

237. Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Matsuta K, Murakami Y, Hashimoto H, Tokunaga K. APRIL (TNFSF13) polymorphisms: in systemic lupus erythematosus: Independent confirmation of association with susceptibility and new association with clinical characteristics. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S120, 2004. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S203, 2004.
238. Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Suzuki T, Fukazawa T, Bejrachandra S, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K: Epistatic interaction between *CD72* and *FCGR2B* polymorphisms in conferring susceptibility to human systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S120, 2004.
239. Kusaoi M, Fukazawa T, Hirashima M, Morita Y, Morita T, Tsuchiya N, Tokunaga K, Inoko H, Hashimoto H: Genomic screening with high density microsatellite markers for systemic lupus erythematosus on chromosome 1. *Arthritis Rheum* 50(Suppl.): S121, 2004.
240. 申栄吉、土屋尚之、櫻井大祐、長谷英徳、津野寛和、高橋孝喜、小端哲二、徳永勝士 (2004) 血管内皮細胞および血管平滑筋細胞における BAFF(BLyS)発現。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p162)
241. 黒木喜美子、土屋尚之、白石充典、ラズバラリンダ、山下由美、小池隆夫、神田大輔、徳永勝士、前仲勝実 (2004) 関節リウマチ(RA)関連 Leukocyte Immunoglobulin-like receptor (LIR) 1 ハプロタイプの構造・発現解析。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p162)
242. 川崎綾、土屋尚之、深沢徹、橋本博史、徳永勝士 (2004) APRIL(TNFSF13) 遺伝子多型と SLE 発症および病態との関連の解析。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p279)
243. 人見祐基、土屋尚之、川崎綾、鈴木毅、深沢徹、Bejrachandra S, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, 橋本博史、本田善一郎、徳永勝士 (2004) SLE 感受性における ヒト CD72 遺伝子多型およびヒト FCGR2B 遺伝子多型の遺伝子間相互作用。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p279)
244. 土屋尚之、黒木喜美子、藤本学、Tedder TF, 徳永勝士、佐藤伸一 (2004) ヒト CD19 多型と強皮症との関連。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p284)
245. 宮下リサ、土屋尚之、屋部登志雄、小林茂人、橋本博史、尾崎承一、徳永勝士 (2004) KIR 遺伝子多型と顕微鏡的多発血管炎(MPA)との関連の検討。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p284)
246. 屋部登志雄、宮下リサ、八幡真人、八幡信代、Parham P, 土屋尚之、徳永勝士(2004) ヒト NK 細胞受容体 KIR, LIR 多型性と骨髄移植成績への影響。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p331)
247. 草生真規雄、深沢徹、平島美賀、守田優子、頭山尚子、土屋尚之、徳永勝士、猪子英俊、橋本博史(2004) 高密度のマイクロサテライトマーカーを用いた1番染色体における全身性エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子の解析。第34回日本免疫学会 (学術集会記録 p256)
248. 黒木喜美子、白石充典、ラズバラリンダ、土屋尚之、徳永勝士、神田大輔、前仲勝実 (2004) 関節リウマチ (RA) 関連 Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor (LIR) 1 ハプロタイプの構造・発現解析。第27回日本分子生物学会 (抄録集 p995, 3PB-407)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
1. 森下竜一 HGF 遺伝子からなる医薬

特願平 7-245475	なし
2. <u>森下竜一</u> 血管新生療法用医薬組成物 特願 2000-192480	3.その他 なし
2.実用新案登録	

〔Ⅲ〕

分科会報告
分担研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

中・小型血管炎臨床分科会平成 16 年度報告書

本邦に於ける MPO-ANCA 関連血管炎の標準的治療法の確立に関する研究

—第 2 報—

分科会長	中林公正	杏林大学	第一内科教授
班員	吉田雅治	東京医大八王子医療センター	腎臓内科助教授
	小林茂人	順天堂大学	内科学講師
	吉田俊治	藤田保健衛生大学	内科学教授
	古川福実	和歌山県立医大	皮膚科学教授
	津坂憲政	埼玉医大川越医療センター	内科学講師
	山田秀裕	聖マリアンナ医科大学	内科学助教授
	湯村和子	東京女子医科大学	腎臓内科学助教授
(研究協力者)	吉田勝美	聖マリアンナ医科大学	予防医学教授

研究要旨

目的：本邦に於ける MPO-ANCA 関連血管炎の標準的治療法の確立を目差して、当班と進行性腎障害班（班長 富野康日己）、免疫疾患合併症班（班長 橋本博史）の 3 班合同で、討議を重ね、統一的治療方針案を作成する。対象と方法：MPO-ANCA 陽性の顕微鏡的多発血管炎症例を対象とする。治療方針案は、難治性血管炎班と進行性腎障害班の既存の治療方針案を基盤とし、3 班合同で討議し、改良を重ねて結論を導いた。成績：症例を重症度より分類し、最重症例、重症例・RPGN 例、軽症例に分類した。最重症例は血漿交換療法を併用して治療する。重症例は今年の当班の治療方針案を用いる、RPGN 例は進行性腎障害班の治療方針案を用いることにした。軽症例は当班の治療方針案を用いる。以上の治療方針案で 3 班の合意が成立した。考案と結語：以上の治療方針案に従い、3 つの班の班員及び協力施設で prospective に治療を行い、生命予後、死因の解明、BVAS・VDI score の推移、疾患感受性遺伝子の同定などを検討し、治療方針案の妥当性を検討することとした。

