

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

分担研究者 高橋 啓 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座・助教授
 研究協力者 大原関利章 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座・助手
 直江史郎 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座・名誉教授

研究要旨

CAWS によるマウス系統的血管炎惹起モデルを用い治療実験を行うにあたり、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、CAWS1 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。

A. 研究背景・目的

我々は、川崎病罹患児糞便から分離した *C. albicans* の菌体抽出物(CADS)によるマウス系統的血管炎惹起モデルを用いて検索を続けている。一方、大野ら(東京薬大・薬)が作製した *C. albicans* Water Soluble Polysaccharide Fraction (CAWS) を本実験に用いたところ、CADS よりも高頻度かつ高度の動脈炎が発生し CAWS は強い催炎活性を有する物質であることが判明した。

この CAWS 投与血管炎誘発実験モデルを用いた治療実験を行うにあたり、評価に最も適当な諸条件を模索することを目的とし、投与量、投与回数、屠殺時期などを変更し血管炎発生頻度、組織像を比較した。

B. 研究方法

以下に示す諸条件にて CAWS をマウス腹腔に接種した後、屠殺。剖検し病理組織学的に血管炎発生頻度、組織像を各群間で比較検討した。

A 群: CAWS 8mg を腹腔内に 1 回投与。8, 16 時間, 3, 7 日, 1 ヶ月後に屠殺。

B 群: CAWS, 8mg, 20mg を 1 回投与。7 日後に屠殺。

C 群: CAWS, 8mg を実験 1, 5 日目に 2 回接種。その 1 週間後に屠殺。

D 群: CAWS, 8mg を 5 日間連続投与し、その 1, 2, 4 週後に屠殺。

E 群: CAWS, 4mg を実験開始 1 週目と 5 週目にそれぞれ 5 日間連続投与し、9 週目に屠殺(original schedule)

C. 研究結果

血管炎発生頻度:

	Dose	Sacrifice (time after last Injection)	mice
A 群	8mg	8 hrs	0/2
		16 hrs	0/2
		3 days	0/2
		7 days	1/2
		1 month	1/2
B 群	8mg	7 days	1/4
	20mg		2/4
C 群	8mg x 2	7 days	2/8
D 群	8mg x 5	7days	4/6
		14days	3/6
		28days	5/6
E 群	4mg x 5 x 2	4weeks	6/6

組織像: E 群(従来のスケジュール)で、最も激しい血管炎が生じていた。これに対し、A 群、B 群、C 群では炎症の程度は軽微な傾向にあった。D 群の内、接種後 1 週、2 週屠殺群では、炎症の程度は軽微なものから高度

なものまで、個体による差異が大きかったのに対し、4週屠殺群ではいずれもE群と類似する血管炎が得られ、個体差は少なかった。



内膜に局限した炎症細胞集簇
(D群1週屠殺)



高度の肉芽腫性汎血管炎 (D群4週屠殺)

D. 考察

我々は、川崎病剖検例の病理組織学的検索を続ける一方で、川崎病罹患児糞便由来の *C. albicans* アルカリ抽出物を用いたマウス系統的動脈炎作製実験を続けている。本実験系で惹起される動脈炎は病変分布や組織像など川崎病動脈炎に類似点が多く川崎病動物モデルとして評価されている。これまでの検討では、本実験系にヒトあるいはマウス免疫グロブリンを投与すると血管炎の抑制傾向が得られること、本実験系の血管炎発生と血清MPO-ANCA値とは密接に関連することなどが判明している。

一方、大野らが作成したCAWSを本実験系に適用すると極めて高頻度に血管炎が得られることが判明し、治療実験を行う上で優れた物質であることが推定された。しかしな

がら、従来のスケジュールで実験を施行した場合、炎症の程度が著しく高度であること、薬剤投与のタイミングを決定するのが困難であることなど、血管炎抑制効果を判定する上でいくつかの問題点があった。そこで、より簡略で、評価が容易な実験系を確立する目的で投与量、投与時期などを変更し比較検討した。

その結果、CAWSの1回あるいは2回投与のみでは血管炎を高頻度に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発生頻度は著しく上昇するが、この内、個体差が最も少なく安定した組織像が得られるのは投与後4週屠殺群であることが判明した。この実験スケジュールを用いることにより、CAWSの投与量、実験に要する時間を従来よりも半減できる点もメリットの一つである。現在、本法にてCAWSを投与した後の経時的な冠状動脈の組織学的変化について検索している。

E. 結論

CAWSによるマウス系統的血管炎誘発モデルを用いた治療評価実験を行うにあたり実験第1週にCAWSを5日間連続投与。その4週後に屠殺するのが最も適当な実験スケジュールであると結論された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

高橋 啓：瘤を確認できなかった冠状動脈の狭窄性病変への進展の可能性について。

Prog.Med. 22: 1676-1678, 2002

2. 学会発表

高橋 啓、大原関利章、直江史郎、大川原明子、鈴木和男、新谷康昭：Candida albicans 菌体抽出物接種によるマウス系統的血管炎誘発モデルの病理学的検討。第75回日本生化学会、京都、2002.10

H. 知的所有権の取得状況

なし

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

分担研究者 大川原明子 国立感染症研究所生物活性物質部・研究員
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

研究要旨

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 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 *Candida albicans* released a water-soluble polysaccharide fraction (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。得られた知見を基に、今後、血管炎治療実験を行う予定である。

A. 研究目的

病理所見の観察から、血管炎発症局所への炎症細胞の集積が認められる。しかし、これらの細胞がどのように関与しているかについては不明な点も多い。血管炎の組織には、マクロファージ、好中球、リンパ球等の炎症細胞の浸潤が観察される。本来、炎症細胞は外来異物などを排除する生体防御機能を担っているが、血管傷害も引き起こしていると考えられる。これと関連して、血管炎患者では血中に好中球抗体 ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody) が上昇することや、好中球抗体、好中球が血管炎に関与していることが明らかになっている。

これまで、血管炎発症にかかわる因子としては、ANCA および、いくつかの自己抗体、IL-8 や TNF α などの炎症性サイトカイン、内皮細胞の活性化、接着分子、血管内膜・中膜・外膜あるいは細胞外マトリックスの反応系などが考えられており、それらの因子が連鎖し

て血管炎発症の引き金になっていると推測される。一方、血管炎の患者では、末梢好中球の活性化が認められ、病態の推移と関連していることが報告されている。

さらに、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。加齢に伴って腎炎や血管炎を発症する NZB/WF1、MRL/lpr、SCG/Kj、IRF-8/ICSBP マウスや CAWS 誘導の冠状動脈血管炎マウスなど血管炎モデルマウスを用いて血管炎発症に関与する MPO-ANCA や好中球機能について解明する必要がある。

本研究では、CAWS の接種によって冠状動脈炎を発症するモデルマウスを用いて、活性化好中球、MPO-ANCA 産生と血管炎発症との関係について基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

- 1) マウス
C57BL/6 マウス、6W、♂を SPF 環境下飼育し

用いた。各群 n 数は 5 である。

2) CAWS の調整と投与

CAWS は *C. albicans* IFO 1385 を完全合成培地で培養し、その培養上清より得た。生理食塩水で所定の濃度に調整した CAWS をオートクレーブし、マウスに腹腔投与した。

