

予防処置により結核罹患率を抑制しえた報告もある。今回、我々が示した結核罹患率は本邦における生物学的製剤登場前夜のものであることに意義があると考えられる。2003年7月、抗リウマチ作用を有する生物学的製剤、抗TNF α 抗体（インフリキシマブ）の投与が承認された。全例登録制であったため投与後の詳細が追跡され、インフリキシマブ投与2000症例における解析結果から、RA患者の結核罹患率(SIR)をさらに6~7倍増大させたことが明らかとなった。その原因は、生物学的製剤そのものに起因する部分と、一部発病予防措置の不十分さにあると考えられている。結核発病後の適切な加療が奏功してはいるが、我々が本疫学研究で示した結核罹患率を超えない対応が求められていると考えられる。他の感染症に関しても同様のことが予想されるが、今回の解析では不明である。次年度以降の疫学研究を考えている。

悪性疾患の発症状況に関しては、悪性疾患全体でみると一般人口における罹患率と差異を認めないが、RA患者における悪性リンパ腫のSIRはこれまでの報告同様高い傾向が示された。生物学的製剤による悪性疾患罹患リスクに関しては、これまでのところ明確な結論が出ていない。よく注目される悪性リンパ腫に関しては、他の報告同様RA特有の合併率の高さをうかがわせる結果であった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1.論文発表

1) Matsui T, Ohsumi K, Sumitomo S, Shimane K, Watanabe J, Nakayama H, Sugii S, Ozawa Y, Tohma S. Clinical Utility of the Quantitative Measurements of CD64 on Granulocytes to Distinguish Infection from a Flare of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2004 ; 50(9) : S163.

2.学会発表

1) Matsui T, Kaneko A, Eto Y, Yasuda M, Chiba N, Tohma S. National Database of Rhe

umatic Diseases by iR-net in Japan (Ninja). The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress Aplar 2004 Sep. 11-15, 2004 Jeju, Korea

2) Kaneko A, Eto Y, Matsui T, Yasuda M, Chiba N, Tohma S. The Age at Death, Duration of Illness from Onset to Death, and the Causes of Death in Deceased Patients with Rheumatoid Arthritis in Japan:1975-2000. The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress Aplar 2004 Sep. 11-15, 2004 Jeju, Korea

3) Shimada K, Matsui T, Kaneko A, Eto Y, Yasuda M, Chiba N, Tohma S. The Incidence of Tuberculosis and Malignancy in Patients with Rheumatoid Arthritis Before Use for Biologicals in Japan. The 11th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress Aplar 2004 Sep. 11-15, 2004 Jeju, Korea

4) Matsui T, Ohsumi K, Sumitomo S, Shimane K, Shimada K, Nakayama H, Sugii S, Ozawa Y, Tohma S. Clinical Utility of the Quantitative Measurements of CD64 on Granulocytes to Distinguish Infection from a Flare of Rheumatoid Arthritis. 2004 Annual Scientific Meeting of The American College of Rheumatology 2004.10.15-21 San Antonio, Texas, U.S.A.

5) Matsui T, Ohsumi K, Sumitomo S, Shimane K, Shimada K, Nakayama H, Sugii S, Ozawa Y, Tohma S. Clinical utility of the quantitative measurements of CD64 on neutrophils to distinguish infection from a flare of rheumatoid arthritis. The Awaji International Forum on Infection and Immunity. 31. August 2004, Awaji, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

RA 患者の大規模データベース J-ARAMIS を用いた RA における生物学的製剤の適応症例の検討

分担研究者 山中 寿 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授

研究要旨 関節リウマチ (RA) に対する生物学的製剤の適応は、疾患活動性が高く安全性が確保されている症例である。骨関節破壊防止のためには疾患活動性を寛解に導入することが必要であるが、生物学的製剤の用法用量が一律に決められている現状において、DAS28<3.2 の低活動性に導入しえたのは自験例のうち DAS28>5.1 の高活動性群では 17.8 %と少数であった。J-ARAMIS データを用いたシミュレーションでも厚生労働省ガイドラインの適応 (SJC \geq 6, TJC \geq 6, CRP \geq 2.0) を満たす 127 例の症状が 70%改善しても DAS28<3.2 に導入し得る例は 11.8%であった。医療経済学的検討は必要であるが、骨破壊防止が RA 治療の目的であることを考慮すると、生物学的製剤の適応を中等度活動性群 (3.2<DAS28<5.1) まで拡大すること、高活動性群にはメトトレキサート併用を有効に利用することが推奨される。

A. 研究目的

関節リウマチ (以下 RA) は、進行性に関節破壊を来し、生活の質 (QOL) を著しく低下させる疾患である。過去 20 年間の RA 研究の成果として生物学的製剤をはじめとする新たな治療手段が開発された。特に TNF α を標的とするインフリキシマブやエタネルセプトは関節破壊の進行を著しく抑制することが海外の臨床研究で明らかにされており、これら薬剤の使用により RA 患者の長期予後が著しく改善することが期待されている。

我が国でも 2003 年にインフリキシマブが RA 治療に認可されて既に 5,000 名を超える RA 患者に投与されてきた。しかしながら、RA 炎症の制御という恩恵の裏側には安全性に対する懸念があり、我が国においてはインフリキシマブ投与患者を全例登録するシステムが稼働しており、その一助として厚生労働省 3 班が作成した生物学的製剤使用ガイドラインが用いられている。これは、我が国における安全性が確立していない現状におけるインフリキシマブの広範な投与に一定の制限を与えており、その意義は大きい。しかし、インフリキシマブの安全性評価に対して一定の評価が得られ、かつ、リウマチ炎症の

徹底的な制御が関節破壊を防止することが明らかになった今、インフリキシマブをはじめとする生物学的製剤の恩恵を、単にリウマチ炎症が強い患者のみならず、もっと範囲を広げて使うべきであるとの意見が出てくるのは自然な考えである。

我々は、東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センターで実施中の、国際標準のアウトカム指標を用いた RA の患者コホート J-ARAMIS データベースを用い、我が国における生物学的製剤投与の適応の妥当性を検証することを目的とした研究を実施した。

B. 研究方法

J-ARAMIS phase 7 (2003 年 10 月) を用い、患者の臨床症状を治療により改善しえた場合の、患者の RA 活動性の変動をシミュレーションした。総解析症例は 4,404 例である。RA 活動性評価は、Disease Activity Score 28 (DAS28)を用いた。これは、欧州リウマチ学会 EURA で頻用される RA 疾患活動性指標であり、28 関節の評価により、以下の計算式で算出される。

$$\text{DAS 28} = 0.56\sqrt{\text{TJC}} + 0.28\sqrt{\text{SJC}} + 0.70 \ln \text{ESR} + 0.014 \text{GH}$$

TJC (Tender joint count) 圧痛関節数、SJC (Swollen joint count) 腫脹関節数、ESR：赤沈値 (1時間)、GH (Global health) 患者の全般状態

その上で、疾患活動性を次のように分類することができる。High = DAS28 > 5.1、Moderate = ≥ 3.2 DAS28 < 5.1、Low = DAS28 < 3.2

シミュレーションは、以下の2つのモデルを作成して実施した。

モデル1：SJC ≥ 6 、TJC ≥ 6 、CRP ≥ 2.0 を満たす症例に投与した場合

モデル2：SJC ≥ 3 、TJC ≥ 3 、CRP ≥ 1.0 を満たす症例に投与した場合

各々のモデルにおいて、DAS28の要素であるSJC、TJC、ESR、GHが各々20%、50%、70%改善した場合のDAS28分布の変化を検討した。

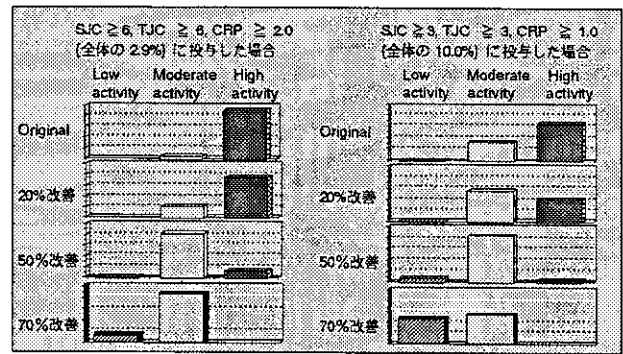
(倫理面への配慮)