研究目標

本邦に於ける MPO-ANCA 関連血管炎の標準的治療法の確立を目標として、当班と進行性腎障害班、免疫疾患合併症班の3班合同で、討議を重ね、統一した治療方針案を作成することにした。

研究方法

上記の3班で治療を施行するMPO-ANCA陽性の顕微鏡的多発血管炎症例を対象症例とする。治療方針案の作成は、難治性血管炎班と進行性腎障害班の既存の治療方針案を基盤とし、3班の班員で討議し、改訂を重ねて統一した標準的治療案を作成することとした。

研究結果

症例を重症度により分類し、夫々の重症度に従った標準的治療法を決定した。

A. 寛解導入療法

3～6ヵ月を要して治療する。

1.最重症型（び慢性肺出血型、重症全身性血管炎型、抗GBM抗体併存型、重症例の治療抵抗症例）

下記の重症型の治療法と共に、治療の初期より血漿交換療法（40 ml/kg/日×3間）を施行する。

2.重症型

(1) 全身性血管炎型、肺腎型

メチルプレドニゾロン（M-PSL）パルス（0.5～1.0g/日）療法×3日間、あるいはプレドニゾロ（PSL）0.6～1.0 mg/kg/日（40～60 mg/日）経口投与する。又、4週間以内に cyclophosphamide 大量点滴療法（IVCY）0.25～0.75 g/m²又は

cyclophosphamide（CY）

0.5～2.0 mg/kg/日（50～100 mg/日）の経口投与を開始し、併用療法を行う。尚、腎機能障害（血清 Cr≥1.8 mg/dl）時や60歳以上の患者では、IVCY、CYの投与量を75～50%に減量する。パルス後のPSL投与量はPSLの経口投与量に準ずる。PSL40～60 mg/日の初期投与量を1ヵ月以上続け、以後病状に応じて漸減する。IVCYの総投与回数は3～6回とする。症例により12回迄可とする。尚、IVCY投与2週間後のWBC数が3500/μl以上を保つように、投与量を調節する。経口CY投与は3～6ヵ月間とする。CYを服用できない症例ではazathioprine（AZP）を1.0～2.5 mg/kg/日（50～150 mg/日）を投与する。投与期間は6ヵ月間以上とする。上記治療期間は感染症riskが高いので、ST合剤2T/日を週2回又は1Tを連日予防的に投与する。

(2) RPGN型

血清Cr値、年齢、肺病変の有無、血清CRP値より臨床所見scoreを算出し、重症度亜区分をGrade I、II、III、IVとする。

臨床所見 (score)	血清 Cr 値 (mg/dl)	年齢	肺病変	血清 Cr 値 (mg/dl)
0	≤3.0	<60	(-)	<2.6
1	3.0~6.0	60~69		2.6~10.0
2	≥6.0	≥70	(+)	>10.0
3	透析療法			

臨床学的重症度	総 score
Grade I	0~2
Grade II	3~5
Grade III	6~7
Grade IV	8~9

a. Grade I・II、かつ非高齢者かつ非透析者

上記の重症型の治療に準じる。尚、症例により PSL 単独で治療することも可とする。PSL は 0.9 mg/kg/日以下の投与とする。CY の投与量は腎機能障害の程度に準じて減量する。

b. Grade I・II、かつ高齢者又は透析者
PSL0.6~0.8 mg/kg/日の投与量で治療する。

c. Grade III・IV、かつ非高齢者かつ非透析者

重症型の治療に準ずる。CY の投与量は腎機能障害の程度にあわせて減量する。

d. Grade III・VI、かつ高齢者又は透析者
M-PSL パルスを施行し、後療法として PSL0.6~0.8 mg/kg/日の投与を行う。CY を併用する場合は 25 mg/日より開始する。

3.軽症例

肺線維症型（肺出血は除外）、腎限局型（RPGN 型は除外）、その他型（筋・関節型、軽症全身型、末梢神経炎型など）
PSL0.3~0.6 mg/kg/日（15~30 mg/日）
経口投与する。CY 又は AZP は 0.5~1.5 mg/kg/日を適宜併用する。

B. 寛解維持療法

寛解導入療法は、PSL10~5 mg/日で再燃に注意して経過観察をする。尚、血管内腔狭窄に及び血栓形成の予防の為に、抗凝固療法（warfarin 等）、血管抗張剤（PG 等）、抗血小板（dipyridamol 等）を投与する。経口 CY 投与は計 6 ヶ月以内の投与が好ましい。以後は必要に応じて AZP の投与をとする。

考察・結語

MPO-ANCA 関連血管炎を治療する本邦の第一人者が討論を重ねて導いた治療方

針案であることから、今日の最善の治療法と考える。今後この治療方針案を臨床の場で実際に検証して行く予定である。

尚、治療方針の詳細な点に関しては、厚生労働省難治性疾患克服事業「難治性血管炎に関する調査研究班（主任研究者 尾崎承一教授）」の「MPO-ANCA 関連血管炎に対する標準的治療プロトコルの有用性を明らかにする前向き臨床試験」（2004.11.出版）の冊子を参照すること。

