

20021048

厚生労働科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

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-医薬-012)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

鈴木 和 男

平成15（2003）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. 分担研究報告

1. 臨床研究班

1) MPO-ANCA 関連急速進行糸球体腎炎における静脈的ガンマグロブリン療法 (Intravenous immunoglobulin: IVIg) 臨床的効果の検討

武曾恵理（北野病院腎臓内科）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11

2) 川崎病におけるガンマグロブリン治療の現況と人工化への期待

岡崎富男（広島市民病院）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21

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

新井孝夫（東京理科大学理工学部）

佐々木次雄（国立感染症研究所細菌第二部）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25

2) 分子構造解析による人工グロブリン作製へアプローチ

田之倉優（東京大学大学院農学生命科学研究科）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29

3. 治療評価モデル動物班

1) 血管炎治療評価を行うための諸条件の検討：

C. albicans Water Soluble Polysaccharide Fraction (CAWS)による

マウス系統的血管炎誘発モデル

高橋 啓（東邦大学医学部附属大橋病院）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39

2) 血管炎治療評価を行うための諸条件の検討：

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

大川原明子（国立感染症研究所生物活性物質部）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41

3) 血管炎治療評価を行うための諸条件の検討：

真菌由来多糖による血管炎誘発機構の解析

大野尚仁（東京薬科大学薬学部）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47

4) 炎症疾患治療評価を行うための諸条件の検討：

炎症性腸疾患発症機構解明のためのミエロペルオキシダーゼ欠損マウス

の利用に関する研究

荒谷康昭（横浜市立大学木原生物学研究所）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 53

Ⅲ. 公開シンポジウム資料 及び研究成果の刊行に関する一覧表	57
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	81

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
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. 臨床研究班

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・院長

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

荒谷 康昭 横浜市立大学木原生物学研究所・助教授

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

3. 治療評価モデル動物班

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

大川原明子 国立感染症研究所生物活性物質部・研究員

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

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）

David Jayne（英国ケンブリッジ大学）

研究要旨

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。系統的血管炎である川崎病では、その治療としてステロイドパルスからガンマグロブリン製剤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。さらに、その治療方法も工夫され、400 mg/Kg 5日間投与から2g/Kg 単回投与にするなど、より有効性の高い治療法が導入されている。一方、高齢者に多い川崎病以外の血管炎は、高齢であることやステロイドにリスクがあることから、その軽減が要望されている。すでに、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行われ、好成績を得ている。そこで、本研究においては、目的の一つとして、MPO(myeloperoxidase)-ANCA 関連血管炎において globulin 治療を実施することであった。そこで、昨年度、本年度の実施した結果、有効であることを認めた。しかし、川崎病や血管炎をはじめ、難治性疾患に有用なガンマグロブリンは、血漿由来の血液製剤であり、その安全性や副作用、不応答などの問題を抱えており、治療に有効な人工 globulin の開発は、急務である。また、治癒機転の解明も必須である。そこで、本研究では、人工化 globulin に評価用血管炎モデル動物を作製し、globulin 治療の有効性の検討、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、IVIg の臨床成績を得ることと並んで重要課題として位置付けた。これまでに、Fv および Full ガンマグロブリン作製の方法を確立した。さらに、治療効果を評価するモデルマウスのおよび *in vitro* の評価系を確立した。

A. 研究背景と目的

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、もっぱら、ステロイドパルスなどによっているため、高齢者には危険性が高い大量ステロイ

ドパルスから、新たな治療法の開発が強く望まれていた。そこで、これまで、われわれの研究班では、自己免疫疾患 MPO(myeloperoxidase)-ANCA 関連血管炎の治療として、大量ガンマグロブリン静注治療(IVIg)の導入を検討し、その有効性を確認しつつ、人工 globulin の開発を目標としてきた。したがって、本研究では、初年度から、血管炎 IVIg 治療の成績を検討しつつ、その治療用の人工 globulin ライブラリーを作製すること、あわせて、モデルマ

ウスの作製を目的としてきた。すなわち、本研究において、これまでに、MPO-KO マウスを用いて、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。

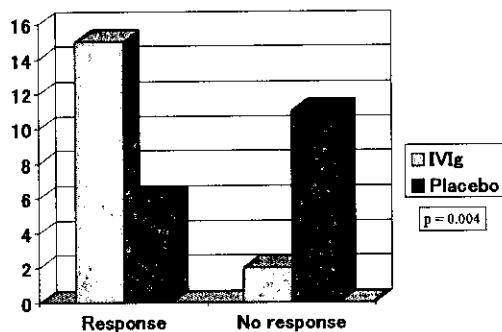


図 1. ヨーロッパでの IVIg 治療成績

Response at 3 months

50% fall in BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score).