3) 好中球の分離

腹部大動脈よりヘパリン採血し、比重法によって末梢好中球画分を単離した。

4) 好中球の機能解析

4-1) MPO 放出活性：終濃度 10^{-5} M の FMLP および $5 \mu\text{g/ml}$ の サイトカラシン B で好中球を刺激して脱顆粒し、 H_2O_2 を基質として細胞外への MPO 放出率を求めた。

4-2) 活性酸素産生：活性酸素産生は、チトクローム c の還元能により求めた。

5) マウス血清中の MPO-ANCA 値の測定

rmMPO を抗原として ELISA により測定した。スタンダードには rmMPO で免疫したウサギ血清から精製した抗マウス MPO 抗体を使用し、MPO-ANCA 抗体価を算出した。

6) 冠状動脈炎発症の検討

屠殺後、定法に従って病理標本を作製し冠状動脈炎の有無の評価をした。

(倫理面への配慮)

動物使用に際しては、飼育、薬剤投与、屠殺などすべての過程において動物愛護の精神を遵守し実験を行った。

C. 研究結果

CAWS 投与後、末梢好中球は濃度依存的に増加した (図 1)。FMLP によって誘導される MPO 放出は CAWS 濃度依存的に増加し、また、 800 mg/kg の投与では 8-16 時間に放出の

ピークを認め (図 2-a,b)、また、活性酸素産生能も同様の結果であった (図 3)。CAWS による冠状動脈炎発症について予備的な検討を行ったが、発症率は 50% と低かった (表 1)。

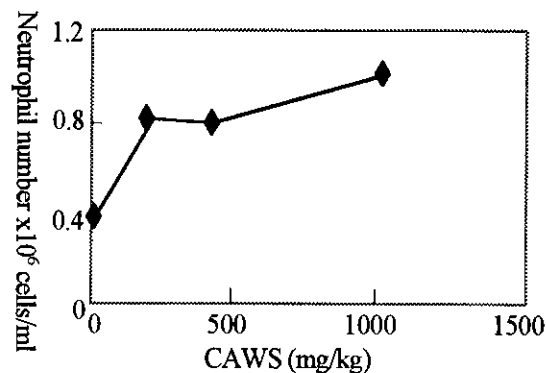


図 1 CAWS 投与による末梢好中球の増加

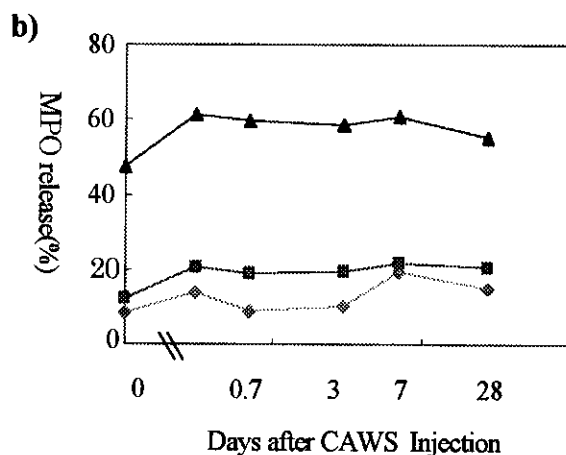
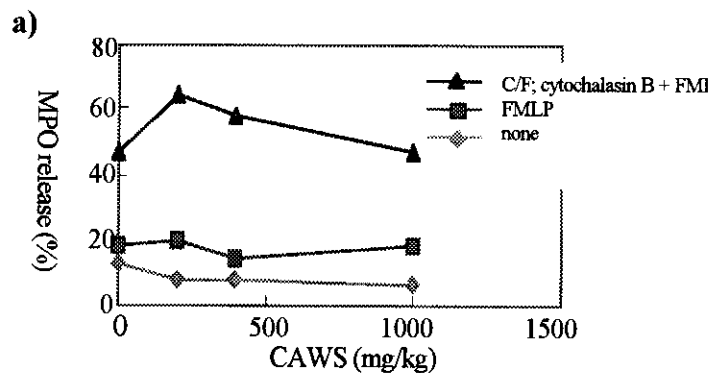


図 2 CAWS 誘導の MPO 放出

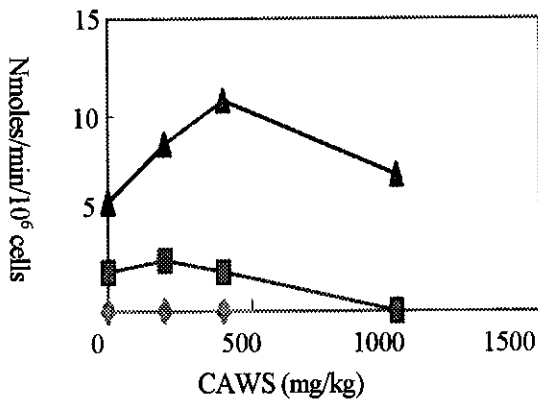


図3 CAWS誘導活性酸素産生

Time	Incidence of coronary arteritis (400 mg/kg, one shot)
8 hr	ND
16 hr	ND
3 days	ND
1 week	50 % (N:2)
1 month	50 % (N:2)

ND; not detected

表1 CAWS投与による冠状動脈炎の発症

D. 考察

CAWS誘導の冠状動脈炎発症に好中球の活性化が関与している可能性が示唆された。

冠状動脈炎の発症率は50%と低く、治療の評価が難しいため、さらに発症率を上げる投与条件について検討する必要がある。

E. 結論

ガンマグロブリンをはじめとする治療や、血管炎の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。CAWS腹腔投与によって末梢好中球は活性化状態になることを示した。さらに、本マウスにおけるMPOおよびMPO-ANCAの役割について解明すると共に、ガンマグロブリン治療法を検討する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kohji Ichimori, Naoto Fukuyama, Hiroe Nakazawa, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Shunya Takizawa, Yosuke Kameoka, Akiko Ishida-Okawara, Fumikazu Kohi and Kazuo Suzuki. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction-study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. Free Radical Research, in press

2. 学会発表

- 1) 大川原明子、猪原登志子、小野孝彦、武曾恵理、雑賀寛、根本久一、鈴木和男 半月体形成腎炎モデルとしてのSCG/Kjマウスの好中球機能 第32回京都腎臓免疫研究会
- 2) A. Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, T. Ono, E. Muso, K. Saiga, K. Nemoto, K. Suzuki Contribution of activated neutrophils and MPO-ANCA to the development of crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. 10th International vasculitis and ANCA workshop, April 25-28, 2002, Cleveland, Ohio, USA
- 3) 大川原明子、大原関利章、高橋 啓、三