倫理面への配慮

MPO-ANCA 関連血管炎は重篤な疾患であり死亡例の発症する確立の高い疾患であること、又保健診療上認められていない薬剤の CY を投与して治療する必要があることから、患者及び家族に十分に説明を行い、同意を取ってから、治療を施行することにした。AZP を投与する時も、同様である。

文献

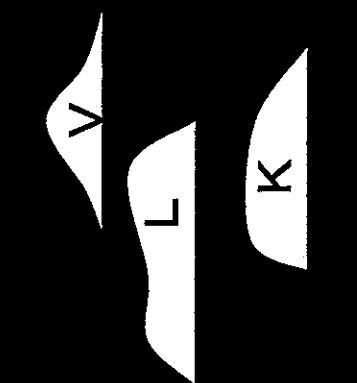
1. 難治性血管炎中・小型臨床分科会報告（分科会長 中林公正）：本邦に於ける MPO-ANCA 関連血管炎の標準的治療法の確立に関する研究。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業難治性血管炎に関する調査研究 平成 15 年度総括、分担研究報告書：21～28、2004.
2. 橋本博史、他：厚生労働省厚生科学特定疾患・難治性血管炎に関する調査研究。日臨会誌 24：336～346、2001.
3. 急速進行性糸球体腎炎診療指針作成合

同委員会：急速進行性腎炎症候群の診療指針。日腎誌 2002；44：55～82

研究発表

各委員の分担研究報告を参照
知的財産の出願・登録状況
各委員の分担研究報告を参照

L:肺出血、急性間質性肺炎 K:急性進行性糸球体腎炎 V:血管炎



全身型

肺腎型、RPGN型

ANCA ELISA(U)

1000

高値

100

低値 10

メチルプレドニゾ ロンパルス療法

0.5~1gM-PSL3日間

血液透析
血漿交換・血液吸着

ANCA

シクロホスファミド 0.5~2mg/kg/日
アザチオプリン 0.5~2mg/kg/日

シクロホスファミド静注パルス療法
▼ 0.5~0.75g/回

シクロホスファミドor
アザチオプリン
0.5~2mg/kg/日

0

6

12

18ヶ月

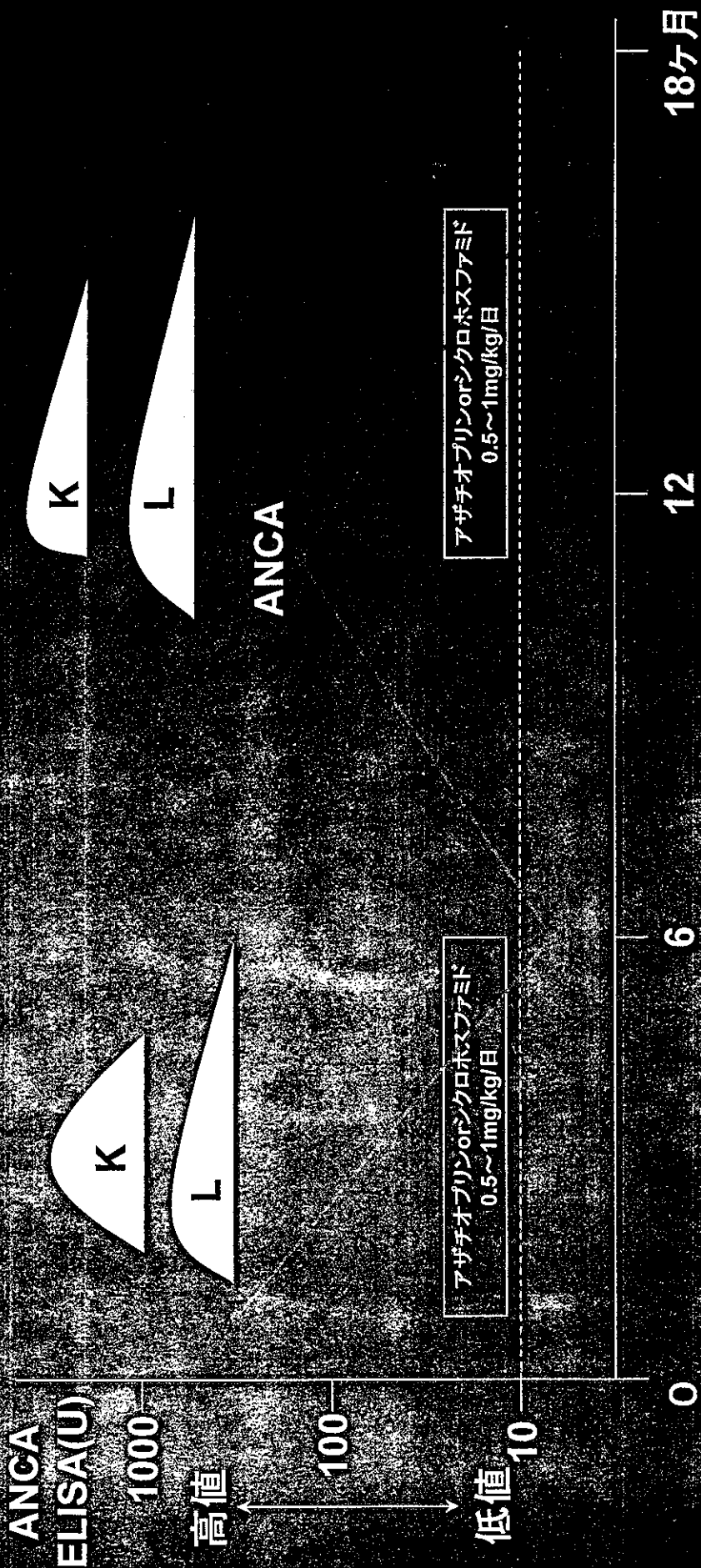
感染症対策

感染症対策

時間経過

L: 胸膜炎 肺線維症 K: 慢性腎炎 慢性腎不全

腎・肺限局型 (RPGN型、肺出血は除く)