一方、国際的な視点から見ると、「国際 ANCA ワークショップ」などの国際的な研究交流が進展しており、すでに IVIg による治療試験が開始され、治癒機転は不明ではあるが良好であると報告されている。IVIg による血管炎治療は、ヨーロッパの治療試験は、好成績であった（図 1）。国内でも、川崎病と同じプロトコルにより、13 例の血管炎・腎炎における IVIg 治療による臨床好成績を得ている（Ito-Ihara et al. Cleveland Clin. J. Med. Suppl. 69: SII-188, 2002.）。しかし、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 IVIg 治療が求められている。また、血管患者は高齢者であることから、ガンマグロブリン治療により、ステロイド投与量を少なくし、その危険性の軽減と透析回避による医療経済の軽減化が期待できる。一方、ガンマグロブリンの需要は増えつづけており、人工化することが今日的急務となっている。また、治療評価用のモデルマウスや *in vitro* での評価系も確立臨床応用には不可欠である。さらに、人工型は、血漿由来の自然型よりも、はるかに安全で、副作用の少ない安価な血管炎治療法として確立できる。このことはもとより、他の同様な自己免疫疾患の治療法への応用も視野にいれることは可能であり、国民の保健・医療ならびに医療経済に役立つことから大きな期待が寄せられている。また、ヨーロッパグループからも要望がきている。

一方、血管炎治療に対して IVIg は、いまでもその治癒機転は明確ではないものの、川崎病など治療法として不可欠になっている対応疾患もあるのも事実である。本治療法を、難治性血管炎の治療法として導入する要因として、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。これまで、主任研究者らは、MPO-ANCA 関連血管炎の病因の解明に関して研究してきた。具体的には、MPO-ANCA 関連血管炎患者血清中に存在する自己抗体の病因性エピトープを同定してきた。また、自己抗体産生の血管炎モデルマウス（川崎病および腎炎）による病因を分子レベルで検討してきた。これらの疾患は、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)。

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、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、SCG/Kj、IRF-8/ICSBP マウスおよび *Candida albicans* 由来物質 CADS/CAWS 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 MPO-ANCA 産生に必須であることを解明

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。また、人工グロブリンの治療検討するため、予備的に IVIg 治療をマウスに施行し、血管炎が減少することを認めている。

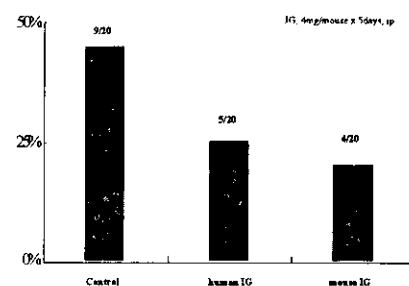


図2. CADS 誘導冠状動脈炎疾患モデルマウスへの IVIg 治療の予備的検討

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。、上述したように、MPO-ANCA 産生モデルマウスを評価系として利用できる様にした。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るとともに、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準備を整えることが本研究の主目的である。

B. 研究結果

最終年度の3年度の研究としての成果は、目標どおり得られた。各、項目別の成果をの概要を以下に記す。

1. 臨床研究班

1) MPO-ANCA 関連急速進行糸球体腎炎における免疫グロブリン大量静注(IVIg)療法の臨床的効果の検討 (武曾恵理)

我が国の高齢化に伴い近年発症が増加し、急速進行性腎炎をきたすMPO-ANCA関連腎炎血管炎へのIVIg療法の効果を13例の高齢者症例で検討した。いずれの症例もIVIg治療のみで急速に解熱、CRPの改善、BVASスコアの低下を優位に認め、腎機能の進行の阻止が可能であった。また、血中炎症性サイトカインの低下を有意にみとめ、このことが本療法の効果発現機序の一端をになっていると考えた。IVIg後のステロイドを含む免疫抑制療法は少量でも寛解に入る例が多く、又再発例はほとんどなかった。更に十篤な感染症の副作用もなく、本療法が多くの合併疾患を抱えた高齢者の免疫能を

低下させることなく、治療を安全に進行させる有力な補助療法となりうることを示唆した。プロトコールを決めたランダム化コントロール試験の有力な動機付けとなる検討ができ、多くの血管炎への安全なグロブリン療法の施行のために人工グロブリンの開発が不可欠の状況である。

2) 川崎病における、IVIg療法の現況
(岡崎富男)

川崎病は系統的血管炎であり、とくに冠動脈障害が最大の問題である。1984年に古庄らにより提唱された、IVIg療法は現在では、世界の治療の主流になっており、2g/Kg単回大量療法の血管炎抑制効果は、他の治療法に比し著明である。しかし、IVIg療法に不応である症例も10~20%存在し、IVIgの投与日、投与量や投与方法において更に、検討を要する。不応例に対してIVIgの追加投与、ウリナスタチンやステロイド剤などの併用、さらに血漿交換療法などが行われているが、その効果については、結論は出ていない。また、IVIgの作用機序についても解明されておらず、今後川崎病の病因の究明とともに、ガンマグロブリンの人工化を視野に入れた更なる研究が必要である。