患者情報の保護に関しては学内ガイドラインを遵守しており、患者調査に際しては文書による同意を取得して実施している。

C. 研究結果

J-ARAMIS phase 7 (2003年10月)に参加したRA患者4,678例中、DAS28を算出できたのは4,404 (94.1%)例であった。このうち、レミケード投与マニュアルにあるSJC ≥ 6 、TJC ≥ 6 、CRP ≥ 2.0 を満たす症例は127例 (2.9%)にすぎなかった。一方、この条件を緩和したSJC ≥ 3 、TJC ≥ 3 、CRP ≥ 1.0 を満たす症例は441例 (10.0%)であった。前者をモデル1、後者をモデル2とし、各々のモデルにおいて、DAS28の要素であるSJC、TJC、ESR、GHが各々20%、50%、70%改善した場合のDAS28分布の変化を検討した (図1)。

生物学的製剤導入による RA コントロール効果のシミュレーション
(1) 投与症例の疾患活動性に関する変化予測

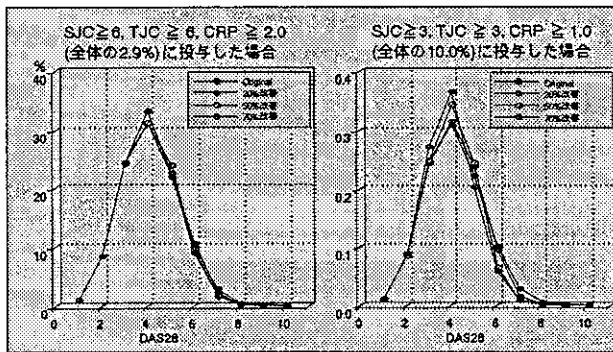


レミケード投与マニュアルにあるSJC ≥ 6 、TJC ≥ 6 、CRP ≥ 2.0 を満たす症例 (モデル1、127例) はDAS28も大きく、93.7%が高活動性群、6.3%が中等度活動性群であり、低活動性群は1例もなかった。この127例のSJC、TJC、ESR、GHを各々20%、50%、70%改善させ、DAS28の分布がどのように変化するかを検討したところ、20%改善ではほとんどの症例が高活動性群のままであり、50%改善では大部分が中等度活動性群に移行した。さらに70%改善させると、高活動性群はなくなり、ほとんどが中等度活動性群に分類できた。

次に、モデル1の選択基準を緩和し、SJC ≥ 3 、TJC ≥ 3 、CRP ≥ 1.0 を満たす症例 (モデル2、441例) を対象に検討した。モデル2では、66.0%が高活動性群、33.3%が中等度活動性群であり、0.7%が低活動性群であった。モデル1と同様に、この441例のSJC、TJC、ESR、GHを各々20%、50%、70%改善させ、DAS28分布の変化を検討したところ、20%改善で57.1%、50%改善では85.7%が中等度活動性群に移行した。さらに70%改善させると、高活動性群はなくなり、46.5%が低活動性群に移行した。

モデル1とモデル2におけるコホート全体のDAS28分布を図2に示す。モデル1では全体のDAS28分布は70%改善によってもほとんど変化としてみることができない。モデル2では高活動性群の活動性制御により70%改善で全体の分布がわずかに変貌していることがわかった。

生物学的製剤導入によるRAコントロール効果のシミュレーション
(2) 患者全体の疾患活動性に対する変化予測



D. 考察

EBMの重要性が強調され、何よりもエビデンスが重視される現在であるが、無作為対象試験（以後RCT）の結果は万能ではない。RAの臨床研究においては高活動性群のみを試験組み入れの選択基準とする場合が多く、日常診療の患者から構成された2つのコホート集団の症例は、生物学的製剤の治療選択基準にほとんど該当しないとの報告もある（Sokka T, et al. J Rheumatol. 2003;30(6):1138-46.）。EBMの前提は対象患者の同等性であり、RAに対する生物学的製剤の有効性をみた多くのRCTのデータ解釈は限界があるが、日常臨床に基づき作成されたデータベースは研究によって得られた成果を臨床に還元することができ、臨床研究の最大の目的である日常診療の改善に貢献しうる。このような背景から、我々はRAの観察研究J-ARAMISを立ち上げた。

J-ARAMISは、東京女子医大附属膠原病リウマチ痛風センターに在籍する全ての医師が、当科に通院する全てのRA患者を対象に年2回のデータ蓄積を行って作成中の患者コホートである。J-ARAMISは患者調査、医師評価、臨床検査所見の3つを統合したデータベースであり、このデータベースを軸にさまざまな臨床研究を推進中である。

今回の検討では、J-ARAMIS Phase7の4,404例のデータを用い、DAS28の構成要素の各々が20, 50, 70%改善した場合にDAS28の分布がどのように変化するかを検討することによって、生物学的製剤の適応を再検討することを試みた。その結果、厚生省3班作成の生物学的製剤使用ガイドラインにあ

る選択基準を満たす症例はわずか4,404例中わずか127例（2.7%）であり、これらの例の活動性は高く、DAS28の構成要素の各々が70%改善しても、DAS28<3.2で定義される低活動群に導入することは出来なかった。そこで、基準を緩和した選択をすると4,404例中わずか441例（10.0%）が該当したが、これらの例ではDAS28の構成要素の各々が70%改善すると、約半数の例がDAS28<3.2で定義される低活動群に導入しえた。

RAに対する生物学的製剤投与の主要な目的は、患者の症状緩和とともに骨関節破壊の防止である。後者は現時点におけるRA治療の究極の目標であるが、これを達成するためには関節炎を可及的に鎮静化させることが必要である。安全性、経済性などの問題も考慮せねばならないことは自明であるが、優れた治療手段が幅広い患者に提供されることはこれまた自明の理である。最近、欧州では生物学的製剤の選択基準が次第に緩和されている傾向が示されている（Hjardem E, et al. Ann Rheum Dis 2005;in press）。RAに対する生物学的製剤の意義が確立されるに従い、我が国のガイドラインも再検討する必要があることを常に認識するべきと考える。

E. 結論

RA患者4,404名の臨床データに基づくシミュレーションにより、生物学的製剤の効果を最大限に活用するためには、より広い症例を適応とすることが望ましいことが客観的に示された。

F. 健康危険情報

・ 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表・作成中

2. 学会発表

・ 第49回日本リウマチ学会総会（2005年4月横浜）
で発表予定

H. 知的財産権の出願・登録

・ 特になし

生物製剤による肺合併症に関する研究

分担研究者 中島 敦夫 日本医科大学 医学部 リウマチ科 助教授

研究要旨 生物学的製剤をより有効に使用するため、現在日本で使用が可能な生物学的製剤である infliximab (キメラ型抗 TNF- α 抗体) の重大な合併症のひとつである肺障害を中心に、危険因子を検討した。その結果、infliximab による肺障害の危険因子として、年齢では60才以上に肺合併症が多くみられた。併用薬として、ステロイドを高用量併用している場合には、肺炎・結核に対する注意が必要であり、MTX を高用量併用している場合には肺炎・カリニ肺炎に対する管理を厳重にすべきと考えられる。infliximab が有効であった場合には、可能な限り PSL ならびに MTX の減量を試みるべきと考えられた。

A. 研究目的

近年、生物製剤の導入により関節リウマチ (RA) の治療に変化が生じつつある。すなわち RA の病態に炎症性サイトカインである TNF α や IL-6, IL-1 β などが重要であることが明らかにされ、滑膜炎から骨破壊へと病態が進行する過程において、その上流にあると考えられる TNF α をターゲットとした治療が世界的に主流になりつつある。事実、抗 TNF α 抗体もしくは可溶性 TNF 受容体ヒト免疫グロブリンキメラ蛋白の投与が TNF α を中和することにより非常に劇的な改善をみせるケースも多く、また RA 治療の究極的な目標である骨破壊までも抑制できる可能性が示唆されている。しかし TNF などのサイトカインは RA のみならず種々の正常免疫反応においても非常に重要なサイトカインであり、その抑制により関節炎のコントロールが可能であっても、日和見感染やウイルス感染に由来する悪性腫瘍の発生など問題点も多い。実際、欧米では抗 TNF α 抗体による結核の発生や再燃が問題になっている。このように RA においてより有効な治療は結果として免疫抑制を