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

Myeloperoxidase(MPO)反応性 T 細胞クローンの樹立およびフェノタイプ解析

分担研究者： 小林 茂人^{1, 2)} 順天堂大学医学部膠原病内科¹⁾・

順天堂越谷病院内科²⁾ 助教授

研究協力者：瀬田範行^{1, 3)}、桑名正隆³⁾、田嶋美智子^{1, 3)}、橋本博史^{1, 2)}

慶応大学先端医学研究所³⁾

研究要旨

MPO-ANCA 関連血管炎患者のおける MPO 反応性 T 細胞を解析するため、末梢血 T 細胞を MPO の全長をカバーする 3 種のリコンビナント蛋白 (L、HI、HII) で繰り返し刺激し、限界希釈により MPO 反応性 T 細胞クローンを樹立した。MPO と特異的に反応する CD4⁺T 細胞クローンを 5 株樹立し、そのうち 2 株は L、3 株は HII と反応した。全てのクローンは HLA-DR 又は DP 拘束性で、IFN γ を分泌する Th0/Th1 であった。TCR β CDR3 には特定のアミノ酸モチーフが検出された。今後、クローン株を増やして検討することで、MPO 反応性 T 細胞に共通した特性を同定する予定である。

A. 研究目的

近年、MPO-ANCA 関連血管炎において、MPO-ANCA が直接病態に関与する可能性が示されている。また、MPO-ANCA の産生における T 細胞の関与を示唆する間接的な証拠も報告されている。例えば、MPO-ANCA のサブクラスは主に IgG であり、時にシクロスポリンのような T 細胞をターゲットとした治療で血管炎の病勢が抑えられ、ANCA の抗体価が減少する。また、日本人における MPA と HLA-DRB1 *0901 との関連も報告されている。そこで、我々は MPO-ANCA の産生における T 細胞の役割に注目して、クローンレベルで MPO 反応性 T 細胞の解析を行

った。

B. 研究方法

MPO-ANCA 陽性血管炎患者 4 例（表 1）と健常人 1 例の末梢血 T 細胞を IL-2 の存在下で MPO の全長をカバーする 3 種のリコンビナント蛋白 (L: 軽鎖の全長 112 アミノ酸残基、HI: 重鎖 N 末端側の 227 アミノ酸残基、HII: 重鎖 C 末端側の 260 アミノ酸残基) で繰り返し刺激し、限界希釈により MPO 反応性 T 細胞クローンを樹立した。抗原刺激により誘導される増殖反応は ³H-thymidine を用いて検出した。得られた T 細胞クローンの CD4/CD8 フェノタイプを FACS により解析し、抗

DP, DQ, DR モノクローナル抗体を用いて HLA クラス II 拘束性を検討した。また、3日間 PMA とイオノマイシンで刺激した T 細胞クローンから mRNA を抽出して、RT-PCR でサイトカイン発現パターンを調べた。更に、TCRV β 遺伝子に対するプライマーを用いた family PCR により TCR β の塩基配列を解析して、CDR3 上の共通するアミノ酸モチーフを調べた。

C. 研究結果 (表 2)

1) 限界希釈により MPO-L と反応する CD4⁺T 細胞クローンを 2 株、MPO-HII と反応する CD4⁺T 細胞クローンを 3 株、計 5 株のクローンを樹立した。2) 5 株のクローンのうち 4 株は HLA-DR に拘束されており、残りの 1 株は DQ に拘束されていた。3) サイトカイン発現パターンは多様であったが、全てのクローンが IFN γ を発現しており、Th1 または Th0 のいずれかのサイトカイン発現パターンに分類された。4) V β , J β , C β の usage には共通性はなかったが、MPO-L 反応性 T 細胞クローンの TCR β CDR3 上には AGxxN モチーフが、MPO-HII 反応性 T 細胞クローンでは TGxS モチーフが見いだされた。

D. 考察と E. 結論

今回の研究で TCR β CDR3 モチーフを含めた MPO 反応性 T 細胞に共通した特性が見いだされた。樹立したクローンの数が少ないため、今後はさらにクローンの数を増やしてその結果を