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（新井孝夫、佐々木次雄）

これまでに、MPO ノックアウトマウスにマウス MPO を投与して、抗体の mRNA のライブラリーは作製している。一方、MPO ノックアウトマウスにマウス MPO を免役し、抗 MPO モノクローナル抗体を作製した。MPO に対する親和性の高かった 8 種類の抗体、15-3-12A、16-2-12H、17-3-4C、17-3-12G、17-6-5B、17-6-6C、18-1-7C、18-7-5C について調べたところ、これらの抗体すべてが MPO 活性を阻害した。このことは、MPO ノックアウトマウスから得られるモノクローナル抗体のエピトープが活性部位近傍に限定されている可能性を示している。また、これら 8 種類の抗体のクラスはすべて IgM であった。以上のことは、MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効なモノクローナル抗体作製に、MPO ノックアウトマウスを用いることの是非を評価する際に重要な鍵になると思われる。

2) 分子構造解析による人工グロブリン作製へアプローチ（田之倉 優）

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を比較することにより特定した MPO 上の MPO-ANCA の結合部位をもとに望ましいブロック抗体の結合様式を推定した。MPO-ANCA が結合する部位の中で、MPO の活性中心から離れている α ヘリックス領域にブロック抗体が結合することで、MPO の機能を損なわずに MPO-ANCA の結合を抑制できると考えられる。

3. 治療評価モデル動物班

1) 血管炎治療評価を行うための諸条件の検討：CAWS によるマウス系統的血管炎誘発モデル（高橋 啓）

人工グロブリンも含め、IVIg の実験的治療実験を行うにあたり、*C. albicans* Water Soluble Polysaccharide Fraction (CAWS) によるマウス系統的血管炎惹起モデルを用いた評価を行う上での至適条件を検討することを目的とし、投与量、投与回数、屠殺時期などについて従来の方法から変更し血管炎発生頻度、組織像を比較した。その結果、CAWS 1 回あるいは 2 回投与のみでは高頻度に血管炎を得ることは困難であった。一方、5 日連続投与すると血管炎の発生頻度は著しく上昇し、投与後 4 週屠殺群が最も個体差が少なく安定した組織像が得られることが判明した。また、予備的な IVIg 治療に

より血管炎は、約50%に低下した。

2) 血管炎治療評価を行うための諸条件の検討：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（大川原明子、鈴木和男）

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は必須である。MPO-ANCA 関連血管炎モデルマウスの血清中MPO-ANCA 産生について、また、その対応分子であるMPO (myeloperoxidase) の性状、好中球機能を解析することは重要である。本研究では、マウスにCAWSを接種することによって冠状動脈炎を誘発するモデルを用いて好中球機能の解析を行い、冠状動脈炎発症における活性化好中球の役割について検討した。その結果、CAWS投与直後に末梢好中球数は、増加し、しかも活性化状態になっており、血管炎発症との関連が示唆されている。グロブリン治療において、活性化好中球の状態を指標とした評価系として有用であると考えられる。

3) 血管炎治療評価を行うための諸条件の検討：真菌由来多糖による血管炎誘発機構の解析（大野尚仁）

Candida albicans のアルカリ抽出物 (CADS) をマウスに腹腔内投与すると、冠状動脈炎を誘発することが報告されている。

これまでに、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をマウスに接種することで、高率に冠状動脈血管炎の発症を起こすことができること、またその血管炎誘発活性はマウスの系統によって感受性が異なり、CBA/Jマウスは抵抗性を示すが、DBA/2マウスに対しては高率（100%）に重度の血管炎を発症させることが明らかとなっている。今年度はさらに、冠状動脈炎を発症したDBA/2マウスが致死を示すことを見出し、その組織所見から心筋梗塞により死亡している可能性が示唆された。また、血管炎誘発の機序を解析するために、血管炎発症に感受性の異なるDBA/2、C3H/HeN、C57BL/6、CBA/Jの4系統のマウスを用いて比較検討した。CAWSを投与したマウスのうち、血管炎を発症するDBA/2やC3H/HeNでは脾腫が観察された。また、その脾臓細胞の二次応答を観察したところ、血管炎を発症するDBA/2、C3H/HeN、C57BL/6では同様なサイトカイン産生を示し、特にDBA/2でIL-6、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β などが亢進した。

一方、血管炎誘発に抵抗性のCBA/Jはこれとは異なり、IL-10産生が高かった。また、マウス血清中の抗CAWS抗体は、全ての系統で産生されており、最も多かったのはIgG、次いでIgMであった。IgEはほとんど検出されなかった。IgG1とIgG2aのサブタイプについて検討したところ、IgG1はどの系統で

