

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

# 血管炎治療のための人工ポリクローナル グロブリン製剤の開発と安全性向上 に関する研究

(H16-医薬-070)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

鈴木 和 男

平成17（2005）年3月

# 目 次

I. 総括研究報告	
血管炎治療のための人工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	11
鈴木和男	
II. 分担研究報告	
1. MPO-ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎に対するIVIg 単独療法の免疫病態への影響に関する研究	11
武曾恵理	
2. 関節リウマチの治療-生物学的製剤インフリキシマブ使用に関する研究	23
橋本博史	
3. ラット自己免疫性心筋炎における免疫グロブリン融合タンパク治療の検討に関する研究	29
相澤義房	
4. ガンマグロブリンによる急性期川崎病における酸化ストレス (OS) マーカーの抑制効果に関する研究	33
佐地 勉	
5. <i>Candida albicans</i> 由来可溶性菌体外多糖 CAWS の生理活性に及ぼす培養条件の影響に関する研究	39
大野尚仁	
6. MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究	51
新井孝夫	
7. マウス血管炎誘発モデルを用いたヒト免疫グロブリン血管炎抑制効果の検討	55
高橋 啓	
8. 炎症疾患治療評価を行うための諸条件の検討： 好中球機能異常が関わる炎症性疾患の解析	61
荒谷康昭	
9. 量子ドットの多臓器不全診断への応用	67
山本健二	
10. 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	75
大川原明子	
11. 副作用評価に関する研究	83
鈴木章一	
III. 公開シンポジウム資料	93
IV. 班会議資料 (平成 16 年 7 月、平成 17 年 1 月)	121

V. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・133

VI. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・139



血管炎治療のための人工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

主任研究者：所属施設：国立感染症研究所 室長  
氏 名：鈴木和男

分担研究者：所属施設：(財) 田附興風会医学研究所北野病院 副所長  
氏 名：武曾恵理  
所属施設：順天堂大学 教授  
氏 名：橋本博史  
所属施設：新潟大学 教授 副病院長  
氏 名：相澤義房  
所属施設：東邦大学 教授  
氏 名：佐地 勉  
所属施設：東京薬科大学 教授  
氏 名：大野尚仁  
所属施設：東京理科大学 教授  
氏 名：新井孝夫  
所属施設：東邦大学 助教授  
氏 名：高橋 啓  
所属施設：横浜市立大学 助教授  
氏 名：荒谷康昭  
所属施設：国立国際医療センター研究所 副所長  
氏 名：山本健二  
所属施設：国立感染症研究所 主任研究官  
氏 名：大川原明子  
所属施設：長崎大学 熱帯病医学研究所 助手  
氏 名：鈴木章一

**研究要旨** 血管炎である川崎病では、その治療を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。一方、自己免疫性の血管炎である MPO・ANCA 関連血管炎は、欧米よりわが国の高齢者に発症し、近年その頻度が増してきている。本症は重篤な急速進行性糸球体腎炎をきたすことから、ステロイドパルスなど各種免疫抑制療法や対応抗原の感作療法の治療が施行されている。しかし、しばしば腎死に至り、感染症の頻発も医療経済を圧迫している。このステロイド療法のリスク軽減のため有効な免疫補助療法が切望されており、われわれのグループで行ってきた大量ガンマグロブリン製剤治療 (IVIg) 療法により、早期の疾患活動性の抑制、腎死や感染症発症頻度の低下などの有効な成績を得た。一方、血液製剤の感染リスクの軽減は常に完璧な条件を検討する必要があり、本研究では、人工グロブリン化による血液製剤の安全性と医療経済の向上推進を図った。そこで、人工グロブリン化用 Fv のライブラリーの作製と治療試験用モデルマウスを開発した。本年度は、昨年度までに作製してきた血管炎治療用の人工グロブリンのプロトタイプを見直し、新たに改良版を作製した。EBM の観点から IVIg 治療について血管炎モデルマウスに施行し、有意な有効性を確認した。また、血管炎の IVIg 治療の報告もその有効例が多くなり、まもなく、臨床試験が始まるなど治験へ一歩前進した。さらに、人工グロブリンの臨床応用の観点から、安全性について、ひきつづき、感染性因子、内因性・外因性毒素、炎症惹起分子の特定など、感染研の安全研究ガイドラインを基に安全性の確保について検討した。

## A. 研究目的

大量ガンマグロブリン製剤治療 (IVIg) は、高度高齢社会に入ったわが国において、加齢によって増加する自己免疫疾患、血管炎、リウマチなどの難治性疾患への初期治療として必要性が増している。また、高齢者には、ステロイドパルス治療は、危険性が高く、IVIg 治療への関心が高まっているが、感染リスクなどの安全性確保や高額治療のため、人工化が臨まれている。安全性が高くかつ安価な人工化 IVIg 療法が必須の状況になってきている。そこで、主任研究者らは、まず、MPO(myeloperoxidase)・ANCA 関連血管炎の治療を目的として、MPO-KO マウスに MPO を投与し、その脾臓細胞の mRNA のライブラリーから人工 Fv 抗体を作製する系を構築し、人工グロブリンの開発の基礎を築いてきた。