伴うこととなり、臨床上問題になることも多い。また患者の観点からは常に日和見感染などの副作用への不安や新しい治療にかかる医療費の問題などがあり、QOL の改善をもとめるにはまだまだ超えなければならないハードルが多い。今後、サイトカインのみならず細胞表面分子をターゲットにした新たな生物製剤も導入されると考えられ、副作用を最小限に抑え、最大限の効果をもたらすような本国における治療ガイドラインが早急に必要と考えられる。そこで生物学的製剤をより有効に使用するため、現在日本で使用が可能な生物学的製剤である infliximab (キメラ型抗 TNF- α 抗体) の重大な合併症のひとつである肺障害を中心に、危険因子を検討した。さらに当科において、自己輸入により Etanercept (TNF 受容体免疫グロブリン Fc 融合蛋白) の投与を受けている患者にみられた副作用との比較検討をおこなった。

B. 研究方法

当科で infliximab が投与された関節リウマチ患者は平成16年11月現在までに24例であ

る。当科では幸いなことに肺障害の発生は観察されていない。そこで、当科症例で infliximab を4回以上投与された患者を対象に、平成15年7月17日より平成16年11月12日までに全例調査で登録された4672例中で報告された infliximab によると考えられている肺障害（肺炎<P 群>・カリニ肺炎<C 群>・結核<Tb 群>・間質性肺炎<IP 群>）の例との背景因子の差異に関して検討した。また当科にて自己輸入により Etanercept の投与を受けている患者は13例あり、副作用の有無に関して、同様に背景因子を検討した。

（倫理面への配慮）

当科での infliximab 投与患者に対しては、その予想される効果・副作用に関し、田辺製薬からの参考資料にもとづき充分説明をおこない、了承を得た上で投与をおこなっている。肺障害患者背景因子の検討は、全例調査資料にもとづき、個人名などの個人情報の漏洩が決してないように配慮し、年齢・性別・併用薬の種類および投与量のための資料を得ている。

C. 研究結果

年齢は自験例で平均56才、P 群64才、C 群65才、Tb 群65才、IP 群63才と自験例でやや若い傾向を認めた。そのうち併用薬に関して解析可能な症例ではステロイドの投与量はプレドニゾン (PSL) 換算で、自験例で 6.91 ± 3.37 mg/日 (n=17)、P 群 7.79 ± 10.3 mg/日 (n=49)、C 群 5.91 ± 3.1 mg/日 (n=11)、Tb 群 8.64 ± 7.12 mg/日 (n=11)、IP 群 4.75 ± 3.79 mg/日 (n=22) と、P 群および Tb 群で有意に高かった。MTX は自験例で 6.24 ± 0.97 mg/週 (n=17)、P 群 7.28 ± 2.12 mg/週 (n=63)、C 群 8.19 ± 3.54 mg/週 (n=13)、Tb 群 6.91 ± 1.38 mg/週 (n=11)、IP 群 6.95 ± 1.61 mg/週 (n=28) と、P 群、C 群65才および IP 群で有意に高かった。興味深いことに、P 群、Tb 群は適切な治療により全例、軽快～改善したのに対し、IP 群では4例の死

亡が確認されていた。

死亡例はそのほとんどが間質性肺炎であったため、関節リウマチに合併する間質性肺炎の発症ならびに予後予測因子に関する検討をおこなった。KL-6 は II 型肺胞上皮細胞や呼吸細気管支上皮細胞などで産生される肺細胞抗原クラスター9 (ムチンの MUC1) に分類される高分子膜貫通糖蛋白であり、線維芽細胞の走化性因子として知られ肺胞内線維化を促進すると考えられており、間質性肺炎の指標として有用視されている。当科では関節リウマチの間質性肺障害のマーカーの一つとして KL-6 を経時的に測定しており、そこで当科の infliximab 投与群における KL-6 を解析した。その結果、現在までのところ有意な変動をみせてはいない。今後も経時的に測定をおこない、間質性肺炎の早期発見につながるか検討している。

Infliximab の効果に関する検討では、自験例では無効例（患者申告を含む）4例、infusion reaction を3例に認め、投与が中止されている。

一方、Etanercept の投与を受けている患者 (Et 群13例) は平均年齢59才、現在までにやはり重大な副作用を認めておらず、全例が半年以上投与継続されている。Et 群では PSL 5.54 ± 2.38 mg/日、MTX 4.15 ± 1.28 mg/週が投与されているが、当科での infliximab 投与群のそれと比べ、併用量が少ない傾向がみられた。多くの症例で PSL ならびに MTX の減量が可能であった。

D. 考察

以上の結果より、infliximab による肺障害の危険因子としては、68%の患者が60才以上であることから、年齢 (60才以上) が考えられた。併用薬としては、ステロイドを高用量併用している場合には、肺炎・結核に対する注意が必要であり、MTX を高用量併用している場合には肺炎・カリニ肺炎に対する管理を厳重にするべきと考えられる。それに対し、間質性肺

炎の発症に関しては、ステロイド剤が少ない傾向がみられた。

E. 結論

infiximabが有効であった場合には、可能な限りPSLならびにMTXの減量を試みるべきであり、可能でない場合には、胸部レントゲン・CT・β-D-グルカン・KL-6などを経時的に調べ、早期に肺障害を発見することが重要と考えられる。もしくはMTX 併用義務のないetanerceptへの変更を考慮することも重要と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Application of cellular gene therapy in rheumatoid arthritis.

Atsuo Nakajima, C. Garrison Fathman.

Curr. Drug Target. (in press) 2005

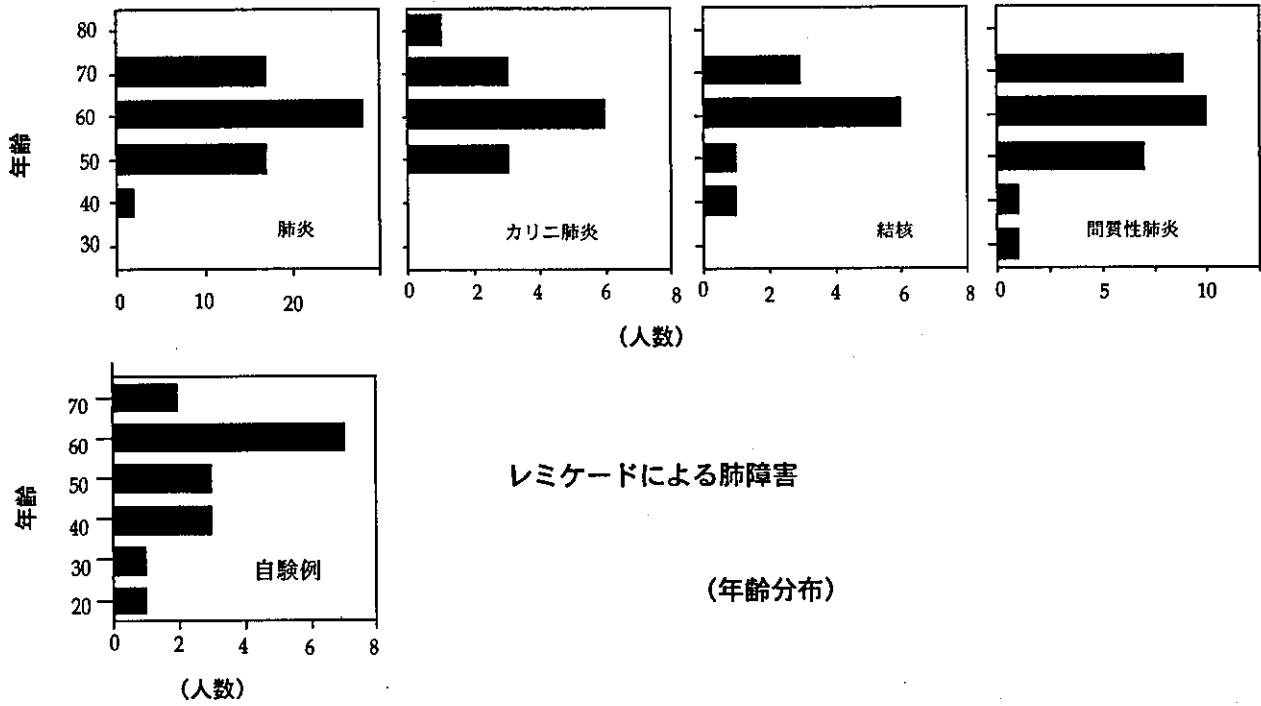
2. 学会発表

竹之内 研二、坂根 学、中島 敦夫、吉野 槇一：Infiximab 無効で Etanercept が有効であった関節リウマチの一症例。第15回日本リウマチ学会関東支部学術集会