- 浦典子、大野尚仁、荒谷康昭、小山秀機、Nobuyo Maeda, 直江史郎、鈴木和男 カンジダ菌体由来物質誘導の血管炎モデルマウスにおける好中球の役割 第75回日本生化学会大会、2002年10月、京都
- 4) 越尾 修、長尾 朋和、石田-大川原 明子、馬淵 綾子、鈴木 和男 血管内皮細胞の Apoptosis 誘導における p38 MAPK と Caspase 8 の活性化に対する好中球および IL-1 α の関与 第8回MPO研究会2002年10月、宮崎
- 5) 大野尚仁、三浦典子、新郷裕子、安達禎之、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、大川原明子、鈴木和男 病原性真菌 *Candida albicans* 培養上清由来の mannoprotein- β -glucan complex, CAWS による冠状動脈炎の発症と機序の解析 第8回MPO研究会、2002年10月、宮崎
- 6) 大川原明子、大原関利章、高橋 啓、三浦典子、大野尚仁、荒谷康昭、小山秀機、Maeda Nobuyo、直江史郎、鈴木和男 血管炎発症への活性化好中球の関与-カンジダ菌体由来物質 CAWS によって誘導される血管炎モデルマウスを用いた解析 第8回MPO研究会、2002年10月、宮崎
- 7) 大原関利章、大野尚仁、大川原明子、直江史郎、鈴木和男、高橋 啓 *Candida albicans* 菌体抽出物を用いた川崎病類似マウス動脈炎モデル 第8回MPO研究会2002年10月、宮崎
- 8) Toshiko Ito-Ihara, Akiko Ishida-Okawara, Eri Muso, Takahiko Ono, Kan Saiga, Kazuo Suzuki Role of Activated Neutrophils in Spontaneously Crescentic Glomerulo-nephritis Forming (SCG/Kj) Mice. 35th Annual Meeting of American Society of Nephrology. October 30-November 4, 2002, Philadelphia, PA, USA
- 9) 奥村彰規、斉藤 武、大川原明子、大谷功、金山喜一、浅野雅秀、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越 智 関節炎モデルを用いた LECT2 の役割解析 生体防御機能異常ワークショップ -2002/第5回肝臓生物学研究会、2002年11月、京都
- 10) 越尾 修、長尾 朋和、石田-大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男 血管内皮細胞の Apoptosis 誘導における p38 MAP kinase と Caspase 8 の活性化に対する好中球および Cytokine 類の関与生体防御機能異常ワークショップ -2002/第5回肝臓生物学研究会、2002年11月、京都
- 11) 大川原明子 自然発症半月体形成腎炎モデル: SCG/Kj マウス 生体防御機能異常ワークショップ -2002/第5回肝臓生物学研究会、2002年11月、京都
- 12) 斉藤 武、奥村彰規、渡部久実、浅野雅秀、大川原明子、安保 徹、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越 智 肝障害モデルを用いた LECT2 の機能解析 第32回日本免疫学会総会、2002年12月、東京
- 13) 奥村彰規、斉藤武、大谷功、大川原明子、金山喜一、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越 智 関節炎モデルを用いた LECT2 の役割解析 第32回日本免疫学会総会、2002年12月、東京
- 14) 新郷裕子、三浦典子、安達禎之、大野尚仁、大川原明子、鈴木和男、大原関利章、高橋 啓、直江史郎 *Candida albicans* 菌体外

多糖 CAWS の血管炎誘発活性におけるマウス系統差とその病態形成への関与の検討 第32回日本免疫学会総会、2002年12月、東京
15) 越尾 修、長尾 朋和、石田-大川原 明子、馬淵 綾子、鈴木 和男 血管内皮細胞のApoptosis誘導におけるp38 MAPKとCaspase 8の活性化に対する好中球およびIL-1 α の関与第22回日本分子生物学会、2002年12月、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

分担研究者 大野尚仁 東京薬科大学薬学部・教授

研究要旨

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。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。

A. 研究目的

人工ポリクローナル Fv グロブリン（人工 Ig）の有用性評価には、種々の実験モデルでの基礎的研究が必要である。川崎病の治療には高濃度 γ グロブリン製剤が使用され、効果をあげていることから、川崎病類似の血管炎モデルを用いることは有用であると考えられる。東邦大学の直江教授らは、川崎病患児から分離された *Candida albicans* のアルカリ抽出多糖画分（CADS）を用いることで、マウスに川崎病類似の血管炎を誘発できることを報告しており、本モデルを人工 Ig の評価法に応用することは、川崎病治療法の向上の面からも重要であると考えられる。しかし、CADS の血管炎誘発活性は必ずしも高くないので、高い血管炎誘発活性を有する *Candida albicans* の培養外液から得られる mannoprotein- β -glucan 複合体 CAWS を用いて、血管炎誘発機序について解明するために、血管炎誘発感受性の異なるマウスを用いて検討し

た。

B. 研究方法

菌体外多糖（CAWS）の調整 *C. albicans* を完全合成培地で培養し、培養外液をエタノール沈殿することで、菌体外多糖画分（CAWS）を得た。

血管炎誘発プロトコール 1 週目に、CAWS（4mg/mouse）をマウスに 5 日間連続腹腔内投与した。更に 5 週目に、CAWS（4mg/mouse）を 1 週目と同様に投与し、9 週目にマウスを屠殺し、組織切片を HE 染色した。

細胞培養 脾臓細胞はいずれも常法に従って培養した。一定時間培養後、上清を回収し、サイトカイン産生を評価した。細胞数はトリパンブルーにて染色し血球計算板で数えた。

サイトカインの測定 サイトカインは 2 抗体を利用したサンドイッチ ELISA 法を用いた。抗体、

標準品は全て Pharmingen 社より購入し (IL-1 β のみ Mouse IL-1 β ELISA kit (Biosource International) を用いた), 同社の標準プロトコールに従った。

抗 CAWS 抗体価の測定 CAWS を coat した plate を用い, BPBST で希釈した血清 sample を加え, peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG+M Ab (和光) (1/5000) を用いて発色・測定した。なお, 発色は正確に 10 分で停止した。

抗体のサブクラスの測定 CAWS を coat した plate を用い, BPBST で希釈した血清 sample を加え, biotin-conjugated anti-mouse IgG1 (1/1000)・IgG2a (1/3000)・IgM (1/5000) Ab または peroxidase-conjugated anti-mouse IgE Ab を用いて (Biotin 化抗体については, 洗浄後, horseradish peroxidase conjugated streptavidin (1/5000) (Pharmingen) を加えた) 発色・測定した。なお, 発色は正確に 10 分で停止した。

有意差検定 本研究における有意差検定は, すべて Student's *t*-test によって行い, $P < 0.05$ のものを「有意差あり」と判定した。

C. 研究結果

(1) CAWS 投与による致死誘発のマウス系統差

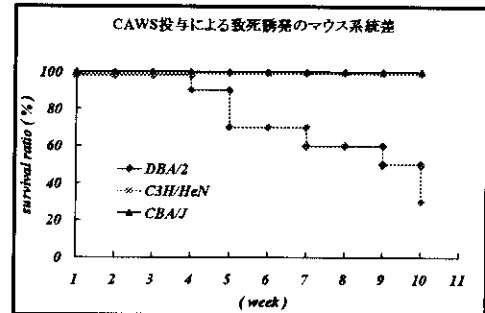
昨年度までの本プロジェクト研究において, CAWS による血管炎の誘発にはマウスの系統差があり, C3H, DBA/2 は高感受性, CBA/J は低感受性であることが明らかとされた。この血管炎誘発プロトコールにより CAWS 投与を行うと, 高感受性である DBA/2 マウスは高率に死亡することがわかった。この致死は他の系統ではほとんど観察されなかった。(図 1)