集積していく必要があると思われるが、この共通した特性が治療の標的となる可能性が示された。

参考文献

1. Kuwana M *et al* : Analysis of Soluble and Cell Surface Factors Regulating Anti-DNA Topoisomerase I Autoantibody Production Demonstrates Synergy Between Th1 and Th2 Autoreactive T Cells. *J Immunol* 164 : 6138-6146, 2000
2. Tanaka Y *et al* : Efficient Induction of Human CD4⁺ T Cell Lines Reactive with a Self-K-ras-Driven Peptide In Vitro, Using a mAb to CD29. *Human Immunol* 59:343-351, 1998
3. Keith J *et al* : Characterization of cDNA clones for human myeloperoxidase: predicted amino acid sequence and evidence for multiple mRNA species. *Nuc Acids Res* 15: 2013-2028, 1987
4. Tsuchiya N *et al* : Genetic background of Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: association of HLA-DRB1*0901 with microscopic polyangiitis. *J Rheumatol.* 30: 1534-40, 2003

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akimoto T, Kobayashi S, Tamura N, Ohsawa T, Kawano T, Tanaka M, Hashimoto H. Risk factors for

- recurrent thrombosis:prospective study of a cohort of Japanese systemic lupus erythematosus (SLE). *Angiology* (in press).
2. Zhong B, Kobayashi S, Ikeda M, Akimoto T, Haruta K, Tamura N, Asakawa J, Tsuda H, Tanaka M, Kawano T, Hashimoto H. Clinical manifestations of patients withrheumatoid arthritis associated with vasculitis and/or extra-articular lesions,?hmalignant rheumatoid arthritis?h in Japan. (in preparation).
 3. Zhong B, Kobayashi S, Ikeda M, Akimoto T, Haruta K, Tamura N, Asakawa J, Tsuda H, Tanaka M, Kawano T, Hashimoto H. Inhibitory effect of Mizoribine on matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 production by production by synovial fibroblasts and THP-1 (*Mod Rheumatol*, in press).
 4. Kobayashi S, Kida I. Reactive arthritis. Recent advance and clinical manifestations. *Internal Medicine* (in Press).
 5. 小林茂人、木田一成、薬剤性腎障害 リウマチ科 31 27 2-277, 2004
 6. 小林茂人、木田一成、大動脈炎をきたす疾患 リウマチ科、31 452-457、2004
 7. 小林茂人 リウマチ医の役割と家庭医・かかりつけ医との連携、クリニカル プラクティス、8 28-831, 2004
 8. 石塚修悟、小林茂人、炎症マーカー：関節リウマチ、日本臨床、63：306-309、2005
 9. 石塚修悟、小林茂人、IgM-RF. 関節リウマチ、日本臨床、63：318-321、2005
2. 学会発表
 1. 田村直人、小林茂人、橋本博史、関節リウマチの治療、医療機器などレギュラトリーサイエンス総合研究事業、血管炎のための人工ぽポリクローナルグロブリン製剤の開発と安全性向上に関する研究、班会議 2005年1月8日、国立感染症研究所、
 2. 小林茂人 PSRA を知ってますか？<完治する関節炎> 順天堂医学 50、190-191、2004
 3. 小林茂人 リウマチ・膠原病医学の発展 神奈川リウマチ医学会のあゆみ 31-32、神奈川リウマチ医学会、2004
 4. 小林茂人、関節痛、関節リウマチについて、順天堂越谷病院第2回内科講演会、1月24日、2004
 5. 小林茂人、血管炎の診断と治療. 第48回日本リウマチ学会総会・学術集会、4月15日、2004. 岡山
 6. 小林茂人、血管炎の最近の知見、第24回愛媛免疫抑制剤研究会、11月22日、2004、松山
 7. 小林茂人、血管炎の最近の知見、第21回滋賀リウマチ・膠原病臨床医学会、平成16年2月28日、津市.
 8. 小林茂人、扁桃炎に伴う反応性関

節炎について、第 74 回大分県
リウマチ懇話会、12 月 16 日大
分県医師会、2004.

2月21日、新宿、2004年

9. 小林茂人、膠原病の生活の注意点、
第 14 回江東区膠原病友の会（秋
桜：コスモス）総会記念講演会、
10 月 10 日、江東区区民センタ
ー、2004
10. 小林茂人、これまでの研究につ
いて、順天堂膠原病内科同門会、

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案特許登録
該当なし
3. その他
該当なし

表 1

No.	diagnosis	sex	MPO-ANCA	PR3-ANCA	therapy
1	MPA	female	+	-	PSL<10mg/day cyclophosphamide 25-50mg/day
2	MPA	female	+	-	PSL<20mg/day
3	SSc	male	+	-	PSL (-)
4	undiagnosed	female	+	-	PSL (-)

表 2

Antigen	Donor	CD4/CD8 phenotype	HLA classII restriction	Gene segment			Amino acid sequence			CDR3 length (amino acids)
				V β	J β	C β	V β	N-D β -N-J β	J β	
MPO-L	patient 1	CD4 ⁺	DR	2.1	1.5	1	CS	ARVPAGISNQPQHF	GDGTRLSIL	14
	patient 3	CD4 ⁺	DR	7.2	2.4	2	CASS	QDLAGGENIQYF	GAGTRLSVL	12
MPO-HII	healthy	CD4 ⁺	DR	22.1	1.6	1	CAS	RTGQSTSPLH	GNGTRLTV	11
	patient 2	CD4 ⁺	DQ	4	2.2	2	CS	VDTGASGELFF	GEGRSLTVL	11
	patient 4	CD4 ⁺	DR	1.1	1.5	1	CASS	ATGASNQPQH	GDGTRLSIL	11

