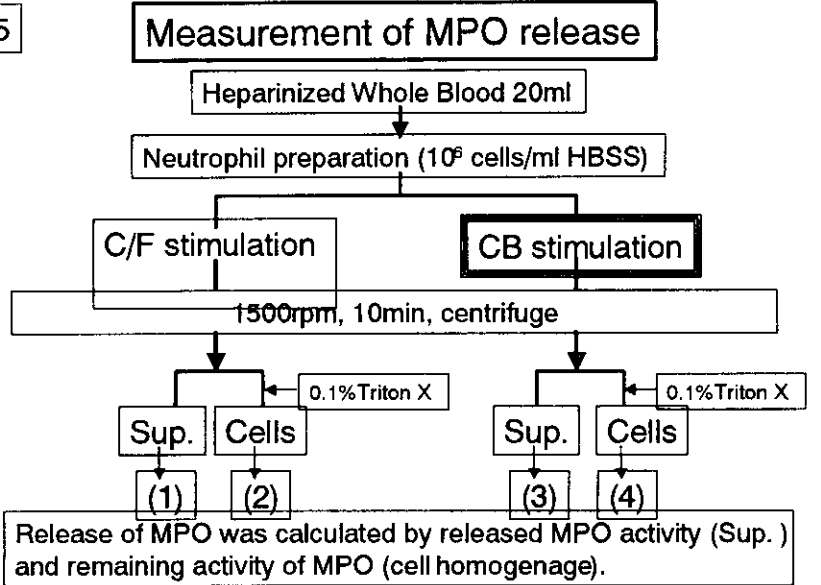
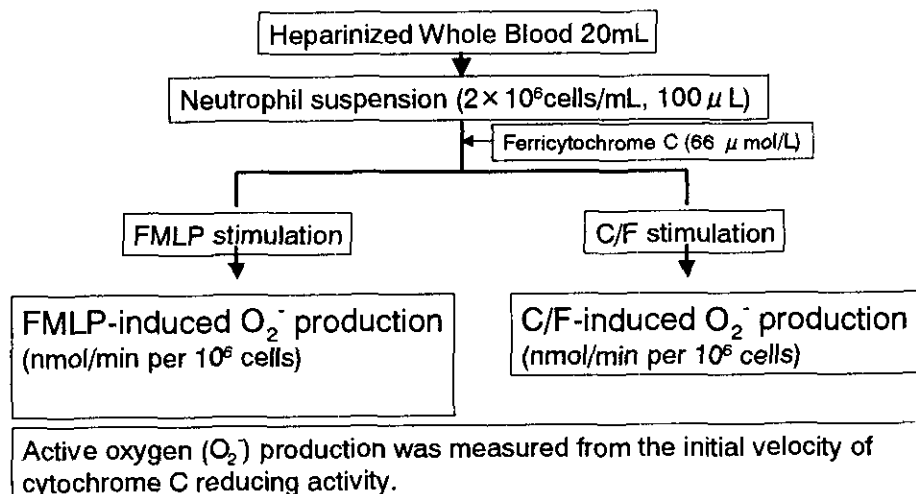


Table 7

Measurement of O₂⁻ production



FMLP: formylmethionylleucylphenylalanine, CB: Cytochalasin B, C/F: CB(5 μg/mL) and FMLP(10⁻⁶ mol/L)

Table 8

Clinical response to IVIG

Patient number	Organ involvement before IVIG	Organ manifestations responsive to IVIG		BVAS before / after IVIG(max 63)	Treatment after IVIG
		Partial improvement	Complete remission		
1	S,F,E,L,K	CRP, K	S,F,E,L	17/12	CS(20mg) CPM
2	S,F,A,C,L,K,P	CRP, K	S,F,A,P	25/21	CS(40mg) CPM
3	S,F,A,L,K	CRP, K	S,A	19/17	CS(60mg)
4	S,F,A,C,K,P	CRP, S		26/24	Pulse, PE, CS (60mg), CPM
5	S,F, K	K,F	S	15/ 9	CS(50mg)
6	S,A,K	CRP,	S,A	12/12	CS(25mg)
7	S,F,L,K	CRP, K,L	S,F	19/12	CS(50mg) CPM
8	S,F,A,K	CRP, K	S,F	14/ 8	CS(50mg)

S, systemic symptoms; F, fever; A, arthritis/ arthralgia; C, cutaneous; M/Ey, mucous membranes/ eyes; E, ENT; L, lung; K, kidney; P, polyneuropathy; pulse, intravenous corticosteroids; CS, oral corticosteroids ; PE, plasma exchange; CPM, cyclophosphamide