一般的に, 正常な心筋では核や横紋がはっきりと確認できるのに対し, 梗塞を起こした心筋細胞は凝固壊死に陥り, 心筋は伸縮性を失って伸長し, 核は腫大→濃縮→消失の過程をたどる, とされている。さらに壊死に陥って 6~7 時間後ころから好中球が浸潤し壊死細胞を分解, その後心筋の細胞質の無構造化, 核の消失に伴う繊維芽細胞, 組織球 (リンパ球, マクロファージ), 形質細胞の出現とともに, 新生毛細血管の増生が起こる (1 週間)。マクロファージによる細胞の貪食が終わると, 梗塞巣では繊維芽細胞が増殖し肉芽組織化, また膠原繊維の増生による繊維組織化が起こり癒痕組織となる (1 ヶ月)。

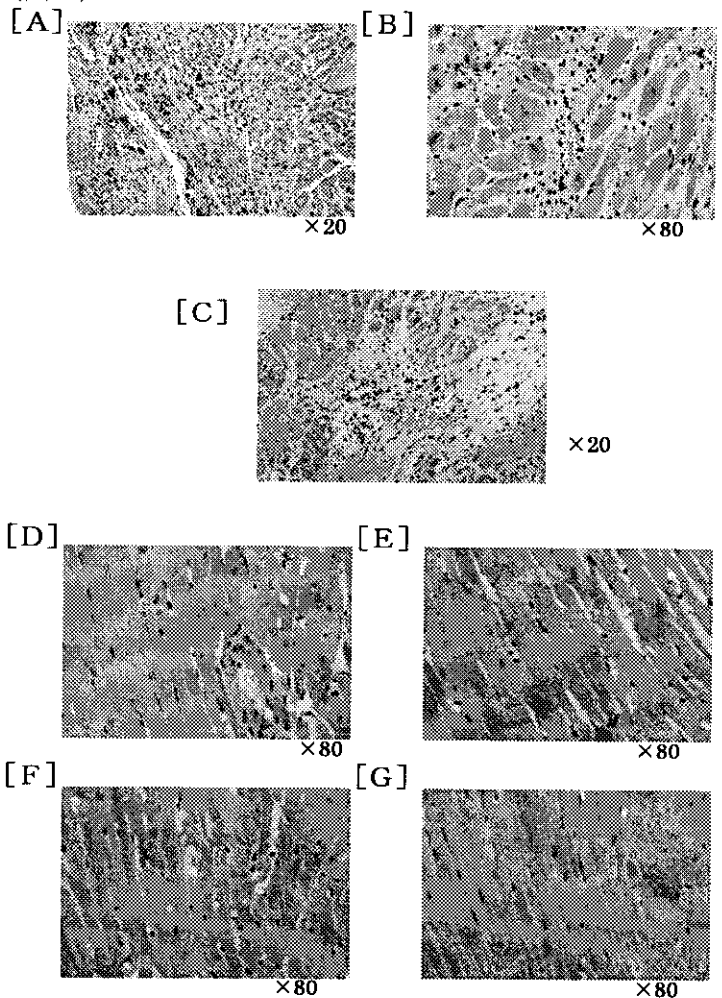
CAWS 投与により死亡した DBA/2 マウスでは, 好中球や組織球の著しい浸潤と横紋筋の消失 (図 2A) や, 細胞浸潤に加え組織の繊維化 (図 2B, C) が起こっているようであった。一方, saline 投与群では正常な横紋筋が観察され, 細胞浸潤などは観察されなかった (図 2D-G)。また, CAWS 投与群のなかで生存していたマウスをクロホルム屠殺した場合には, 細胞浸潤は起こっている

ものの梗塞巣は見られなかった (data not shown)。これらのことより, CAWS 投与により死亡したマウスは, 心筋梗塞による致死の可能性があることが示唆された。

(図 1)



(図 2)



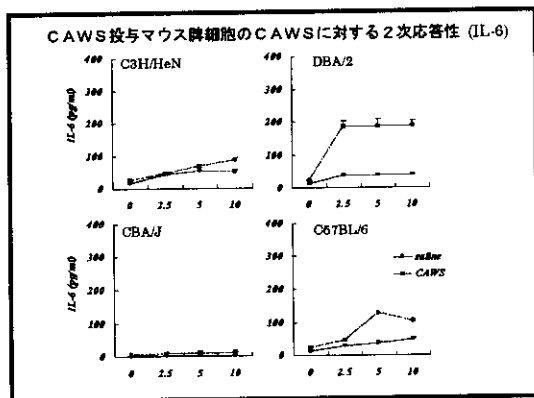
(2) CAWS 投与マウスの脾臓細胞からのサイトカイン産生の解析

CAWS によって誘発される血管炎発症のマウ

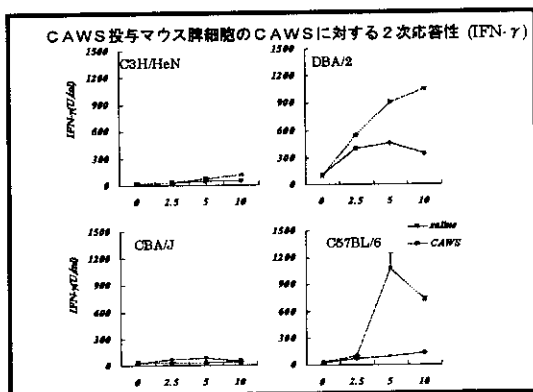
ス系統差を明らかにするために、血管炎誘発プロトコールに従い CAWS を投与したマウスの脾臓細胞を用いて二次応答の違いについて、培養上清中のサイトカイン量を ELISA 法により検出し観察した。

その結果、①IL-6 産生においては、DBA/2 および C57BL/6 で明らかな CAWS 濃度依存的な二次応答が観察された。C3H/HeN では CAWS 投与群でわずかに増加していたが、CBA/J では応答は全く観察されなかった (図 3)。②IFN- γ 産生においては、DBA/2, C57BL/6 において saline 投与群よりも CAWS 投与群で二次応答が増加傾向にあったが、CBA/J では応答は観察されなかった (図 4)。③IL-10 産生においては、どの系統の CAWS 投与群でも二次刺激により増加したが、特に CBA/J では background レベルで産生が高く、CAWS 投与群においてさらに産生量が増加した (図 5)。④IL-12 産生は、どの系統でもほとんど観察されなかった (図 6)。⑤IL-4 産生は、どの系統においても産生量は低いが、CBA/J では増加傾向を示し、また C3H/HeN でもやや増加した (図 7)。⑥TNF- α 産生は、CBA/J はほとんど産生を示さず、C3H/HeN もわずかな産生量であった。DBA/2, C57BL/6 は CAWS 投与群で二次応答が観察された (図 8)。⑦IL-1 β 産生は、CBA/J のみほとんど産生を示さず、DBA/2 では産生が高かった。また C3H/HeN でも IL-1 β の産生が観察されているが、saline 投与群と CAWS 投与群で差は認められなかった (図 9)。

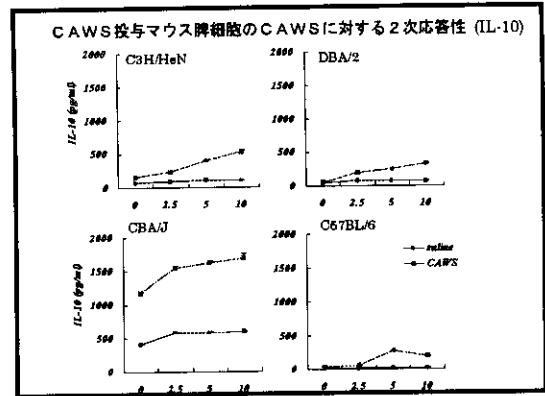
(図 3)