坂根 学、中島 敦夫、吉野 槇一：関節リウマチにおける生物学的製剤 (infiximab、etanercept) の効果について。第49回日本リウマチ学会総会・学術集会/第14回国際リウマチシンポジウム

H. 知的財産権の出願・登録

特になし。



レミケードによる肺障害

(年齢分布)

レミケードによる肺障害

併用薬

	PSL (mg/day)	MTX (mg/week)
自験例	6.91±3.37 (0-10)mg/day	6.24±0.97 (4-8)mg/week
肺炎	7.79±10.3 (0-50)mg/day ***	7.28±2.12 (4-15)mg/week***
カリニ肺炎	5.91±3.1 (0-10)mg/day	8.19±3.54 (4-15.5)mg/week***
結核	8.64±7.12 (6-20)mg/day **	6.91±1.38 (6-10)mg/week
間質性肺炎	4.75±3.79 (0-10)mg/day	6.95±1.61 (6-13)mg/week*

(2004年11月12日時点登録例数4672例)

ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体による関節リウマチの治療方針の作成に関する研究

分担研究者 西本憲弘 大阪大学大学院生命機能研究科 免疫制御学講座 教授

研究要旨: ヒト化抗 IL-6 レセプター抗体、MRA (一般名 tocilizumab) が関節リウマチ (RA) の疾患活動性の改善に有効であることが臨床試験の中で明らかになった。第 II 相試験の中で、Epstein-Barr virus (EBV) の再活性化の症例が報告された。そこで、IL-6 阻害治療を受けた患者における EBV 感染の状況を検討した。RA、Castleman 病、Crohn 病の患者間で EBV 既感染率に差はなく、IL-6 阻害治療の有無においても差はなかった。EBV 再活性化の症例は血清中の EADR-IgG 抗体価が高く、かつ EBV-DNA も高値を示した。また、MRA 投与前の末梢血リンパ球が非常に減少しており、易感染状態であったと考えられた。一方、当施設で、全血中 EBV-DNA が $10^{2.5}$ copy 以上の高値を示した RA 1 例、Castleman 病 2 例では、1 年間の MRA 治療により EBV-DNA 量は減少し、うち 2 例は感度以下になった。以上の結果より、EBV 再活性化のメカニズムに関しては更なる検討を要するが、少なくともリンパ球数の減少例では生物製剤の適応の有無を慎重に検討すべきである。と思われる。

A. 研究目的

IL-6 は関節リウマチ (RA) の病態形成にかかわる炎症性サイトカインのひとつであり、IL-6 の作用を特異的に阻害するヒト化抗 IL-6 レセプター抗体、MRA (一般名 tocilizumab) が RA の疾患活動性の改善に有効であることが臨床試験の中で明らかになった。現在、長期の安全性と有効性ならびに関節破壊に対する予防効果を検討する長期投与試験と臨床第 III 相試験が行われている。本研究では、MRA を用いた RA の治療方針を確立するために、特に安全性に関する情報を検討し、ガイドラインの作成を目指す。

TNF α を阻害する薬剤は、既に欧米を中心に広く使用され、わが国においても 2003 年に承認されているが、重症感染症の発症が解決すべき重要な課題のひとつとなっている。IL-6 も免疫機能の制御に関わることから、その機能を阻害することにより、感染症が重症化する可能性がある。しかし、IL-6 は TNF α とはまったく異なる分子であり、生理作用も異なることから、MRA を用いた RA の治療方針の作成に際しては、TNF α の阻害剤とは別に検討する必要がある。

MRA の RA に対する臨床第 II 相試験の中で、

Epstein-Barr virus (EBV) の再活性化が生じ、その後多臓器不全により亡くなられた 1 症例が報告された。そこで、今年度は、RA 患者における EBV 感染の状況を検討した。

B. 研究方法

①対象症例: 治療抵抗性 RA 患者に対する臨床第 I / II 相試験ならびに第 II 相試験において MRA またはプラセボを使用された RA 患者 156 例ならびに同じく臨床第 II 相試験に参加された Castleman 病 (MCD) および Crohn 病 (CD) 患者 57 例について、インフォームドコンセントを得、EBV 関連検査を行い、EBV の感染状況の比較を行った。2001 年 12 月 6 日時点で投与中止例と継続試験に移行しない症例は除いた。

②血清中 EBV 抗体価: VCA-IgG、VCA-IgM、EADR-IgG、EBNA-IgG について蛍光抗体法にて測定した。

③EBV-DNA: 血清 (血漿) 中ならびに末梢血白血球中の EBV-DNA を PCR 法により測定した。なお EBV-DNA コピー数について cut-off 値として Kimura et

al. (Blood 2001; 98:280-286) の論文に提示された $10^{2.5}$ copy を参考にした。また、末梢血で EBV-DNA が $10^{2.5}$ copy 以上検出された症例の末梢血を B 細胞表面マーカーである CD19 に対する抗体を用いてソーティングし、B 細胞ならびに非 B 細胞の各細胞分画での EBV 感染の有無を検討した。さらに、MRA 治療継続中の患者の末梢血 EBV-DNA 量の推移について検討を加えた。

(倫理面への配慮)

臨床試験は GCP に準拠して行った。患者のインフォームドコンセントを得た上で検査を行った。

C. 研究結果

EBV 抗体について、VCA-IgG は 213 例中 208 例で検出され、陰性である 5 例では、他の抗体も検出されなかった。すなわちこの 5 例は未感染症例と考えられ全例の 2% であった。一方、VCA-IgM が陽性例は 4 例見られたが、これらの症例は直近に感染したと考えられた。VCA-IgG 抗体陽性例は RA、MCD、CD 患者群で差はなく、また、MRA の実薬投与群とプラセボ群の間でも差はなかった。VCA-IgG 陽性例は殆どが VCA-IgM 陰性かつ EBNA-IgG が陽性であり、既感染パターンを示した。亡くなられた症例は VCA-IgG が 2560 倍と高値を示したが、VCA-IgM は基準値以下であり、同様のパターンは他の症例でも認められた。

一方、全 213 例中、EADR-IgG が陽性例は 36 例で認められたが、40 倍を超える症例は亡くなられた症例を除き皆無であった。EADR-IgG においても RA、MCD、CD 患者群で差はなく、また、MRA の実薬投与群とプラセボ群の間でも差はなかった。EBNA-IgG も RA、MCD、CD 患者群で差はなく、また、MRA の実薬投与群とプラセボ群の間でも差はなかった。

全血中の EBV-DNA は RA 患者の 41 例(26%) で検出され、そのうち病的意義のある $10^{2.5}$ copy を超える症例は 7 例(4%) であった。これは他疾患における陽性 11 例(19%)、 $10^{2.5}$ copy を超える症例 2 例(4%) と比べ有意差はなかった。亡くなられた症例は臨床試験のエントリー時には全血中で 3600 コピーと高量の EBV-DNA が検出されていたが、投与直前に 590 コピーと低下し、投

与直後に 2600 コピーと再上昇をしていた。血清もしくは血漿中の EBV-DNA は全 213 例中で、唯一、亡くなられた症例でのみで MRA 投与の約 5 ヶ月前に検出されていた。すなわちこの症例では MRA 投与前に既に EBV が感染しており、しかも活発に増殖し細胞融解を生じていたと考えられる。

当施設で、全血中 EBV-DNA が $10^{2.5}$ copy 以上の高値を示した RA 1 例、Castleman 病 2 例では、1 年間の MRA 治療により EBV-DNA 量は減少し、うち 2 例は感度以下になった。また、2 例について末梢血各細胞分画での EBV-DNA を検討したところ非 B 細胞分画には EBV は検出されなかった。

MRA 治験薬投与直前の白血球数、リンパ球数、リンパ球分画を検討したところ、この症例のみがいずれの値も低値(リンパ球数 $304/\text{mm}^3$ 、CD3 $161/\text{mm}^3$ 、CD4 $59/\text{mm}^3$) であった。リンパ球が低値を示した症例は他にも見られたが、EBV-DNA が $10^{2.5}$ copy を超える症例において MRA 投与前リンパ球が $500/\text{mm}^3$ 以下になるものはなかった。亡くなられた症例は EBV のみならず、サイトメガロウイルスをはじめ他のウイルスや細菌に対しても感染リスクが高かったと考えられる。