も産生されていたが、IgG2a は CBA/J で他に比べ最も抗体価が低かった。これらのことより、マウス系統によって CAWS に対し異なる応答性が存在することが明らかとなり、CBA/J の結果より IL-10 あるいは Th2 応答が血管炎の発症において重要である可能性が示された。また、これらの指標は、IVIg 治療の評価系として極めて重要であることが示唆された。

4) 炎症疾患治療評価を行うための諸条件の検討：炎症性腸疾患発症機構解明のためのミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの利用に関する研究（荒谷康昭）

MPO は、好中球と単球に存在する活性酸素の代謝酵素であり、過酸化水素と塩素イオンから次亜塩素酸が生成される反応を触媒する。潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患では、患者の末梢白血球から活性酸素の過剰産生が認められることや、白血球除去療法がしばしば有効であることなどから、白血球由来の活性酸素がこの疾患に関与している可能性がある。本研究は、MPO ノックアウトマウスを用いて、炎症性腸疾患における MPO の関与を検討した。マウスに dextran sulfate sodium を経口投与して実験的大腸炎を発症させたところ、MPO ノックアウトマウスの生存は野生型マウスよりも短縮した。さらに、MPO ノックアウトマウスの大腸粘膜層への細胞浸潤や胚細胞の喪失は、野生型

マウスのものよりも早期に観察された。すなわち、MPO が欠損することによって実験的大腸炎が促されることが判明した。本系も炎症における IVIg 治療の評価系として使用できる可能性が示唆された。

E. 結論

当初計画で、指摘されたこともあり、まず、IVIg による臨床成績を得ることに全力投球した。また、ヨーロッパの IVIg 治療グループ(EUVAS)とも友好関係を積極的に持つことを計画し、EUVAS メンバーから種々アドバイスを受けながら、臨床研究に臨んだ。その結果、13例全例で好成績を得た。主に、腎炎を中心に IVIg 治療を実施した。本治療は、腎炎の場合、透析治療に比して、医療経済からも有用であると指摘された。また、長年、川崎病研究についても主任者や分担者は、検討してきたことから、川崎病の IVIg 治療のまとめについての情報を得て整理した。現在、IVIg の不応例が問題になっているものの、川崎病では、IVIg 治療以外の方法は、難しい状況であることが結論されている。一方、これまで、MPO-KO マウスを使って、人工グロブリンのライブラリが完成しており、また、同マウスの系を使った、種々の治療用のモノクローナル抗体を作製できた。評価系として重要な、疾患モデルが2

系統完成し、その病態を利用して、治療実験することが可能になった。

以上の様に、グロブリンの人工化は、ライブラリ作製にとどめざるを得なかったが、臨床、抗体作製、評価モデル動物の一連の計画が予定どおり進行し、十分な成果が得られた。そこで、平成14年10月19日に開催した公開シンポジウム「血管炎の発症機構解析とその治療：IVIg 治療をめぐって」（京都大学）では、国民的関心が高く、多くの大学病院、臨床家、製薬会社の開発部門からの参加があった。これで、IVIg 治療が臨床試験へむけた準備が整った。また、これを受けて、人工化へ向けた本格的な研究がスタートできる状況になった。

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

MPO-ANCA 関連急速進行糸球体腎炎における静脈的ガンマグロブリン療法（Intravenous immunoglobulin: IVIg）臨床的効果の検討

分担研究者 武曾恵理 北野病院腎臓内科・部長

研究協力者 小野孝彦、猪原登志子 京都大学大学院医学研究科循環病態学講座

研究要旨

我が国の高齢化に伴い近年発症が増加し、急速進行性腎炎をきたす MPO-ANCA 関連腎炎血管炎への IVIg 療法の効果を 13 例の高齢者症例で検討した。いずれの症例も IVIg 治療のみで急速に解熱、CRP の改善、BVAS スコアの低下を優位に認め、腎機能の進行の阻止が可能であった。また、血中炎症性サイトカインの低下を有意にみとめ、このことが本療法の効果発現機序の一端をになっていると考えた。IVIg 後のステロイドを含む免疫抑制療法は少量でも寛解に入る例が多く、又再発例はほとんどなかった。更に十篤な感染症の副作用もなく、本療法が多く合併疾患を抱えた高齢者の免疫能を低下させることなく、治療を安全に進行させる有力な補助療法となりうることを示唆した。プロトコールを決めたランダム化コントロール試験の有力な動機付けとなる検討ができ、多くの血管炎への安全なグロブリン療法の施行のために人工グロブリンの開発の意義が更に深まった。