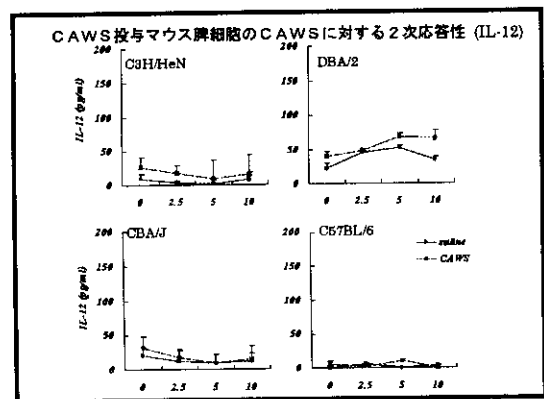
(図 4)



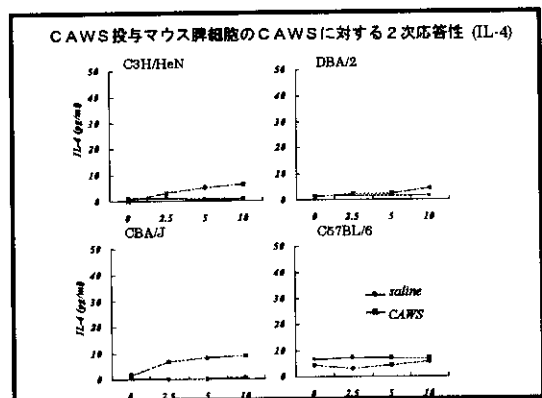
(図 5)



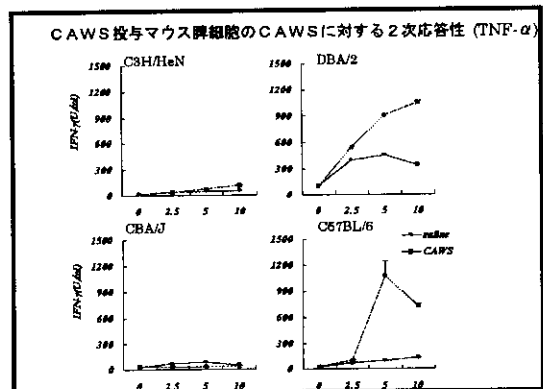
(図 6)



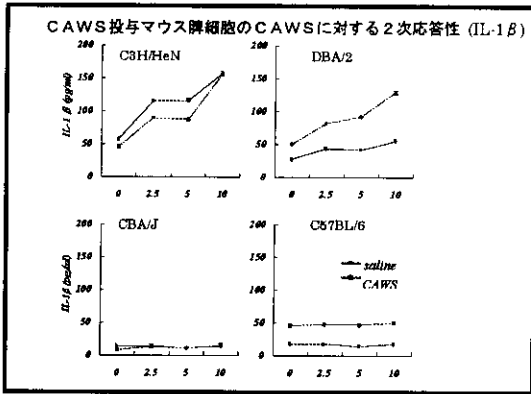
(図 7)



(図 8)



(図 9)



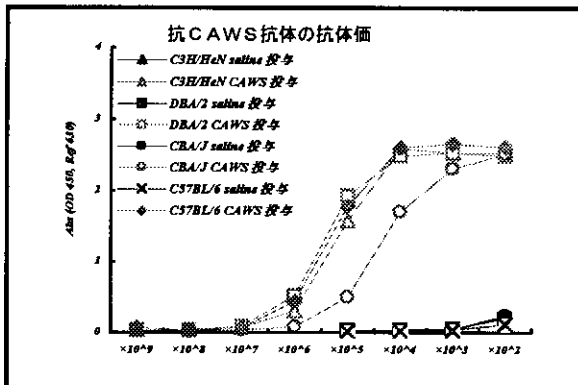
CBA/Jでは、炎症性サイトカインであるIL-6やTNF- α の産生がほとんど観察されず、一方Th2サイトカインであるIL-10が亢進していたことなどから、血管炎を発症しないCBA/Jと他の血管炎を発症する3系統のマウスでは、CAWSに対して異なる免疫応答が起こっており、このような性質が血管炎の発症に関与している可能性が考えられる。

(3) 抗 CAWS 抗体の抗体価の検討

血中に存在する抗体は免疫応答において重要な役割を担っており、特に血管炎では、その発症への自己抗体の関与も示唆されている。そこで、本モデルマウスにおいても血中の抗体価を測定することにより、病態形成に関与する可能性を検討した。本実験系では、大量のCAWSを投与しているため、CAWSに対する抗体(抗CAWS抗体)に着目した。

血管炎誘発プロトコールに従いCAWSを投与したマウスより心臓採血して血清を得、血清中の抗CAWS抗体をanti-mouse IgG+M Abで検出した。抗CAWS抗体はどのマウスでも検出され、抗体価は非常に高かった(図10)。CBA/Jマウスでは、他の3系統に比べ抗体価がやや低いようであった。また、saline投与マウスの血清からも検出され、微量ながらCAWSに対する自然抗体が存在することも示された。

(図 10)

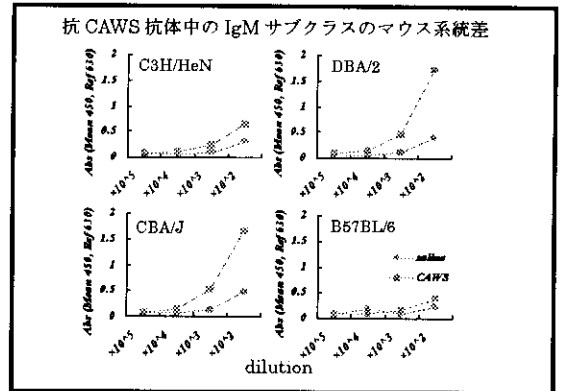


(4) 抗 CAWS 抗体のサブクラスの検討

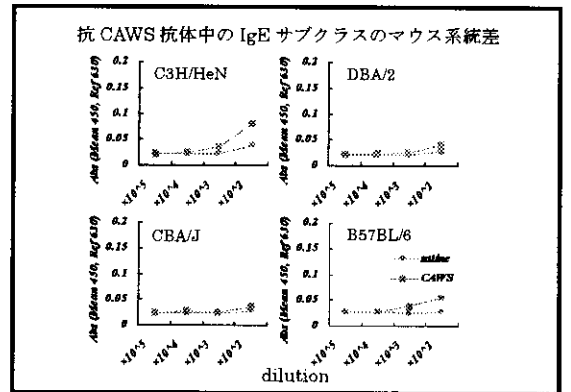
マウス血清中に大量に産生されている抗CAWS抗体のサブクラスを、初期応答を示すIgM、二次応答を示すIgG、アレルギー応答を示すIgEについて検討した。また、IgGでは、さらにそのサブタイプであるIgG1およびIgG2aについても検討した。IgG1は、IL-4によって産生の促進されるTh2側のサブタイプであり、IgEもIL-4によって産生が促進される。一方、IgG2aはIFN- γ によって産生が促進され、Th1側のサブタイプである。