本研究では、その研究成果を人工 IVIg 治療用のプロトタイプとして完成させ、また、Native-IVIg の安全性をカバーする治療法として人工ガンマグロブリンを作製し、その安全性を確保することを目的にした。そこで、開発した二つの血管炎モデルマウスを用いて、治療実験を行う。その治療実験に必要な大量のヒト型およびマウス型人工ガンマグロブリンを得る。人工ガンマグロブリンは、すでに

作製したライブラリーに別途作製した Fc を加えて人工グロブリン製剤として完成させる。また、川崎病と同じプロトコルにより、血管炎・腎炎における IVIg 治療による臨床好成績を得ており、人工グロブリンの安全性の向上についても臨床サイドからの動物実験のバックアップをすることを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 臨床分科会

#### 1) IVIg の治療評価

MPO・ANCA 関連腎炎・血管炎を呈する患者を肺を含む全身症状を呈する群 (全身群) と腎症状のみを示す群 (腎限定群) とに分け、それぞれに対して、ヒトガンマグロブリン (400mg/kg/日 x 5 日間) を投与する群としない群にわけてその後ステロイドを含む免疫抑制療法の、全身群には大量を腎限定群には中等量を投与して、疾患活動性抑制の導入時期、腎機能の予後、生命予後、感染症発症の頻度等を 6 か月の時点で評価する。これらは患者のインフォームド・コンセントを文書で提出してもらい、群分けは無作為に行う。

### 2. 基礎分科会：安全性向上評価および力価判定班

#### 1) 安定性：宿主株の遺伝子安定性、発現

ベクターにおける有害遺伝子配列の否定、  
組み換えグロブリン製剤の安定性

2) 毒性試験：組み換えグロブリン製剤の  
毒性：急性、亜急性、生殖発生の毒性試験、  
抗原性、変異原性、局所刺激性、発熱  
性、不純物の毒性、加速試験

## C. 研究結果

本年度の事業計画を綿密に討議し、以下の  
結果を得た。尚、詳細な結果は、各分担研究  
者報告の項を参照。

### 1. 臨床班：

IVIg が有効的な治療として評価されてい  
る血管炎に川崎病がある。本研究では、自己  
免疫性の血管炎である MPO-ANCA 関連血管  
炎を呈する腎炎の治療法に川崎病のプロトコ  
ルの適応を検討した。人工ガンマグロブリン  
の治療にさきがけ、まず、急性進行性腎炎に  
おける IVIg を施行した。今までの少数例に  
加え、30 例近くの例数で早期の疾患活動性の  
抑制、腎死や感染症発症頻度の低下などの有  
効な成績を得た。その結果を第 11 回 ANCA ワ  
ークショップ（プラハ）および昨年 2004 年  
の第 4 回国際 Peroxidase 会議（京都）で講  
演し、高い評価を受けた。しかし、コントロ  
ール試験の必要性を指摘され、現在コントロ  
ール試験を加えたプロトコルにより、有意な  
治療法として確立する準備をしている。さら  
に、治験の準備が終わり、いよいよ臨床試験  
が開始される予定である。尚、IVIg による  
QOL の改善を経験した患者からの本治療へ  
の要望も強く、主任研究者へ手紙が寄せられ  
るなど期待が高まっている。

### (1) IVIg 治療評価

MPO-ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎に  
対する標準的治療の導入期に IVIg 療法を行  
うことで、予後の改善が得られることを本研  
究班を中心に報告してきた。その効果発現機  
序には、流血中の自己抗体の中和作用、好中  
球の活性化の抑制による活性酸素発生の抑制、  
モノサイト(Mo)の FcγR 修飾によるサイトカ  
イン産生への影響、NK 細胞機能への影響、  
抗体産生の抑制、補体活性の抑制などが考え  
られている。その後の症例の積み重ねの中で、  
IVIg の単独療法症例の効果発現の  
heterogeneity を解析することが免疫学的背景  
を探る上で重要と考えられた。さらに、これ

らの効果の評価法の探索として、好中球の  
MPO 発現、Th1 誘導性サイトカインである  
IL12 の各分画の血中濃度の変異につき検討  
したが、これらの解析により、急性活動性時  
期には、腎組織においては活動性小動脈血管  
炎の発現前に peritubular capillaritis を発症す  
る症例があることが確認され、さらに血清中  
のサイトカインの動向として、活性型である  
IL12p70 の高値を呈するものがあることも明  
らかとなった。また、IL12p70 の測定につい  
ては、各キット間で差があり、これらの解析  
が病態解明につながることも示唆された。一  
方、活性化した好中球の指標である MPO 発  
現については、わずかな変化をとらえる手法  
の開拓が、今後の好中球病態学の進展に寄与  
すると考えられた。(分担者=武曾恵理：北野  
病院)