A. 研究目的

Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) 陽性の急速進行性糸球体腎炎・血管炎症候群は発症後急速に腎機能が低下するとともに血管炎に伴う腎外の全身兆候が発現することにより重篤な経過をたどる疾患であり、治療には初期から大量ステロイド療法を含む強力な免疫抑制療法が必要となる。ANCA の代表的な対応抗原は Proteinase 3 (PR3) と Myeloperoxidase (MPO) であり、それぞれ PR-3-ANCA は Wegener 肉芽腫症(WG)、MPO-ANCA は MPO-ANCA 関連半月体形成性糸球体腎炎・血管炎患者の血清中に認められ、病態との関連が示唆されている。本邦では Wegener 肉芽腫症に

比べ、MPO-ANCA 関連腎炎・血管炎症候群の発症率が高く、より高齢者に発症する。高齢者の MPO-ANCA 関連腎炎・血管炎患者の治療を行う場合、免疫抑制による重篤な感染症を発症しやすいことが最も大きな問題点となることと、免疫抑制療法を行っていくくするより多くの既存の全身性合併症を持っている確立が高く、免疫抑制療法施行には慎重な適応が検討される。このため、新たな治療の確立が急務であると考えられる。

経静脈的ガンマグロブリン療法は中動脈の血管炎を病態の主体とする川崎病で広く使われており、川崎病における血管炎への有効性が確立している。また、そのほかに

も自己免疫性血小板減少性紫斑病や神経免疫疾患であるギランバレー症候群 (GBS) や慢性脱髄性多発根神経炎などにおいても有効性が確認され広く使用されている。また、多発性筋炎や自己免疫性心筋炎においてもその有用性が報告されている。今回我々は高齢者の MPO-ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎においてもIVIgが有効であるかどうかを検討するために、導入期治療としてIVIg治療を行い、その臨床的効果を判定した。

B. 研究方法

1. 症例

京都大学附属病院と北野病院において、2001年1月から2002年12月までに入院した13人のANCA関連血管炎症例。13例ともMPO-ANCA陽性であった (Table 1)。

2. 方法

組織学的評価

治療前に腎生検を行って、組織学的に半月体形成性腎炎あるいは腎の血管炎の存在を確認した。腎生検所見より活動性半月体形成率を算出した。腎生検で得られた糸球体のうち、管外性病変として半月体を形成していた糸球体の個数を計測。半月体は形態学的に細胞性、細胞線維性、線維性半月体に分類し、全系球体数に占める細胞性と細胞線維性半月体数の割合を活動性半月体の割合とした。

血管炎活動性の評価

入院時に Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS)⁽¹⁾を用いて全身状態から血管炎の活動性を評価した。また C-reactive protein (CRP)で炎症の程度を評価。IVIg治療後、次のステロイド治療開始前に再度

BVAS, CRP を評価した。

急速進行性腎障害の評価 : Rate of reciprocal creatinine (1/Cre)⁽²⁾

腎機能低下の程度を評価するために、初発症状出現時を Time 0 [T0]とし、近医初診時の血清クレアチニン値を Cre1 at time 1 [T1]、内科入院時を Cre2 at time 2 [T2]、腎臓内科転科時を Cre3 at time 3 [T3]、IVIg治療開始直前を Cre 4 at time 4 [T4]、IVIg治療後でステロイドを含む免疫抑制剤投与前を Cre 5 at time 5 [T5]とした。時間経過は日 (day) の単位を使用した。治療前の rate of 1/Cre は $(1/Cre4-1/Cre1)/(T4-T1)$ または $(1/Cre3-1/Cre1)/(T3-T1)$ または $(1/Cre2-1/Cre1)/(T2-T1)$ のうち最も値の大きなものを採用し、治療後は $(1/Cre5-1/Cre4)/(T5-T4)$ で評価し、治療前と治療後の rate of 1/Cre を比較した。

治療方法

初期治療として乾燥スルホ化ヒト免疫グロブリン(献血ベニロン-I, 帝人株式会社, 日本) 400mg/kg/day を用いて5日間のIVIg治療を行った。その後、BVAS, CRP, rate of 1/Cre を評価後に後療法としてステロイド治療あるいはその他の免疫抑制療法を施行した。IVIg終了からステロイド治療までの間は平均6.8日(0-17日, n=13)であった。

各種サイトカイン測定

10例における治療前と、IVIg治療後でステロイド投与前までの間に患者血漿を採取しTNF- α , IL-6, IL-8を測定した。健常人12例の平均 \pm 2SDを正常範囲内と考えた。使用したサイトカインキットは次のとおりである。Biosource international, California, USA; Human tumor necrosis factor-alpha UltraSensitive (hTNF- α US) ELISA kit, human Interleukin-6 UltraSensitive (hIL-6

US) ELISA kit, human Interleukin-8 UltraSensitive (hIL-8 US) ELISA kit.