D. 考察

今回の検討では、RA 患者での EBV 既感染率は MCD、CD 患者と比較し有意差は無く、RA において EBV 感染のリスクが特に高いとはいえない。また、MRA 使用の有無で EBV 既感染率に差は認められなかった。さらに、症例数は限られるが、IL-6 阻害により全血中の EBV-DNA は必ずしも増加しなかったことから、EBV 再活性化のメカニズムに関しては更なる検討が必要である。

しかし、この結果は必ずしも EBV に対する IL-6 阻害の安全性を示すものではなく、IL-6 阻害療法に際し、EBV 再活性化の既往例や疑い例においては積極的に EBV-DNA 量の検討、感染細胞の同定を行い、MRA の使用の是非を慎重に検討すべきである。今回の検討で亡くなられた症例はリンパ球数が MRA 投与前に既に減少しており、EBV の再活性化のみならず、他の病原微生物に対してもリスクがあったと考えられる。ま

た、IL-6 阻害のみならず、TNF α の阻害でも同様のことが起こりうると考えられる。重症の RA 患者ではメトトレキサートや免疫抑制剤が使用されており、末梢血リンパ球の減少が見られる症例も少なくない。リンパ球数は容易に行える検査であり、リンパ球数の減少例では生物製剤の適応の有無を慎重に検討すべきであると思われる。

E. 結論

EBV 再活性化のメカニズムに関しては更なる検討が必要である。リンパ球数の減少例では MRA のみならず生物製剤の適応の有無を慎重に検討すべきである。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T. Treatment of Rheumatoid Arthritis with Humanized Anti-interleukin 6 Receptor Antibody. *Arthritis Rheum* 2004, 50: 1761-69.
2. Nishimoto N, Kishimoto T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2004, 4: 386-91.
3. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, Matsumoto T, Yamamura T, Azuma J, Nishimoto N, Yoshizaki K, Shimoyama T, Kishimoto T. A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn's Disease. *Gastroenterol* 2004, 126: 989-96.
4. Kunitomi A, Konaka Y, Yagita M, Nishimoto N, Kishimoto T, Takatsuki K. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody induced long-term remission in a patient with life-threatening refractory autoimmune hemolytic anemia. *Int J Hematol* 2004, 80: 246-9.
5. Mihara M, Shiina M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Akamatsu K. Anti-interleukin-6 receptor antibody inhibits murine AA-amyloidosis. *J Rheumatol* 2004, 31: 1132-8.
6. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz

S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004, 21: 491-501.

7. Yoshio NH, Watanabe D, Adachi Y, Nishimoto N. The blockade of interleukin-6 receptor as a therapeutic strategy for chronic inflammatory diseases. *Therapy* 2004, 1: 267-75.
8. Nishimoto N. Clinical study in patients with Castleman's disease, Crohn's disease and rheumatoid arthritis in Japan. *Clin Rev Allegy and Immunol* (in press)
9. Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, Woo P, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T. Therapeutic Efficacy of Humanized Recombinant Anti-IL 6-Receptor Antibody for Children with Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum* (in press)

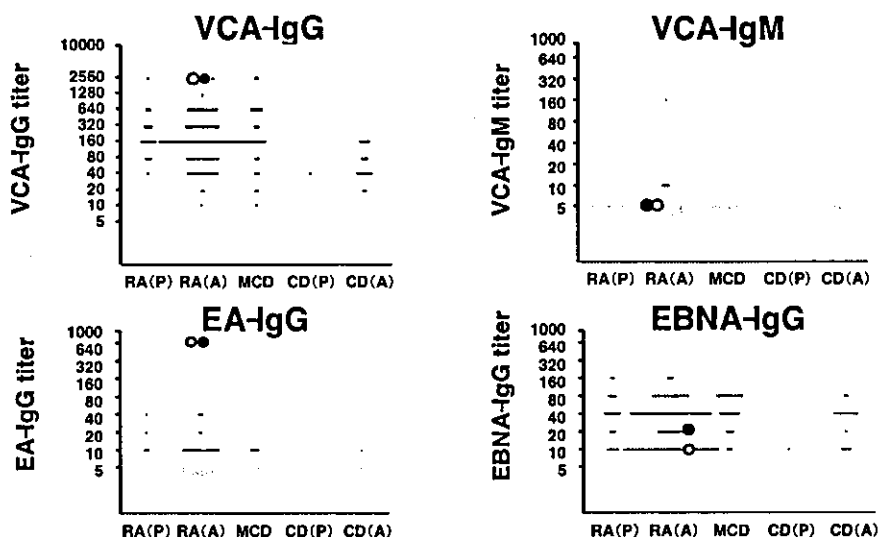
2. 学会発表

1. Nishimoto N, *et al.* Repeated treatments with anti-IL-6 receptor antibody(MRA) lead to extended clinical response rheumatoid arthritis even after cessation of MRA. ACR/ARHP 68th Annual Scientific Meeting 2004. 2004.10.16-21.
2. Nishimoto N, *et al.* Increase in serum levels of IL-6 and soluble IL-6 receptor after anti-IL-6 receptor antibody therapy in patients with rheumatoid arthritis. ACR/ARHP 68th Annual Scientific Meeting 2004. 2004.10.16-21.
3. 西本憲弘. Anti-IL-6 receptor antibody therapy for rheumatoid arthritis. 第 34 回日本免疫学会総会. 2004.12.01-03.
4. Nishimoto N. Anti-IL-6 receptor antibody therapy for immunological diseases. 2005 Keysotne Symposia-Cytokines, Disease and Therapeutic Intervention. 2004.2.12-17.

H. 知的財産権の出願・登録

特記すべきことなし。

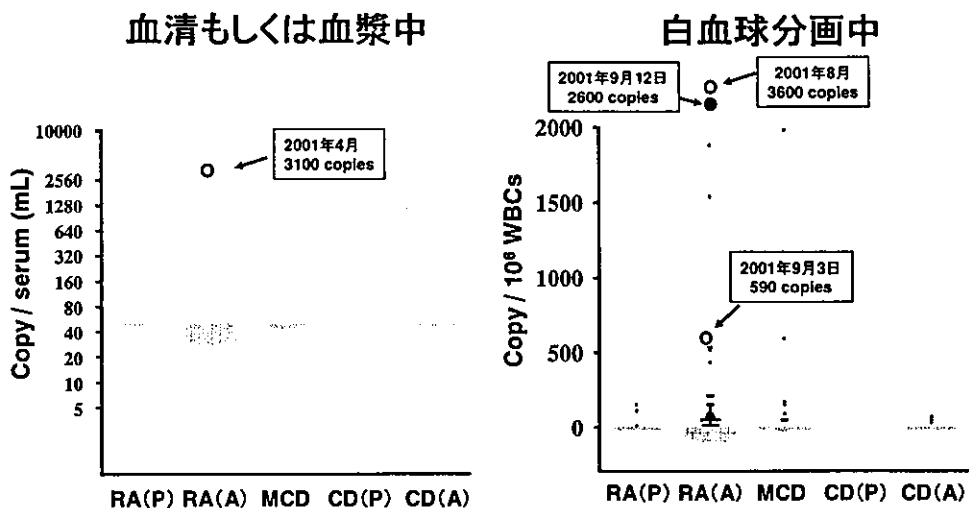
抗IL-6R抗体(MRA) 治験症例におけるEBV抗体価



EA-IgGが40倍を超えた症例はEBVの再活性化を来たした症例のみであり、VCA-IgGも高値であった。

○●:EBV再活性化を生じた症例 (○:MRA投与前 ●:MRA投与後)

抗IL-6R抗体(MRA) 治験症例におけるEBV DNA copy数



白血球中EBV-DNAが、 $10^{2.5}$ copyを超える症例はRA7例(4%)MCD2例(6%)であり、血清中でEBVが検出できた症例はEBVの再活性化を来たした症例のみであった。

関節リウマチに対する生物製剤のコントラストエコーおよびダイナミックMRIによる
効果判定法の確立に関する研究

分担研究者 小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科病態制御学講座・第二内科・教授
研究協力者 神島 保 北海道大学大学院医学研究科放射線医学分野 大学院生