Table 9

BVAS before and after IVIG

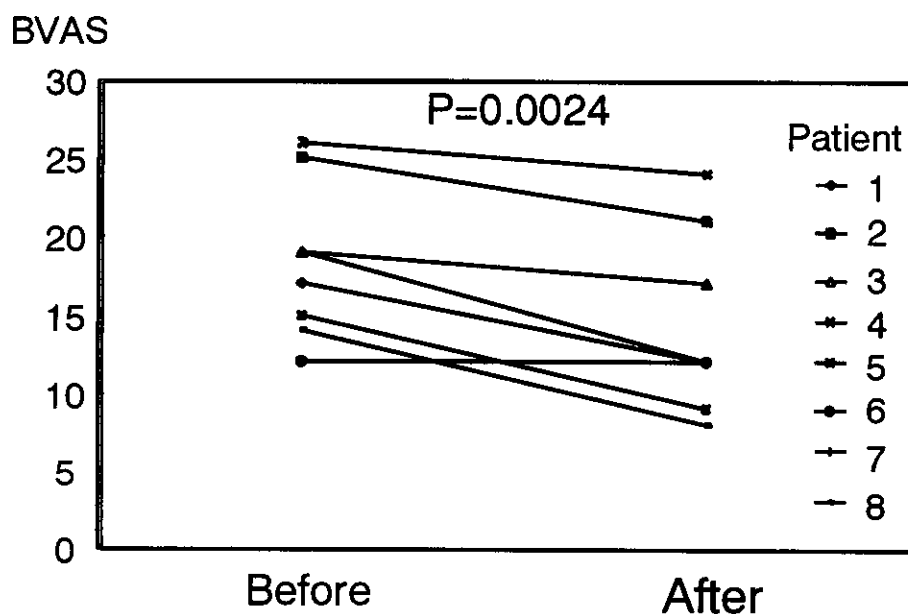


Table 10 Review of the literature about IVIg treatment in vasculitis

Reference	Patients (n)	Diagnosis (no. of patients)	IVIg courses	Response rate %
Jayne et al.(1991)	7	WG(4),MPA(2), RV(1)	1	100
Richter et al.(1993)	9	WG(8), systemic P-ANCA-associated vasculitis(1)	1	55
Jayne and Lockwood(1993)	26	WG(14),MPA(11), RV(1)	1	100
Finkel et al.(1994)	3	Parvovirus B19-associated PAN(2),WG(1)	1-multiple	100
Richter et al.(1995)	15	WG(14), systemic P-ANCA-associated vasculitis(1)	1-3	40
Jayne and Lockwood(1996)	6	WG(3),MPA(3)	1	100
Levy et al.(1999)	10	WG(2), CSV(11), livedo vasculitis(1), other(4)	1-6	60
Our study (2000-2001)	8	P-ANCA associated GN (7) P-ANCA+anti GBM Antibody associated GN (1)	1-2	100

MPA= Microscopic polyarteritis, WG= Wegener's granulomatosis, GN=glomerulonephritis
RV=Rheumatoid vasculitis, PAN= Polyarteritis nodosa, CSV= Churg-Strauss vasculitis

Table 11 **Laboratory data (64y.o.woman)**

Peripheral blood		Blood chemistry		ESR	1hr.	118mm
WBC	15.4 × 10 ⁹ /l	GOT	16 IU/l	Serological study		
with differential count		GPT	10 IU/l	CRP	15.4 mg/dl	
Nt	84.5 %	LDH	447 IU/l	IgG	1672 mg/dl	
Ly	10.3 %	ALP	240 IU/l	IgA	421 mg/dl	
Mo	3.9 %	T-Bil	0.2 mg/dl	IgM	22 mg/dl	
Eo	1.0 %	TP	6.5 g/dl	IgE	191.5 U/ml	
Ba	0.3 %	ALB	2.8 g/dl	RF	<5.0 IU/ml	
RBC	2.86 × 10 ¹² /l	CRE	8.34 mg/dl	ANA (-)		
Hb	7.8 g/dl	UA	11.2 mg/dl	C3	116 mg/dl	
Ht	24.8 %	BUN	68.9 mg/dl	C4	37 mg/dl	
Plt	554 × 10 ⁹ /l	K	3.7 mEq/l	CH50	44 U/ml	
Coagulation		Renal Function		MPO-ANCA	276 EU	
PT	13.5 sec	Ccr	6.0 ml/min	PR 3-ANCA	<10 EU	
APTT	30.8 sec	Urinalysis		anti-GBM Ab	<10 EU	
Fib	536 mg/dl	Occult Blood	(+++)	HBs Ag	-	
sD-dimer	41.2 ug/ml	Protein	(++)	HBe Ag	-	
		Sugar	(±)	HBs Ab	-	
		Protein	2.66 g/day	Hbe Ab	-	
				HCV Ab	-	

Fig.1 Renal Biopsy (Nov. 11th, 2001) Patient 7 (64 y.o.woman)