C. 研究結果

患者背景を(Table 1)に示す。13例の患者の年齢は72±10歳、男性7名、女性6名であった。症例1はB型肝炎ウイルスのキャリアーであり、ステロイド大量投与後減量中に生ずるウイルス再増殖が懸念された。また、症例9は既往に気管支拡張症があり、治療前にアスペルギルス抗原が喀痰より検出された。

IVIg治療により、BVASは有意に低下(治療前19.538±4.576対治療後16.538±4.684; p=0.0001, Figure 1A)、血清CRP値の有意な低下も認めた(治療前9.90±6.37対治療後6.32±5.05 mg/dl; p=0.0007, Figure 1B)。腎機能低下を評価するための1/Creの変化率は治療前-0.0406±0.0615 dL/mg/dayであったのに対し、治療後0.0071±0.0178 dL/mg/dayと増加し、有意な改善が認められた(p<0.05, Figure 1C)。

治療反応性のまとめとその後の治療経過をTable 2に示す。3例の患者でメチルプレドニゾロンのパルス療法を必要としたが、その後に引き続く比較的低容量の経口ステロイド療法と経口サイクロフォスファミドの投与により、良好な3ヶ月予後を得ている。1例のみ維持血液透析に至ったものの、他の例では血液透析なく経過。また3ヶ月間における重症感染症の発症や血管炎の再発はなかった。

サイトカイン結果 (Figure 2)

IVIg治療後、TNF-αは治療前と比較し、有意に低下した (before IVIg 3.97±2.73 vs after IVIg 2.16±1.68 pg/ml, n=10, p=0.0156,

Figure 2A)。IVIg治療後IL-6は治療前と比較し、低下したが統計学的有意差はなかった (before IVIg 2.54±4.60 vs after IVIg 1.02±1.23 pg/ml, n=10, Fig.2B)。治療前に高値を示した患者ではIL-8の劇的な低下が観察された (before IVIg 0.56±1.56 vs after IVIg 0.04±0.02 pg/ml, n=10, Fig. 2C)。

D. 考察

今回IVIgを施行した13例のANCA関連腎炎血管炎症例は高齢者が多く、しかも急速進行性の腎機能低下を示しており、全身状態もきわめて不良であったが、IVIgのみで、発熱を含む全身症状の完全寛解がただちに13例中11例で得られ、またCRPや尿所見の改善および腎機能低下の進行も阻止もほぼ全例で認められた。これらは血管炎の活動性を評価するBVASの有意な低下というかたちで示され、患者のQOLの改善が得られた事をあらわしている。このIVIgの短期効果については、以下のような機序が考えられている。1)IVIgが流血中の自己抗体を中和する機序³⁾や、2)FcγRと抗体依存性細胞障害の抑制や、3)natural killer cell functionの調整⁴⁾、4)抗体産生の抑制⁵⁾や、5)補体活性の抑制⁶⁾である。今回我々の症例では、血中の炎症性サイトカインを測定し、IVIg治療前における顕著な上昇と治療による有意な低下を確認した。すなわち、治療前、患者群ではコントロールに比較し高いTNF-α値とIL-6値を示し、治療後に、有意なTNF-α値の低下とIL-6の低下傾向が確認された。また、IL-8が高値であった症例においては著明な低下が認められた。

ANCA関連血管炎候群の病態には好

中球が中心的な役割を示している。感染などの刺激が加わることにより、モノサイトからの TNF- α などのサイトカイン放出が引き起こされ、好中球をプライミングした状態におく。プライミングされた好中球はその細胞表面上に MPO を発現し、また流血中にも MPO を放出する。これが抗原刺激となり、MPO-ANCA が産生される。MPO と MPO-ANCA の存在下で、二次的な感染刺激などが加わることにより、プライミングされている好中球が活性化され、血管内皮と結合した活性化好中球からさらなる MPO の脱顆粒や活性酸素が産生され、血管内皮障害を起こすことが示されてきている^(7,8)。TNF- α は ANCA 関連血管炎症候群において、好中球のプライミングに重要であることが多数の報告で示されている。また、流血中でプライミングされた好中球は apoptosis に陥りやすく、マクロファージにより貪食されるが、このことがマクロファージからの向炎症性サイトカイン放出のトリガーとなり、慢性炎症が引き起こされることが報告されている⁽⁹⁾。さらにいくつかのサイトカインが血管炎の疾患活動性との相関が報告されており、IL-6 と WG の疾患活動性との相関⁽¹⁰⁾ や、PR-ANCA と TNF- α との相互作用によりプライミングされた単核球がモノサイト細胞表面上に発現された Fc γ R と PR3 との cross-linking により IL-8 産生を刺激することなどが報告されている⁽¹¹⁾。Savage らは ACA 関連血管炎患者の腎組織を用いて、In situ hybridization と免疫組織化学により腎糸球体と半月体における IL-8 を証明している⁽¹²⁾。また IVIg によるサイトカインへの影響については他の自己免疫疾患においては、散見される。