IgMは、マウスの系統によって抗体価に差はあるものの、血管炎の発症率との同一性は認められなかった(図11)。IgEは、どの系統でもほとんど検出されなかった(図12)。逆に、IgG1はどの系統でも高度に検出された(図13)。IgG2aは、CBA/Jが最も抗体価が低かった(図14)。

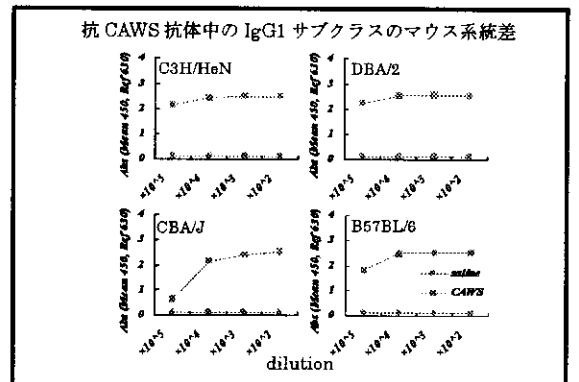
(図 1 1)



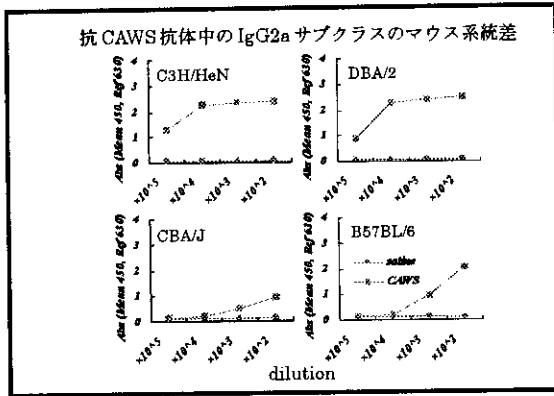
(図 1 2)



(図 1 3)



(図 1 4)



以上の結果より、抗 CAWS 抗体として産生されている抗体は主に IgG であり、次いで IgM であった。IgG2a 産生では CBA/J および C57BL/6 で抗体価が低いが、特に CBA/J は C57BL/6 の約半分程度の抗体価を示していることや、脾臓からのサイトカイン産生の結果から考え合わせると、CBA/J は Th1 傾向が弱く、すなわち Th2 傾向にある可能性がある。また、IgE クラスの抗体はほとんど存在しないことから、本マウスモデルにおける血管炎の発症には I 型アレルギー応答の関与は低いことが示された。

D. 考察

冠状動脈炎発症マウスの致死に関する検討

CAWS を血管炎誘発プロトコールに従い投与したところ、CBA/J ではほとんど発症しないが、DBA/2, C3H/HeN では高率に冠状動脈炎を発症した。特に DBA/2 では高頻度に発症し、死亡率も高く、その組織所見からおそらく心筋梗塞により死亡していると予想された。

血管炎の誘発に関与する因子の解明

血管炎誘発プロトコールに従い、DBA/2, C3H/HeN, C57BL/6, CBA/J の 4 系統を用いて CAWS を投与し検討した。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(data not shown)。また、その脾臓細胞を *in vitro* において CAWS で刺激し、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 抗体についても検討したところ、全ての系統で抗体産生が起こっており、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。IgG のなかでも 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 では CBA/J で他に比べ抗最も体価が低かった。これらのことより、血管炎の発症には、マウス系統による異なる応答性が関与してい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

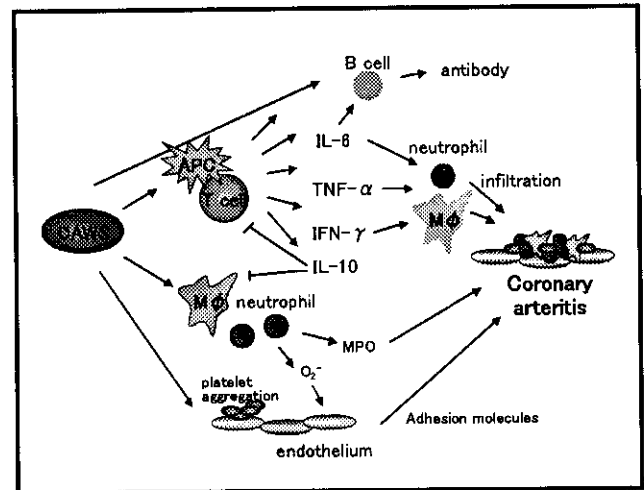
抑制において重要である可能性が示された。

E. 結論

本研究において、本プロトコールによる CAWS 血管炎の発症抑制には IL-10 が重要な役割を担っている可能性が示唆された。IL-10 は動脈硬化等、他の疾患の発症にも関わっている報告があることから、より詳細な解析が期待される。

CAWS 誘発血管炎は CAWS の直接的な好中球、M ϕ 、血管内皮細胞の活性化のほか APC を介した T 細胞の活性化により種々のサイトカインを産生誘導することでより、増悪化しているものと考えられた (図 1 5)。CAWS 誘発血管炎は、血管炎のモデルとして、人工化グロブリン製剤の評価において役立つものと思われる。

(図 1 5)



F. 健康危険情報

C. albicans は常在菌であり、健常人に対する病原性は問題とならない。生物試験は全て動物試験であり、本学の倫理規定に則って行った。

G. 研究発表

1. 論文発表,

①M. Uchiyama, N. Ohno, N. N. Miura, Y. Adachi, and T. Yadomae: Anti-Grifolan Antibody Reacts with the Cell Wall β -Glucan and the Extracellular Mannoprotein- β -Glucan Complex of *C. albicans*, *Carbohydrate Polymers*, 48, 333-340 (2002)

②K. Moriya, N. N. Miura, Y. Adachi, and N. Ohno: Systemic Inflammatory Response Associated with Augmentation and Activation of Leukocytes in *Candida*/Indomethacin Administered Mice, *Biol. Pharm. Bull.* 25, 816-822(2002)

③K. Ishibashi, N. N. Miura, Y. Adachi, N. Ogura, H. Tamura, S. Tanaka, and N. Ohno: Relationship

between the Physical Properties of *Candida albicans* Cell Wall β -Glucan and Activation of Leukocytes in Vitro, *Int. Immunopharmacol.* 2, 1109-1122 (2002)

2. 学会発表

日本薬学会 第122年会, 幕張, 平成14年3月26日～, 菌糸型 *Candida albicans* 由来 β グルカンの物性と生物活性, 三浦典子, 石橋健一, 江口武史, 安達禎之, 小倉紀彦, 渡邊真紀, 田村弘志, 田中重則, 大野尚仁 (東京薬大・薬・免疫, 生化学工業)

日本薬学会 第122年会, 幕張, 平成14年3月26日～, 抗カンジダ β グルカン抗体の特異性, 滑田祥子, 増沢信哉, 吉田雅治, 石橋健一, 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁 (東京薬大・薬・免疫)

第67回 東京医科大学免疫アレルギー研究会, 東京, 平成14年5月14日, *Candida albicans* 菌体外多糖 CAWS のマウスにおける致死毒性ならびにその機序の解析, 新郷裕子, 栗原 清, 飛田俊介, 佐久間浩徳, 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁 (東京薬大・薬・免疫)

第23回 関東医真菌懇話会, 東京, 平成14年6月1日, DNA マイクロアレイを用いた *Candida* 細胞壁 β -glucan 活性化白血球における遺伝子発現解析, 石橋健一, 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁 (東京薬大・薬・免疫, 生化学工業)