全身性血管炎症候群治療前後におけるサイトメガロウイルス産生 タンパク US27, US28 の発現検討

分担研究者 津坂憲政 埼玉医科大学総合医療センター第二内科 講師

研究要旨

サイトメガロウイルス（HCMV）感染が動脈硬化性病変を含む血管病変と関連することが指摘され、ことに血管平滑筋細胞に取り込まれた HCMV が発現する US27, US28 などのタンパクが様々なケモカインレセプターと相同性をもつために、ケモカインと結合して血管平滑筋細胞を遊走させることが病因の一つとして考えられている。本年度われわれは、Subtractive hybridization 法、RT-PCR 法を用いて顕微鏡的多発血管炎（MPA）患者の治療前後の US27, US28 mRNA 発現を検討した。その結果、US27 mRNA と US28 mRNA は治療後と比較すると治療前に発現が亢進しており、全身性血管炎発症機序を考える上で重要と考えられた。

A. 研究目的

サイトメガロウイルス（HCMV）感染が動脈硬化性病変を含む血管病変と関連することが指摘され、ことに血管平滑筋細胞に取り込まれた HCMV が発現する US27, US28 などのタンパクが様々なケモカインレセプターと相同性をもつために、ケモカインと結合して血管平滑筋細胞を遊走させることが病因の一つとして考えられている。昨年度われわれは Subtractive hybridization 法、Differential screening 法を用いて顕微鏡的多発血管炎（MPA）患者の治療前後の遺伝子変化を検討した。本年度は、この手法を用いて MPA 患者の治療前後の US27, US28 発現を検討した。

B. 研究方法

1) 研究対象者

84歳、男性。2002年3月に発熱、呼吸困難で発症。同年4月に本院入院し、間質性肺炎、腎不全、MPO-ANCA陽性よりMPAと診断された。同年4月19日よりプレドニゾロン50mg/日経口投与とサイクロフォスファミド間歇的点滴静注療法（500mg/月）が開始された。6月にカリニ肺炎併発するもその後軽快し、7月31日時点で腎機能ならびに胸部レントゲン上間質性陰影の改善が認められた。末梢血は、同年4月19日と7月31日に採取した。

（倫理面への配慮）

末梢血採取ならびにmRNA抽出にあたって、研究対象者には不利益・危険性の排除と十分な説明（インフォームドコンセント）を行い理解が得られ、また本研究での遺伝子profile解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日付 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守した。

2) mRNAの抽出

末梢血よりFicoll法を用いてリンパ球分画を抽出し、抽出した末梢血リンパ球 (PBL) からmRNA purification kit (Pharmacia社) を用いて全mRNAを抽出した。次に、全 mRNA 1 μ g を reverse transcriptase (Clontech社) を用いて一本鎖cDNAに変換後、DNA polynucleotide kinaseにより二本鎖cDNA (whole cDNA) に変換した。

3) Subtractive hybridization

1)で得られたwhole cDNAをRsaIで37°C、2時間処理し精製したものをdriver DNAとした。つぎに、このdriver DNAにadaptor1ならびにadaptor2とをそれぞれ加えて、T4 DNA ligaseで4°C一晩反応させ、driver DNAの両側にadaptorを結合させたものをそれぞれtester DNA1ならびにtester DNA2とした。

続いて、sample tester DNA1, sample tester DNA2, control driver DNAを加えてHybridization Buffer中で68°C一晩反応させ、ハイブリダイゼーションを行い得られたDNAをsample subtracted tester DNAとした。またcontrol tester DNA1, control tester DNA2, sample driver DNAを加えてHybridization Buffer中で68°C一晩反応させ、ハイブリダイゼーションを行い得られたDNAをcontrol subtracted tester DNAとした。

4)RT-PCR

subtractive hybridization で得られた subtracted tester DNA を鋳型 DNA として、US27, US28 cDNA を nested PCR によって増幅した。

C. 研究結果

MPA 患者の治療前と治療後の末梢血より PBL を抽出し、そこから全 mRNA を精製した。続いて全 mRNA を reverse transcriptase、DNA polynucleotide kinase を用いて whole cDNA に変換した。得られた whole cDNA を RsaI で処理し精製したものを治療前あるいは治療後 driver DNA とし、adaptor1 あるいは adaptor2 を T4 DNA ligase を用いて結合させたものをそれぞれ治療前あるいは治療後 tester DNA1 ならびに tester DNA2 とした。続いて、治療前 tester DNA1・tester DNA2 と治療後 driver DNA とを、治療後 tester DNA1・tester DNA2 と治療前 driver DNA とを混和させたものをそれぞれ治療前 unsubtractd tester DNA、治療後 unsubtractd tester DNA とし、ハイブリダイゼーションさせ得られた DNA をそれぞれ治療前 subtracted tester DNA、治療後 subtracted tester DNA とした。

次に、これら治療前後の subtracted あるいは unsubtractd tester DNA を鋳型 DNA として、US27, US28 cDNA を nested PCR 法で増幅した (図1)。その結果、US27 cDNA, US28 cDNA とともに治療前後の unsubtractd tester DNA ならびに治療後 subtracted tester DNA からは増幅されなかったが、治療前 subtracted tester DNA からは増幅された。