Sharief らは GBS 患者において IVIg 治療を行った 21 例を検討し、IVIg 治療後 3 日後より血清 TNF- α の低下を認め、治療後 3-5 週間後も低下傾向が持続したと報告している⁽¹³⁾。しかし、今回の MPO-ANCA 関連血管炎でのサイトカインの結果とその IVIg 治療の影響については報告はない。IVIg 治療後の血清 TNF- α の低下は流血中からの機械的除去というよりは向炎症性サイトカイン産生の down regulation ではないかと推測される。実際に、IVIg が選択的に遺伝子転写を誘導し、抗炎症性サイトカインを分泌することが vivo で示されている⁽¹⁴⁾。以上より ANCA 関連血管炎症候群において好中球をプライミングさせると同時に炎症の持続に関与する TNF- α の低下が IVIg の治療効果発現機序のひとつと考えられた。今回 IVIg 治療後の後療法として、主にステロイド治療がなされた。パルス療法も 3 例に行われたが、全体に PSL 量は少量で、特に高齢者で他の感染症を持っている症例には、低容量 (20mg/day) に限った治療を行った。3 か月後の透析導入症例は 1 例のみで、再発も一例のみ、感染症の発症は皆無であった。Jayne らは腎障害のない Wegener's granulomatosis に対して IVIg を施行し、約 1 年間疾患活動性の低下が持続したと報告し⁽¹⁵⁾、また他の報告でも IVIg を併用することにより免疫抑制療法の総量を減量できたとの報告もある⁽¹⁶⁾。近年重症喘息に IVIg を投与することでグルココルチコイドレプターの感受性を上げ、ステロイド量が減量できたという報告もあることから、IVIg の作用機序のひとつに上げられると考えられる。ステロイドや CYC を含む免疫抑制剤を減量できる可能性があるという

点で有益な機序と考えられる¹⁷⁾。

一方、免疫抑制療法中におこる immunocompromized host としての感染に関しては以下のような報告がある。日本における ANCA 関連血管炎症候群全国調査 230 例の検討では死亡 17 例中、感染症の割合が 37% と最も多く (橋本博史 他: 厚生省難治性血管炎に関する調査研究, 平成 10 年度研究報告書 1999, 213-229)、死亡例 46 例における感染症リスク因子の解析では、PSL60mg/日以上を長期間投与することが感染症リスクを増大させる可能性を示唆しており、また感染原因の中ではアスペルギルス症が尤も多かったと報告している (吉田雅治 他: 厚生省難治性血管炎に関する調査研究, 平成 12 年度総括研究報告 2001, 229-237)。実際には感染症を契機にして再発するという事柄もしばしば経験され、診断に際し感染症との鑑別が重要であり、感染症の治療なしで免疫抑制剤の使用は致命的になりうる場合も存在するが、IVIg 治療は重症感染症に対しても有効性を発揮することから、感染症合併時の ANCA 関連血管炎症候群の治療の 1 つの選択枝になりうると考えられた。

IVIg 治療の副作用として腎障害の報告があり、この原因は IVIg 製剤を安定化させるために含有される二糖類の sucrose が高浸透圧血症を引き起こすためとされている¹⁸⁾。今回我々は sucrose を含まない乾燥スルホ化ヒト免疫グロブリン製剤 (帝人、日本) を使用し、急速進行性糸球体腎炎の治療に用いた。欧米からの報告では主に腎症のない WG に試されており、今回の報告は IVIg の治療効果が腎障害の存在する急速進行性糸球体腎炎に対しても全身の炎症反応を低下

させるとともに、血管炎の活動性を低下させ、進行性腎機能障害を抑制したという点で有用であったと考えられた。

今後、医療経済上の観点からも、コントロールスタディを行い、その有用性と安全性を確認し、より良い MPO-ANCA 関連腎炎血管炎の予後のための、IVIg の評価と、その後の適切な免疫抑制療法の検討が必要で、さらに、この有用な治療を廉価で安全に施行する事を可能にする、人工グロブリンの早期開発が望まれるところである。

E. 結論

我々は急速進行性糸球体腎炎を呈する ANCA 関連腎炎・血管炎に対し IVIg 療法を施行し良好な経過を得た。

参考文献

- 1 Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, et al. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM* 1994; **87**: 671-8.
- 2 Yashiro M, Muso E, Itoh-Ihara T, et al. Significantly high regional morbidity of MPO-ANCA-related angitis and/or nephritis with respiratory tract involvement after the 1995 great earthquake in Kobe (Japan). *Am J Kidney Dis* 2000; **35**: 889-95.
- 3 Berchtold P, Dale GL, Tani P, et al. Inhibition of autoantibody binding to platelet glycoprotein IIb/IIIa by anti-idiotypic antibodies in intravenous gammaglobulin. *Blood* 1989; **74**: 2414-7.
- 4 Tenser RB, Hay KA, Aberg JA. Immunoglobulin G immunosuppression of multiple sclerosis. Suppression of all three