研究要旨 インフリキシマブの使用前後においてコントラストエコーおよびダイナミックMRIを用いた関節内の血流量評価を試みた。エコーとMRIは半定量的にリウマチ罹患関節の血流を評価でき、生物製剤の投与でそれが変化することが確認できた。これらの検査は新しいリウマチ性滑膜炎の活動性評価法として有用である可能性があり、生物製剤の効果判定のひとつの判断基準となり

A. 研究目的

生物製剤の使用継続の適応の判断には、ある製剤のそれぞれの患者における効果をいかに評価するかが重要である。通常ACRコアセットが汎用されるが、より客観的なマーカーとして関節リウマチ (RA) の病態そのものである滑膜炎の病勢をあらわす方法の開発が必要である。我々はインフリキシマブの使用前後においてコントラストエコーおよびダイナミックMRIを用いた関節内の血流量評価を試みた。

B. 研究方法

11例のRA患者を対象に、インフリキシマブの投与前および投与6週目 (3回目投与時) において、通常関節リウマチ活動性評価にくわえてコントラストエコーおよびダイナミックMRIを施行した。コントラストエコーでは、microbubble-based ultrasound contrast agent (Lavovist)を自動注入器で静脈内投与し、手の罹患MP関節の血流を高周波マルチDリニアトランスデューサを用いてコントラストドップラー法で評価した。ダイナミックMRIではガドリニウムを手動的に静脈内ボース投与をおこない、16秒ごとに12回連続撮像をおこなった。(倫理面への配慮)

検査目的と造影剤使用に関する危険性につき事前に患者に文書で説明、同意書にサインを得た上で検査を施行した。

C. 研究結果

インフリキシマブ投与前でコントラストエコーを8例で施行し、MP関節の血流をグレード分

類した。エコーでのエンハンス効果は12MP関節中6関節で可能であった。このうち4例5MP関節で投与後のコントラストエコーと比較し、全MP関節で血流量の変化を検討可能であった。ダイナミックMRIでは、治療前11例全例で手関節のエンハンス効果を定量できた。そのうち3例で治療後の評価をおこなったところ、全例でエンハンス効果の減弱が観察できた。

D. 考察

エコーとMRIはいずれも半定量的にリウマチ罹患関節の評価が可能であるが、全体像を把握するにはMRIが、手指の関節の詳細な評価にはエコーが適している。一方で経済的負担の観点からはエコーの方が優れている。したがって、臨床的にはまずエコーで評価を試み、困難な症例についてはMRIの施行を検討することが現実的と思われる。

E. 結論

エコーとMRIは半定量的にリウマチ罹患関節の血流を評価でき、生物製剤の投与でそれが変化することが確認できた。これらの検査は新しいリウマチ性滑膜炎の活動性評価法として有用である可能性があり、生物製剤の効果判定のひとつの判断基準となりうる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Li, N., Nakamura, K., Jiang, Y., Tsurui, H., Matsuoka, S., Abe, M., Ohtsuji, M., Nishimura, H., Kato, K., Kawai, T., Atsumi, T., Koike, T., Shirai, T., Ueno, H., Hirose, S.: Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk: implications for the pathogenesis of lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 13:2 171-179.2004
 2. Yasuda, S., Atsumi, T., Ieko, M., Matsuura, E., Kobayashi, K., Inagaki, J., Kato, H., Tanaka, H., Yamakado, M., Akino, M., Saitou, H., Amasaki, Y., Jodo, S., Amengual, O., Koike, T.: Nicked β_2 -glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood*. 103:10. 3766-3772.2004
 3. Yasuda, S., Ogura, N., Horita, T., Yasuda, I., Hioka, T., Kondo, N., Fujisaku, A. Abacterial prostatitis and primary biliary cirrhosis with Sjogren's syndrome. *Mod Rheumatol* 14:70-72.2004
 4. Das, H., Atsumi, T., Fukushima, Y., Shibuya, H., Ito, K., Yamada, Y., Amasaki, Y., Ichikawa, K., Amengual, O., Koike, T.: Diagnostic value of antiagalactosyl IgG antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 23:218-222.2004
 5. Ieko, M., Tarumi, T., Takeda, M., Nito, S., Nakabayashi, T., Koike, T.: Synthetic selective inhibitors of coagulation factor Xa strongly inhibit thrombin generation without affecting initial thrombin forming time necessary for platelet activation in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2: 612-622.2004
 6. Amengual, O., Atsumi, T., Koike, T.: Antiprothrombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol* 112: 144-149.2004
 7. Yang, L., Hakoda, M., Iwabuchi, K., Takeda, T., Koike, T., Kamatani, N., Takada, K.: Rheumatoid Factors Induce Signaling from B cells, leading to Epstein-barr virus and B-cell activation. *J Virol* 78:18. 9918- 9923.2004
 8. Kataoka, H., Koike, T.: Lupus mortality in Japan. *Autoimmun Rev* 3: 421- 422.2004
 9. Xiao, S., Deshmukh, S. U., Jodo, S., Koike, T., Sharma, R., Furusaki, A., Sung, J. S., Ju, Shyr-Tu.: Novel negative regulator of expression in Fas Ligand(CD178)Cytoplasmic tail: Evidence for Translational Regulation and against Fas Ligand Retention in secretory lysosomes. *J Immunol* 173: 5095- 5102.2004
 10. Yasuda, S., Atsumi, T., Ieko, M., Koike, T.: β_2 -glycoprotein I, anti- β_2 -glycoprotein I, and fibrinolysis. *Thromb Res* 114: 461- 465.2004
 11. Astumi, T., Amengual, O., Yasuda, S., Koike, T.: Antiprothrombin antibodies-are they worth assaying? *Thromb Res* 114: 533-538.2004
 12. Bohgaki, M., Atsumi, T., Yamashita, Y., Yasuda, S., Sakai, Y., Furusaki, A., Bohgaki, T., Amengual, O., Amasaki, Y., Koike, T.: The p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti- β_2 Glycoprotein I antibodies. *Int Immunol* 16:11. 1633- 1641.2004
 13. Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E, Kaihara K, Yamamoto D, Ichikawa K, Koike T. Significance of valine/leucine²⁴⁷ polymorphism of β_2 -glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti- β_2 -glycoprotein I autoantibodies to the valine²⁴⁷ β_2 -glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum* 52:1.212-218.2005
- 2.学会発表
- 2004年9月16-18日 磁気共鳴医学会
1. 関節リウマチに対する infliximab の治療効果判定「造影超音波検査とダイナミック MRI による評価」北大・放:神島 保、丹野麻美、南部敏和、宮坂和男、北大・2内:酒井良江、櫻井典之、渥美達也、小池隆夫、北大・保健:清水 匡
 2. 2004年11月12・13日第111回日本医学放射線学会 北日本地方会「関節リウマチに対する infliximab の治療効果判定—造影超音波検査とダイナミック MRI による評価」北大・放:神島 保、丹野麻美、南部敏和、宮坂和男、北大・2内:酒井良江、櫻井典之、渥美達也 小池隆夫、北大・保健:清水 匡
 3. 2004年9月11-15日 APLAR meeting at Jeju, Korea, Effect of Treatment with Infliximab on Rheumatoid Arthritis Evaluated by Contrast-enhanced US and Dynamic MR Imaging Tamotsu Kamishima, Yoshie Sakai, Tatsuya Atsumi, Asami Tanno, Takao Koike, Kazuo Miyasaka, Toshikazu Nambu, Tadashi Shimizu, Akira Sagawa Department of Radiology, 2nd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Hokkaido University Center for Rheumatism and Collagen Vascular Disease, Sapporo Yamanoue Hospital
- H. 知的財産権の出願・登録
特記事項なし

Stage 別にみた infliximab の効果検定に関する研究

分担研究者 住田 孝之 筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学 教授

(研究要旨) 関節リウマチに対する infliximab (レミケード) の治療効果を stage ごとに評価することを目的とした。検査項目として、臨床症状、所見、臨床的マーカー、単球中サイトカイン、転写分子などの投与前値の比較、投与前後での変化を解析した。その結果、腫脹関節数、疼痛関節数、CRP、ESR などはすべての stage で改善がみられ、特に stage IV において有意に改善していた。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、TTP、STAT-1 の前値は stage により上昇する傾向がみられた。TNF- α mRNA の変化は stage により異なったが、TTPmRNA と逆相関する傾向があり、TNF- α の制御に TTP が重要であることを示唆した。さらに、全 stage において IL-1 β と IL-6 の変化が逆相関を示し、これは TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の3つのサイトカインの相互制御機構を解析する上で興味深い知見と考えられた。