D. 考察・E. 結論

以上のことから、MPA 患者 PBL においては、治療前には HCMV が発現する US27, US28 mRNA が発現していることが示唆された。近年、HCMV 感染が血管再建術後の血管狭窄や動脈硬化性病変と関連することが指摘され、ことに血管平滑筋細胞に取り込まれた HCMV が発現する US27, US28 などの細胞表面タンパクが、Fractalkine receptor,

CCR-1, CCR-3, CCR-4などのケモカインレセプターと相同性をもつために、RANTESあるいはMCP-1などのCCケモカインと結合して血管平滑筋細胞を遊走させることが病因の一つとして考えられている。しかし、MPAを含む血管炎症候群でUS27あるいはUS28などのHCMV発現タンパクが亢進するという報告はこれまでのところまだない。血管炎症候群患者でケモカイン産生が亢進する報告がこれまですでに存在するため、ケモカインレセプターと相同性をもつUS27, US28タンパク発現を検討することは非常に意義深いと考えられた。今後は、in situ hybridizationなどの手法を取り入れて、MPA患者組織中では実際にこれらUS27, US28発現が亢進しているかどうかを検討する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

[原著]

- 1) Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T. *Int Rev Immunol* 23: 273, 2004
- 2) Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, et al. *J Immunol* (in press) 2005

[総説]

- 1) 津坂憲政、竹内勤。内科 93: 972, 2004
- 2) 津坂憲政。分子リウマチ 3: 183, 2004
- 3) 津坂憲政。最新医学 59: 2165, 2004

- 4) 津坂憲政。臨床免疫 42: 427, 2004

2. 学会発表

[海外]

- 1) Shiraishi K, Yoshimoto K, Abe T, Tsuzaka K, et al. The EULAR annual congress of rheumatology, Berlin, Germany, June, 2004
- 2) Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, et al. American College of Rheumatology, 68th ACR Annual Meeting, San Antonio, U.S.A., October, 2004

[国内]

- 1) 津坂憲政、瀬戸山由美子、吉本桂子、他。第48回日本リウマチ学会総会、2004年4月。
- 2) Tsuzaka K (国際シンポジウム) 第32回日本臨床免疫学会総会。2004年10月。
- 3) Tsuzaka K, Nozaki K, Kumazawa C, et al. 第34回日本免疫学会総会、2004年12月。

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

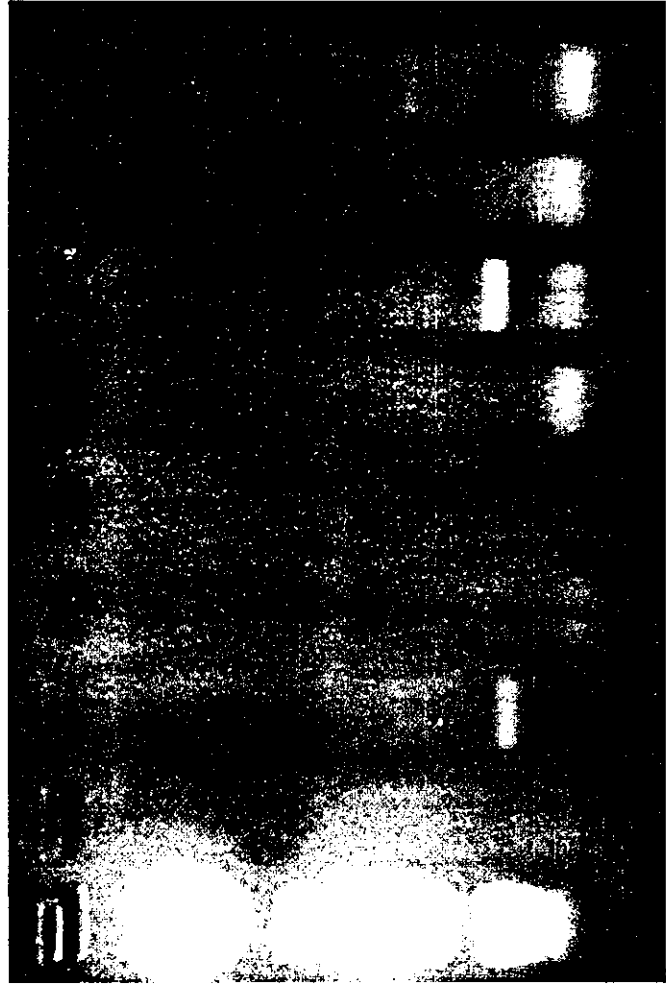
なし

図1.

US27 US28

治療前 治療後 治療前 治療後

MWM U S U S U S U S U S



(kb)

2.3 —

1.3 —

0.6 —

U: unsubtracted cDNA

S: subtracted cDNA

図表の説明文

図 1. MPA 患者治療前後の unsubtracted tester DNA (U)ならびに subtracted tester DNA (S) を鋳型 DNA として、US27 ならびに US28 cDNA cDNA 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、US27, US28 mRNA とともに unsubtracted tester DNA ならびに治療後 subtracted tester DNA では検出されなかったが、治療前 subtracted tester DNA 中に検出された。