第75回日本生化学会大会, 京都, 平成14年10月14日～, 好中球の活性化とその異常, 大野尚仁, 鈴木和男 (国立感染研, 東京薬大・薬・免疫)

第75回日本生化学会大会, 京都, 平成14年10月14日～, カンジダ菌体由来物質誘導の血管炎モデルマウスにおける好中球の役割, 大川原明子, 大原関利章, 高橋 啓, 三浦典子, 大野尚仁, 荒谷康昭, 小山秀機, Nobuyo Maeda, 直江史郎, 鈴木和男 (国立感染研, 東邦大学大橋病理, 東京薬大・薬・免疫)

第7回 MPO 研究会, 宮崎, 平成14年10月18日～, 病原性真菌 *Candida albicans* 培養上清由来の mannoprotein-beta-glucan complex, CAWS, による冠状動脈炎の発症と機序の解析, 大野尚仁, 三浦典子, 新郷裕子, 安達禎之, 大原関利章, 高橋啓, 直江史郎, 大川原明子, 鈴木和男 (国立感染研, 東邦大学大橋病理, 東京薬大・薬・免疫)

第7回 MPO 研究会, 宮崎, 平成14年10月18日～, 免疫異常による腎臓血管傷害のイメージング, 長尾朋和, 越尾 修, 馬淵綾子, 大野尚仁, 高橋 啓, 南谷晴之, 鈴木和男 (国立感染研, 東邦大学大橋病理, 東京薬大・薬・免疫)

第7回 MPO 研究会, 宮崎, 平成14年10月18日～, 血管炎発症への活性化好中球の関与-カンジダ菌体由来物質 CAWS によって誘導される血管炎モデルマウスを用いた解析, 大川原明子, 大原関利章, 高橋 啓, 三浦典子, 大野尚仁, 荒谷康昭, 小山英機, Maeda Nobuyo, 直江史郎, 鈴木和男 (国立感染研, 東邦大学大橋病理, 東京薬大・薬・免疫)

第7回 MPO 研究会, 宮崎, 平成14年10月18日～, *Candida albicans* 菌体抽出物を用いた川崎病類似マウス動脈炎モデル, 大原関利章, 大野尚仁, 大川原明子, 直江史郎, 鈴木和男, 高橋 啓 (東邦大学大橋病理, 東京薬大・薬・免疫, 国立感染研)

「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」公開シンポジウム, 京都, 平成14年11月9日, 病原性真菌 *Candida albicans* 培養上清由来の mannoprotein- β -glucan complex, CAWS, による冠状動脈炎の発症と免疫・炎症パラメータの解析, 大野尚仁, 三浦典子, 新郷裕子, 安達禎之, 大原関利章, 高橋 啓, 直江史郎, 大川原明子, 鈴木和男 (国立感染研, 東邦大学大橋病理, 東京薬大・薬・免疫)

第32回 日本免疫学会総会, 東京, 平成14年12月4日～, *Candida albicans* 菌体外多糖 CAWS の血管炎誘発活性におけるマウス系統差とその病態形成への関与の検討, 新郷裕子, 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁, 大川原明子, 鈴木和男, 大原関利章, 高橋 啓, 直江史郎 (東京薬大・薬・免疫, 国立感染研, 東邦大学大橋病理)

H.知的財産権の出願・登録状況, なし

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

分担研究者 荒谷康昭 横浜市立大学木原生物学研究所・助教授

研究要旨

ミエロペルオキシダーゼ (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、患者の末梢血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。

A. 研究目的

炎症性疾患は感染説やストレス説など様々な説が提唱されているが、いまだ原因不明のものが多い。この疾病は特効薬が乏しいだけに深刻であり、新たな治療法の開発が急がれる。

好中球は病原微生物の感染等によって活性化されることで様々な活性酸素やプロテアーゼを産生し、E 菌等生体防御において重要な役割を担っている。一方、好中球から産生された活性酸素は正常組織にも傷害を与えて炎症性疾患を誘発している可能性が考えられるが、実際に好中球が組織傷害

に関与することを個体レベルで実証した成果は極めて少ない。

潰瘍性大腸炎は原因不明の炎症性腸疾患である。しかし、1) 大腸炎患部には白血球の顕著な浸潤が認められること、2) 患者の末梢血白血球からは活性酸素の過剰産生が認められること、3) 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疑われている。

本研究では、報告者が作製したミエロペルオキシダーゼ (MPO) のノックアウトマウスを用いて、炎症性腸疾患における好中球

由来の活性酸素の関与を個体レベルで解析することを目的とした。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。短寿命の活性酸素を生体内で追跡するのは非常に困難なので、ノックアウトマウスという遺伝学的実験材料を用いることは、炎症性疾患の発症における活性酸素の役割を個体レベルで実証するために非常に有効な研究手法である。この手法で疾患発症のメカニズムを詳細に検討することは、炎症性疾患治療のための優れたブロック抗体治療法開発のための基礎研究として位置づけられる。

B. 研究方法

実験には 8~10 週令の雄マウスを使用した。C57BL/6 マウス [MPO(+/+)] は日本 SLC から購入した。MPO ノックアウトマウス [MPO(-/-)] は、C57BL/6 マウスに戻し交配したマウスを用いた。マウスは横浜市立大学木原生物学研究所動物実験指針に準じて無菌的に飼育管理し、実験に供した。野生型 [MPO(+/+)] および MPO(-/-) マウスに大腸炎誘発剤である dextran sulfate sodium (DSS) を 5~14 日間経口投与して、実験的炎症性腸疾患を発症させた。投与開始からの生存率と大腸組織の炎症を経時的に観察した。大腸の組織標本は常法にしたがって作製し、大腸組 D からのプロテアーゼ活性は、in situ zymography で検出した。

C. 研究結果

DSS を投与した MPO(-/-) マウスの経時的な生存は野生型マウスよりも低下した。さらに、MPO(-/-) 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始めた (図 1)。浸潤細胞は好中球とマクロファージが多数であることを免疫組織的に同定した。また、炎症の進行に伴って大腸組織から産生されるプロテアーゼ活性が上昇し、その活性は MPO(-/-) マウスの方が MPO(+/) マウスよりも早期に上昇した。これらの結果から、MPO が欠損することによって実験的炎症性腸疾患が早期に誘発されることが明らかになった。

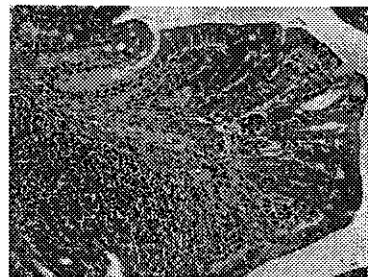


図 1 DSS を同じ期間投与した MPO(+/) マウス (上段) と MPO(-/-) マウス (下段) の大腸の HE 染色像

D. 考察

MPO を欠損するマウスは野生型マウスよりも実験的大腸炎を早期に誘発し、早期に死亡することが示された。MPO(-/-) マウス

の大腸炎患部には好中球やマクロファージがより早期に浸潤することから、浸潤したこれらの細胞が炎症の進行に関与していることが示唆された。また、炎症の i 行に伴って患部からプロテアーゼが産生されたが、MPO(-/-)マウスの方がMPO(+/-)マウスよりもプロテアーゼ産生がより早期に観察されたことから、このプロテアーゼが炎症の進行に大きく寄与している可能性が高いと考えられた。