- major lymphocyte subsets. *Arch Neurol* 1993; **50**: 417-20.
- 5 Kondo N, Ozawa T, Mushiake K, et al. Suppression of immunoglobulin production of lymphocytes by intravenous immunoglobulin. *J Clin Immunol* 1991; **11**: 152-8.
- 6 Basta M, Dalakas MC. High-dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. *J Clin Invest* 1994; **94**: 1729-35.
- 7 Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**: 4115-9.
- 8 Charles LA, Caldas ML, Falk RJ, et al. Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J Leukoc Biol* 1991; **50**: 539-46.
- 9 Harper L, Cockwell P, Adu D, et al. Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney Int* 2001; **59**: 1729-38.
- 10 Muller Kobold AC, Kallenberg CG, Tervaert JW. Monocyte activation in patients with Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 1999; **58**: 237-45.
- 11 Ralston DR, Marsh CB, Lowe MP, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, alpha1-antitrypsin, and Fc gamma receptors. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1416-24.
- 12 Cockwell P, Brooks CJ, Adu D, et al. Interleukin-8: A pathogenetic role in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; **55**: 852-63.
- 13 Sharief MK, Ingram DA, Swash M, et al. I.v. immunoglobulin reduces circulating proinflammatory cytokines in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 1999; **52**: 1833-8.
- 14 Ruiz de Souza V, Carreno MP, Kaveri SV, et al. Selective induction of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 in human monocytes by normal polyspecific IgG (intravenous immunoglobulin). *Eur J Immunol* 1995; **25**: 1267-73.
- 15 Jayne DR, Lockwood CM. Intravenous immunoglobulin as sole therapy for systemic vasculitis. *Br J Rheumatol* 1996; **35**: 1150-3.
- 16 Richter C, Schnabel A, Csernok E, et al. Treatment of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis with high-dose intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol* 1995; **101**: 2-7.
- 17 Spahn JD, Leung DY, Chan MT, et al. Mechanisms of glucocorticoid reduction in asthmatic subjects treated with intravenous immunoglobulin. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **103**: 421-6.
- 18 Cayco AV, Perazella MA, Hayslett JP. Renal insufficiency after intravenous immune globulin therapy: a report of two cases and an analysis of the literature. *J Am Soc Nephrol* 1997; **8**: 1788-94.
- G. 研究発表
1. 論文発表
- 1) 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、

陶山勝郎、渡部仁美、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 関連急速進行性腎炎の 1 症例。Pharma Medica 20 (6): 118-120, 2002

2) Ito-Ihara T, Nogaki F, Ono T, Suzuki K, Muso E. Intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment of MPO-ANCA-related microscopic polyangiitis. Cleveland Clinic Journal of Medicine, 188; 69 (5) suppl. 2, May 2002

2. 学会発表

1) Ito-Ihara T, Nogaki F, Ono T, Suzuki K, Muso E. Intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment of MPO-ANCA-related microscopic polyangiitis. Proceedings of the 10th International Vasculitis and ANCA Workshop. April 25-28, 2002 Cleveland, USA.

2) T. Ito-Ihara, F. Nogaki, T. Ono, A. Matsumori, K. Suzuki, E. Muso. Intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment on patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-related glomerulonephritis. 26th International Congress of Internal Medicine. May 26-30, 2002 Kyoto, Japan.

3) 猪原登志子、大川原明子、鈴木和男、小野孝彦、武曾恵理：SCG/Kj mice における腎組織学的病変と好中球機能との関係に関する検討。第 45 回日本腎臓病学会総会 平成 14 年 5 月 23-25 日、大阪。

4) 猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、山本聡、米本智美、南方保、武曾恵理。ANCA 関連血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療の効果。第 53 回近畿腎臓懇話会 平成 14 年 6 月 8 日、大阪。

5) 武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦、北徹、鈴木和男。ANCA 関連腎炎・血管炎に対す

るヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討。第 8 回 MPO 研究会、平成 14 年 10 月 18 日、宮崎。

6) 猪原登志子、小野孝彦、北徹、鈴木和男、武曾恵理。ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討。人工グロブリン班会議・IVIg 公開シンポジウム、平成 14 年 11 月 8 日、京都。

7) Toshiko Ito-Ihara, Akiko Ishida Okawara, Eri Muso, Takahiko Ono, Kan Saiga, Kazuso Suzuki. Role of Activated Neutrophil in Spontaneously Crescentic Glomerulonephritis Forming (SCG/Kj) Mice. 35th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Nov. 1- 4, 2002. Philadelphia, PA, USA.

F. 健康危険情報

なし

Figure 1