A. 研究目的

新規生物学的製剤である infliximab (レミケード) による関節リウマチに対する効果を評価することは重要である。本研究では、X 線上の骨の破壊に基づく Steinbrocker の stage 分類ごとに患者を分類し、臨床的な指標、およびサイトカインや制御分子の発現について解析し、infliximab の効果を検定することを目的とした。

B. 研究方法

当科外来で infliximab 投与を施行した 20 症例 (stage I:1 名、stage II:5 名、stage III:7 名、stage IV:7 名) を対象として、stage ごとに以下の項目について検討した。方法は、infliximab 使用前 (投与前、投与後 2 週) の CRP、ESR、MMP-3、RF などの臨床マーカーと TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、tristetraprolin (TTP)、STAT-1 などのサイトカインおよび制御分子の mRNA 発現量について TaqMan PCR 法にて定量し比較した。

(倫理面への配慮)

ヒトの検体を使用する際には、大学の倫理委員会の承認を得た上で、患者さんにインフォームド・コンセントを施行し、十分に研究内容を理解していただき、ご本人の同意を得た上で研究を施行した。

C. 研究結果

1) 臨床的マーカー: (1)CRP(mg/dl): stage I: 5.1 \rightarrow 2.9, stage II: 2.0 \pm 0.92 \rightarrow 0.23 \pm 0.92, stage III: 3.73 \pm 2.02 \rightarrow 0.84 \pm 1.09, stage IV: 3.42 \pm 2.21 \rightarrow 1.36 \pm 1.76、(2)ESR(mm/h): stage I: 53 \rightarrow 55, stage II: 48.6 \pm 26.8 \rightarrow 33.2 \pm 21.8, stage III: 49.8 \pm 32.6 \rightarrow 25.4 \pm 14.5, stage IV: 59.0 \pm 33.2 \rightarrow 32.8 \pm 23.7、(3)MMP-3 (ng/ml): stage I: 380.8 \rightarrow 未, stage II: 324.4 \pm 203.4 \rightarrow 138.6 \pm 69.0, stage III: 356.0 \pm 116.9 \rightarrow 260.4 \pm 182.5, stage IV: 235.5 \pm 137.8 \rightarrow 174.2 \pm 86.6、(4)RF (IU/ml): stage I: 259 \rightarrow 未, stage II: 119.6 \pm 122.6 \rightarrow 116.2 \pm 123.1, stage III: 78.5 \pm 94.6 \rightarrow 71.7 \pm 78.5, stage IV: 153.1 \pm 245.7 \rightarrow 112.9 \pm 155.3。
2) サイトカイン等発現: (1)TNF- α : stage I: 0.797 \rightarrow 2.035, stage II: 3.228 \pm 1.68 \rightarrow 2.312 \pm 0.931,

stage III: $3.86 \pm 1.495 \rightarrow 5.083 \pm 2.374$, stage IV: $4.164 \pm 2.484 \rightarrow 3.689 \pm 2.216$, (2)TTP: stage I: $1.938 \rightarrow 1.89$, stage II: $1.539 \pm 0.989 \rightarrow 1.566 \pm 0.854$, stage III: $2.133 \pm 0.632 \rightarrow 1.497 \pm 0.431$, stage IV: $3.905 \pm 4.536 \rightarrow 1.952 \pm 1.351$, (3)IL-1 β : stage I: $7.110 \rightarrow 8.592$, stage II: $4.158 \pm 2.618 \rightarrow 5.162 \pm 1.694$, stage III: $10.063 \pm 13.801 \rightarrow 4.072 \pm 4.021$, stage IV: $17.446 \pm 29.553 \rightarrow 4.743 \pm 4.563$, (4)IL-6: stage I: $0.147 \rightarrow 0.103$, stage II: $0.620 \pm 0.572 \rightarrow 0.431 \pm 0.661$, stage III: $0.275 \pm 0.329 \rightarrow 0.413 \pm 0.252$, stage IV: $0.384 \pm 0.305 \rightarrow 0.420 \pm 0.357$, (5)STAT-1: stage I: $3.095 \rightarrow 3.005$, stage II: $2.435 \pm 0.553 \rightarrow 2.855 \pm 0.502$, stage III: $2.280 \pm 1.408 \rightarrow 2.531 \pm 1.049$, stage IV: $5.251 \pm 7.591 \rightarrow 3.107 \pm 1.300$.

D. 考察

1)腫脹関節痛、疼痛関節数においては、すべての stage において改善傾向がみられた。StageIV ではすべての項目で有意な改善がみられた。

2)臨床的マーカーの前値においては、stageII で CRP が低く、stage IV で MMP-3 が低い傾向があった。infiximab 投与前後の比較では CRP, ESR に改善がみられ、特に CRP は全ての stage において有意な改善がみられた。stage 別に大きな差異は見られなかった。

3)サイトカイン等発現においては、前値の単核球中 TNF- α , IL-1 β , IL-6, TTP, STAT-1 mRNA 量が、stage が上昇すると増加する傾向が認められた (表 1)。infiximab 投与前後の比較では、TNF- α mRNA は stage I, III で増加、stage II, IV で減少した。TTP mRNA は stage II で上昇し、stage I, III, IV で低下する傾向が認められ、TNF- α の変化は TTP と逆相関する傾向が認められた。さらに、IL-1 と IL-6 は逆相関を示した (表 2)。

E. 結論

stage I-IV の各群において、infiximab 投与による臨床症状、所見、臨床的マーカーの変動に大きな差は認められなかった。単核球中の TNF- α mRNA

は stage が大きいほど増加していることが判明した。infiximab 投与による単核球中の TNF- α mRNA 発現量の変化は stage により異なるが、その発現には TNF- α の制御分子である TTP 発現などによるネガティブフィードバック機構が大きく関わっている可能性が示唆された。また、infiximab により IL-1 β と IL-6 が逆相関していることが判明し、これは TNF- α , IL-1 β , IL-6 のサイトカインカスケードの制御機構を考える上で興味深い知見であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsutsumi, A., Adachi, Y., Murata, H., Kojo, S., Shibuya, K., Nakamura, H., and Sumida, T. GOS24, a gene that regulates TNF α production, is highly expressed in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 31:1044-1049, 2004

2) Suzuki, E., Tsutsumi, A., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., Otsu, M., Onodera, M., Takahashi, S., Sato, Y., and Sumida, T. Gene transduction of tristetraprolin or its active domain reduces TNF- α production in Jurkat T cells. (submitted)

表1

Stage 別のレミケード使用前値の比較

	TNF- α	IL-1 β	IL-6	TTP	STAT-1
Stage 1	0.797	7.11	0.147	1.938	3.096
Stage 2	3.228	4.158	0.620	1.539	2.435
Stage 3	3.860	10.063	0.275	2.133	2.280
Stage 4	4.164	17.446	0.384	3.905	5.261

表2

Stage別にみたcytokinesなどの変化 (summary)

	TNF- α	IL-1 β	IL-6	TTP	STAT-1
Stage 1	↗	↗	↘	→	→
Stage 2	↘	↗	↘	→	→
Stage 3	↗	↘	↗	↘	→
Stage 4	↘	↘	↗	↘	↘

新規抗シトルリン化ペプチド抗体アッセイ系の開発と生物製剤反応予測因子としての展開に関する研究

分担研究者 沢田哲治 東京大学 医学部 アレルギーリウマチ内科 (助手)