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成 16 年分担研究報告書

MPO-ANCA 関連血管炎症例の臨床病型と生命予後、死因の臨床的解析に関する研究

分担研究者 中林公正 杏林大学第一内科教授

研究協力者 福岡利仁、有村義宏、山田 明

研究要旨

杏林大学第一内科で 1987～2004 年に治療した MPO-ANCA 関連血管炎 67 例の臨床病型と死亡時期、死因を解析した。併せて 1998 年度に難治性血管炎で全国調査をした成績と比較検討を行った。結論から述べると、両者の臨床病型、死亡時期、死因もほぼ類似した成績であった。即ち、杏林大学第一内科の腎限局型、肺腎型、全身型、その他型の症例数は、26 例、14 例、11 例、16 例（4 : 2 : 1.5 : 2.5 の比率）であった。血管炎又は治療の影響による死亡症例数は夫々 1 例、7 例、6 例、1 例（全症例で 15 例）であった。死亡時期は、肺腎型、全身型が 6 ヶ月以内の急性期であったが、腎限局型、その他型は 12 ヶ月以後の慢性期であった。死因は、全身型は 5 例は血管炎死であり、肺腎型は 3 例が血管炎、4 例が感染症死であった。その感染症も治療開始後 1 ヶ月以内から認められていた。さらに死因として血管炎又は治療の影響以外の死亡症例が 4 例存在し、その内訳は 3 例は悪性腫瘍による死亡、1 例が肺炎による感染症死であった。以上の成績は、発症直後の重症症例を如何に治療を行うか、又治療初期の感染症を如何に防止するかが重要な課題と考えられた。

A. 研究目的

杏林大学第一内科で 1987～2004 年に治療した MPO-ANCA 関連血管炎 67 例の臨床病型と死亡時期、死因を解析した。併せて 1998 年度の難治性血管炎の全国調査成績と比較検討をした。解析結果から現在の治療上の問題点を明確にした。

B. 研究方法

対象は杏林大学第一内科で 1987～2004 年に治療した MPO-ANCA 関連血管炎の 67 症例である。症例を MPO-ANCA 関連血管炎の臨床病型別に分類し、死亡時期、死因について解析した。併せて 1998 年の難治性血管炎の全国調査成績と比較検討した。

C. 研究結果

症例 67 例の臨床病型の内訳は、腎限局型 26 例、肺腎型 14 例、全身型 11 例、その他型 16 例であった。病型比率は、4 : 2 : 1.5 : 2.5 であり全国調査成績とほぼ同様であった。血管炎そのもの又は治療の影響による死亡症例数は、夫々の病型で 1 例、7 例、6 例、1 例（全症例で 15 例）であった。死亡時期は、発症後肺腎型は 0.5~6 ヲ月、平均 3.0 ヲ月であり、全身型は 2~5 ヲ月、平均 3.3 ヲ月であった。これに対し、腎限局型は 18 ヲ月、その他型は 24 ヲ月であった。死因は、全身型の 5 例が血管炎そのものによるもの、1 例が感染症によるものであった。肺腎型は 3 例が血管炎によるもの、4 例が感染症によるものであった。此れ等の症例の感染症は、治療開始後 1 ヲ月以内から発症していた。腎限局型の死亡例の 1 例は脳出血で、その他型の 1 例は肺炎で死亡していた。尚、血管炎や治療の影響以外の死亡症例が 4 例存在し、その内訳は悪性腫瘍が 3 例、肺炎が 1 例であった。尚、全国調査の成績でも、全身型、肺腎型は発症直後から 6 ヲ月以内に 45% が死亡していた。又死因では、両病型とも血管炎死が 60%、感染症死が 40% を示していた。当教室と全国調査とも、病型別による死亡比率、死亡時期、死因も類似した数値であることが示された。

D. 考察

以上の当教室と全国調査の成績は、MPO-ANCA 関連血管炎は臨床病型別に分けて、生命予後や死因を解析すること

の重要性を示している。即ち、腎限局型、肺腎型、全身型、その他型は、4 : 2 : 1.5 : 2.5 の比率で存在した。死亡率は 10 年観察で夫々 10%、40%、45%、10% に認められた。肺腎型、全身型は、発症後 6 ヲ月以内に死亡症例数が多かった。全身型は、80% は血管炎そのものによる死亡で、肺腎型は血管炎死 50%・感染症死 50% であった。これに対し、腎限局型、その他型は、発症後 12 ヲ月以上で死亡し、偶発症死であった。尚、肺腎型の感染症死亡例の感染症は治療開始後 1 ヲ月以内に発症していることが認められた。血管炎や感染症による死亡以外の死因として、悪性腫瘍が全症例の中の 5% に存在した。

E. 結語

MPO-ANCA 関連血管炎では、全身型・肺腎型の血管炎を如何に治療するか、感染症の発症を如何に予防するかが重要と考えられた。又、悪性腫瘍の発症に注意を払っていく必要があると考えられた。

G. 研究発表

1. Kimura Y, Matsuzawa S, Arimura Y, Soejima A, Nakabayashi K, Yamada A : azurocidin-specific ANCA related idiopathic necrotizing crescentic glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 2004 ; 43 : 7~10.
2. Kuroda T, Yoshida Y, Kamiie J, Kovalenko P, Nameta M, Fujinaka H, Yaoita E, Endo T, Ishizuka S, Nakabayashi K, Yamada A, Nagasawa T, Yamamoto T : Expression of MMP-9 in mesangial cells and its changes