MPO は次亜塩素酸の産生を触媒する酵素であることや、次亜塩素酸に強い細胞障害活性があることなどの理由から、MPO(-/-)マウスの方が炎症は起き難いと予想して実験を開始した。しかし、結果はその予想とは反対のものであった。今後、MPO(-/-)マウスが早期に大腸炎を発症するメカニズムを追求して真の発症機構を知ることは、ブロック抗体治療法をはじめとする優れた治療法の開発のために不可欠な研究であると考えられる。

E. 結論

MPO(-/-)マウスは野生型マウスよりも実験的大腸炎を早期に誘発することが判明し、その早期誘発機構をより詳細に解析することで、大腸炎の発症機序の解明と治療法の開発のためのモデル動物として十分に利用できると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M. C., Maeda, N., and Koyama, H.: Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 40: 1557-563 (2002)

2) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M. C., Maeda, N., and Koyama, H.: Critical role of myeloperoxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 185: 1833-1837 (2002)

2. 学会発表

1) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、Mary C. Dinauer、小山秀機：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの生体防御能異常。第75回日本生化学会大会、2002年10月(京都)

2) 道券秀雄、小山秀機、倉文明、Mary Dinauer、Nobuyo Maeda、荒谷康昭：好中球のアポトーシスにおけるミエロペルオキシ

ダーゼと NADPH オキシダーゼの関与。第 75 回 日本生化学会大会、2002 年 10 月 (京都)

3) 遠藤 良、小野洋一、菅生紀之、倉 文明、Nobuyo Maeda、Mary Dinauer、小山秀機、荒谷康昭：炎症性腸疾患における好中球由来の活性酸素の関与。第 75 回 日本生化学会大会、2002 年 10 月 (京都)

4) 高橋 啓、大原関 利章、直江 史郎、大川原 明子、鈴木 和男、荒谷 康昭：Candida albicans 菌体抽出物接種によるマウス系統的血管炎誘発モデルの病理学的検討。第 75 回 日本生化学会大会、2002 年 10 月 (京都)

5) 大川原 明子、大原関 利章、高橋 啓、三浦 典子、大野 尚仁、荒谷 康昭、小山 秀機、Nobuyo Maeda、直江 史郎、鈴木 和男：カンジダ菌体由来物質誘導の血管炎モデルマウスにおける好中球の役割。第 75 回 日本生化学会大会、2002 年 10 月 (京都)

6) 荒谷康昭、倉 文明、鈴木和男、小山秀機：Candida albicans 感染に対する生体防御におけるミエロペルオキシダーゼと NADPH オキシダーゼの重要性の比較。第 32 回 日本免疫学会学術集会、2002 年 12 月 (東京)

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

入場
無料

2002年11月9日(土)13:30-17:30 京都大学・楽友会館

<http://www.nih.go.jp/Workshop-DHD-liver/>

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」

はじめに

共催(財)日本公定書協会

開催にあたって 鈴木和男(国立感染症研究所)
医薬血液行政における人工グロブリン製剤への期待
橋爪 章(厚生労働省・血液対策課長)

1. 血管炎の発症機構の解析

座長:新井孝夫(東京理科大・理工)、大野尚仁(東京薬科大・薬)

- 1) ANCA血管炎の発症機構の解析 鈴木和男(国立感染症研・生物活性)
- 2) CADS誘導血管炎のモデル動物の作製 高橋 啓(東京医大・大橋病院・病理)
- 3) 自然発症半固形腎臓腎炎モデル:SCG/Rマウス 大川原明子(国立感染症研・生物活性)
- 4) CADS/CAWS誘導血管炎の免疫学的評価 大野尚仁(東京薬科大・薬)
- 5) 血管炎の治療に有効な治療薬/クローナル抗体作製の戦略と戦術 新井孝夫(東京理科大・理工)、橋爪 章(厚生労働省・血液対策課長)、田之倉優(東京大・院慶)
- 6) 腎臓血管傷害のイメージング 尾朋和(国立感染症研・生物活性)

2. 血管炎治療の現状

座長:直江史郎(東京医大・大橋病院)

- 1) 難治性血管炎の臨床 橋爪 章(厚生労働省・血液対策課長)、橋爪 章(東京医大・大橋病院)、橋爪 章(順天堂大・医・膠原病内科)
- 2) 川崎病におけるIVIG治療の現状 網崎富男(広島市民病院・院長)
- 3) 急性進行性腎炎の治療 武曾恵理(北野病院・腎臓内科)、赤松 明(愛媛県立病院・腎臓内科)

3. Special Lecture

座長 鈴木和男(国立感染症研究所)

Evaluation of IVIG Treatment for Systemic Vasculitis:

Requirements of Recombinant Immune Globulins for the Treatment

「グロブリンによる血管炎治療の有効性と人工化の必要性」

D. Jayne, Univ. of Cambridge, School of Clin. Med., UK

平成14年11月9日

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」

13:30-17:30 公開シンポジウム：楽友会館（京都大学）

「血管炎の発症機構解析とその治療：IVIG治療をめぐる」

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」主任研究者：鈴木和男

はじめに 13:30-13:45

開催にあたって 鈴木和男（国立感染症研究所）

医薬血液行政における人工グロブリン製剤への期待

橋爪 章（厚生労働省・血液対策課長）

1. 血管炎の発症機構の解析 13:45-15:45

座長：新井孝夫（東京理科大・理工）、大野尚仁（東京薬科大・薬）

- 1) ANCA血管炎 鈴木和男（国立感染症研・生物活性）
- 2) CADS誘導の血管炎モデル動物の作製 高橋 啓（東邦大・医・大橋病院・病理）
- 3) 自然発症半月体形成腎炎モデル：SCG/Kjマウス 大川原明子（国立感染症研・生物活性）
- 4) CADS/CAWS誘導血管炎の免疫学的評価 大野尚仁（東京薬大・薬）
- 5) 血管炎の治療に有効な抗MPOモノクローナル抗体作製の戦略と戦術
新井孝夫（東京理科大・理工）、佐々木次雄（国立感染症研・血液・安全）、
田之倉優（東京大・院農）
- 6) 腎臓血管傷害のイメージング 長尾朋和（国立感染症研・生物活性）

2. 血管炎治療の現状 15:45-16:25

座長：直江史郎（東邦大・医・大橋病院）

- 1) 難治性血管炎の臨床 橋本博史、小林茂人（順天堂大・医・膠原病内）
- 2) 川崎病におけるIVIG療法の現況 岡崎富男（広島市民病院・院長）
- 3) 急性進行性腎炎のIVIG治療
 - 3-1) 猪原登志子（京大循環病態学）武曾恵理（北野病院・腎臓内科）、
 - 3-2) 赤松 明（愛媛県立病院・腎臓内科）

16:25-16:30 休憩（5分）

3. Special Lecture 16:30-17:30

座長 鈴木和男（国立感染症研究所）

Evaluation of IVIG Treatment for Patients with Vasculitis:

Requirements of Recombinant Immunoglobulins for the treatment

「グロブリンによる血管炎治療の有効性と人工化の必要性」

Prof. D. Jayne, Univ. of Cambridge Sch. of Clin. Med., UK