(背景) 抗 CCP (cyclic citrullinated peptide) 抗体をはじめ、シトルリンを含むペプチドに対する自己抗体は関節リウマチ (RA) に特異的な血清マーカーであり、RA 診断における有用性が確立されている。しかし、抗 CCP 抗体がリウマトイド関節炎の結果として産生される単なる疾患標識マーカーであるのか、あるいは PADIs によるペプチドのシトルリン化修飾や抗 CCP 抗体の出現が RA の病態形成に関与するのかは明らかではない。また、抗 CCP 抗体価は TNF α 阻害療法においても RA 疾患活動性マーカーとしての有用性は低いとする報告がある。抗シトルリン化ペプチド抗体の対応抗原としては、シトルリン化フィラグリン、シトルリン化フィブリノーゲン (α 鎖、 β 鎖) がよく知られている。RA 患者血清との反応性に抗原の種類は重要であり、例えば、シトルリン化ミエリン塩基性蛋白 (myelin basic protein) でもある程度の陽性率が得られるが、シトルリン化ウシ・アルブミンでは RA 患者血清との反応性は認められない。本研究の目的は新たな抗シトルリン化ペプチド抗体アッセイ系を作成し、抗体産生と PADI 遺伝子多型との関連を検討するとともに、抗シトルリン化ペプチド抗体価や PADI 遺伝子多型が TNF α 阻害薬への治療反応性などと関係するか否かを検討することである。シトルリン化ペプチド抗原としては、アルギニン含有率や環状性を参考に候補分子を選定する予定であるが、今回は滑膜細胞の可溶分画を抗原として用いたアッセイ系の作成を試みた。(方法) RA 患者由来の培養滑膜線維芽細胞を CHAPS バッファーで可溶化し、可溶分画を *in vitro* で PADI2 あるいは PADI4 でシトルリン化し、12 例の RA 患者血清との反応性を ELISA および western blot にて検討した。総体的なシトルリン化は Senshu 抗体 (anti-modified citrulline Antibody) にて検出した。

(結果) ELISA により、一部 RA 患者血清で抗シトルリン化ペプチド抗体活性が検出された。Senshu 抗体を用いた Western blot では、PADI 処理した滑膜細胞蛋白中に多数のシトルリン化蛋白のバンドが検出された。しかし、RA 患者血清が認識したのはそのうちの一部のバンドのみであり、それらは患者により異なる傾向があった。(考案) 今後、いくつかの抗シトルリン化ペプチド抗体アッセイ系を作成し、生物製剤投与に際して経時的に抗体価を測定し、PADI 遺伝子多型や生物製剤反応性との関連を検討したい。

A 研究目的

抗 CCP (cyclic citrullinated peptide) 抗体をはじめ、シトルリンを含むペプチドに対する自己抗体は関節リウマチ (RA) に特異的な血清マーカーであり、RA 診断、早期診断、予後予測における有用性が確立されている。抗 CCP 抗体の抗原認識にはペプチド抗原のシトルリン残基の存在が必須であるが、ペプチド

中のシトルリン残基は PADI (peptidylarginine deiminases) による翻訳後修飾の結果作られる。PADIs には PADI-1、2、3、4、6 のサブタイプがあるが (酵素活性を有するのは 1-4)、最近 PADI4 の遺伝子多型が RA 発症、並びに抗シトルリン化フィラグリン抗体産生機転と関連することが報告された。しかし、抗 CCP 抗体がリウマトイド関節炎の結果として産生

される単なる疾患標識マーカーであるのか、あるいは PADIs によるペプチドのシトルリン化修飾や抗 CCP 抗体の出現が RA の病態形成に関与するのかが明らかではない。また、抗 CCP 抗体価は TNF α 阻害療法においても RA 疾患活動性マーカーとしての有用性は低いとする報告がある。

抗シトルリン化ペプチド抗体の対応抗原としては、シトルリン化フィラグリン、シトルリン化フィブリノーゲン (α 鎖、 β 鎖) がよく知られている。RA 患者血清との反応性に抗原の種類は重要であり、例えば、シトルリン化ミエリン塩基性蛋白 (myelin basic protein) でもある程度の陽性率が得られるが、シトルリン化ウシ・アルブミンでは RA 患者血清との反応性は認められない。

本研究の目的は新たな抗シトルリン化ペプチド抗体アッセイ系を作成し、抗体産生と PADI 遺伝子多型との関連を検討するとともに、抗シトルリン化ペプチド抗体価や PADI 遺伝子多型が TNF α 阻害薬への治療反応性などと関係するか否かを検討することである。シトルリン化ペプチド抗原としては、アルギニン含有率や環状性を参考に候補分子を選定する予定であるが、今回は滑膜細胞の可溶分画を抗原として用いたアッセイ系の作成を試みた。

B. 研究方法

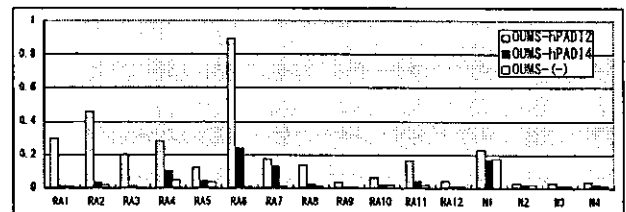
RA 患者の手術時に得られた滑膜組織から fibroblast 型の培養滑膜細胞を継代培養にて作成した。この RA 滑膜線維芽細胞を CHAPS バッファーで可溶化し、可溶分画を *in vitro* で PADI2 あるいは PADI4 でシトルリン化し、12 例の RA 患者血清との反応性を ELISA および western blot にて検討した。総体的なシトルリン化は Senshu 抗体 (anti-modified citrulline Antibody) にて検出した。

(倫理面への配慮)

今回の研究は機能解析研究である。患者由来サンプル (滑膜組織、血清) 採取にあたっては文書により、インフォームドコンセントを得て研究に用いている。

C. 研究結果

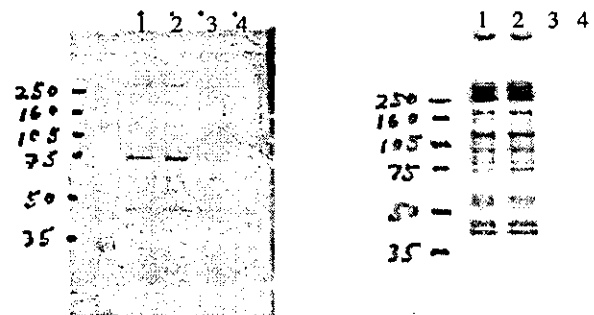
シトルリン化滑膜細胞抗原を用いた ELISA により、一部 RA 患者血清で抗シトルリン化ペプチド抗体活性が検出された。



Senshu 抗体 (anti-modified citrulline Ab) を用いた Western blot (右側) では、PADI 処理した滑膜細胞蛋白中に多数のシトルリン化蛋白のバンドが検出された。

Probed by RA-1 serum

Reprobed by Senshu Ab after stripping



1: Sigma PAD 2: h PADI2 (7.5 mU/ml)
3: hPADI2 (0.75 mU/ml) 4: EDTA instead of calcium

しかし、RA 患者血清が認識したのはそのうちの一部のバンドのみであり、それらは患者により異なる傾向があった。



Lane A: Cell lysate, deiminated *in vitro* by human PADI2
Lane B: Control; EDTA was added instead of CaCl₂

D. 考察

PADI は滑膜細胞に含まれるタンパク質の多くを基質としシトルリン化を行うことができる。しかし、そのうち自己抗原となるのは一部である。また、抗 CCP 抗体は関節リウマチの 9 割前後で陽性となるが、関節リウマチにおけるシトルリン抗原に対する

自己免疫応答は多様であり、患者ごとに重要な自己抗原の種類が異なっている可能性が考えられる。

H. 知的財産権の出願・登録
なし

E. 結論

抗CCP抗体はRA診断上有用な検査ではあるが、その対応抗原はシトルリンを含む合成ペプチドライブラリーから選別された混合ペプチドであり、生体内情報に基づくものではないため、関節リウマチの病態解明の点では必ずしも優れているとはいえない可能性がある。また、感度がよい反面、混合ペプチドが用いられていてその詳細が開示されていないため、抗CCP抗体の有無でRAを分類することが困難である。今後、いくつかの抗シトルリン化ペプチド抗体アッセイ系を作成し、その結果に基づき、RAを分類し、PADI遺伝子多型や生物製剤反応性との関連を検討したい。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・Chang X, Yamada R, Sawada T, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K. The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 44(3):293-8, 2005.

・Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhira S, Yamamoto K. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 44(1):40-50, 2005.

・沢田哲治 抗CCP抗体と関節リウマチ【自己抗体最新の進歩】 炎症と免疫(0918-8371) 12巻3号 Page317-321, 2004

2. 学会発表

・なし