### (2) 川崎病の IVIg 治療評価

リン脂質の過酸化が酸化ストレス (OS) に  
よるものであることが明らかになり、多くの  
心血管障害と密接に関与していることが報告  
されている。また、8-isoprostane はリン脂質  
の過酸化に特異的なかつ有用な指標であり、  
この測定が各疾患における OS の評価になる  
ことが注目されている。しかし小児領域での  
OS の正常域や疾患との関与は明らかでない。  
今回は特に全身性血管炎の急性期川崎病にお  
ける IVIg 治療による OS に及ぼす影響を明ら  
かにし、また小児期における OS の正常値と  
比較し検討した。(分担者=佐地 勉)

### (3) 新たな治療薬

関節リウマチの新たな治療薬として抗体製  
剤であるインフリキシマブがわが国でも使用  
可能となっている。メトトレキサートとの併  
用療法の効果は既存の治療の中で最も有効性  
が高いが、結核をはじめとする感染症や  
infusion reaction に注意が必要とされている。  
今回、関節リウマチ患者 11 名に投与し有効  
率は高かったが、効果が減弱する症例も認め  
られた。感染症が副作用として 2 例に認めら  
れた。(分担者=橋本博史：順天堂大・医)

## 2. 人工化グロブリン作製・安全評価分科会：

### (1) 人工化グロブリンのポリクローナル抗 体作製班

血管炎の IVIg 療法のための人工グロブリン  
化用のポリクローナル抗体の Fv のライブ

ラリー作製が完了し、Fc、CH など、必要なフラグメントの作製も終了した(図1)。完全長とIgGフラグメントの精製法も確立したことから、大量精製法を検討し、ほぼmg単位での取得が可能になった。しかし、可溶性の点で問題があることから改良型を作製した。

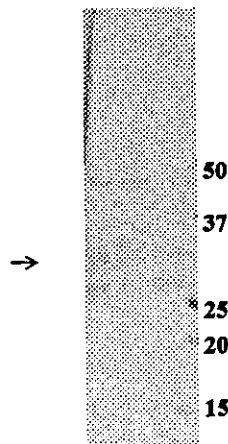


図1. 改良型 Fv の SDS-PAGE

## (2) モノクローナル MPO 抗体作製班 病態エピトープを有するモノクローナル MPO 抗体の作製

MPO-ANCA 血管炎のリスクエピトープは、MPO 中のそれぞれ 63、69、82 アミノ酸残基からなる Ha、Hb、Hg の3つの領域に存在すると考えられている。この考えを検証するために、これらの領域のペプチドを化学合成し、これらを免疫原として血管炎の発症を引き起こすモノクローナル抗体の作製を試みた。本年度は、Ha 領域と Hb 領域のペプチドに対するモノクローナル抗体の MPO 結合活性を調べた。その結果、Ha 領域ペプチドに対する抗体は MPO 結合活性を示さないのに対し、Hb 領域に対するペプチドは高い反応性を示すものが多かった。Ha 領域に対する抗体の反応性に対するひとつの解釈として、この領域の SS 結合が関連している可能性も考えられる。(分担者=新井孝夫:東京理科大)

## 3. モデル動物班・評価班:

IVIg の臨床応用にむけ、モデルマウスの開発してきた。

### (1) 川崎病様血管炎モデルマウス:

*Candida albicans* water soluble substances (CAWS) 誘導冠状動脈炎モデルマウス。これまで、*Candida albicans* IFO 1385 を完全合成

培地で培養し、その培養上清中から得られる CAWS をマウスに腹腔内投与すると川崎病類似の血管炎を発症させることを報告してきた。

### 1) 培養条件による CAWS の物性と生理活性の検討

*C. albicans* は異なる条件下で培養すると、細胞構造の変化が起こることが知られている。そこで、異なる培養条件を用いて CAWS を作成し、CAWS の物性と生理活性への培養条件の影響を解析した。その結果、培養時の pH は、CAWS の収量や糖組成、構造に影響を与えること、さらに培養条件の異なる CAWS は血管炎誘発活性も異なることが明らかとなった。培養条件は様々な合成酵素や分解酵素の発現、及び活性に影響する可能性がある。その結果として異なる構造を持った CAWS が細胞壁から放出されたと考えられた。(分担者=大野尚仁)

### 2) CAWS 誘導血管炎の初期反応の解析

CAWS の腹腔内投与によって心動脈炎を誘発するモデルにおいて、投与後初期に、末梢好中球数が急速に増加し、その機能 (MPO 放出、活性酸素産生能) が活性化することを明らかにした。動脈炎発症にいたる初期のステップにおける活性化好中球の関与が示唆された。(分担者=大川原明子:国立感染症研)

### (2) MPO-ANCA 関連血管炎モデルマウス:

(1) SCG/Kj マウスおよび (2) Bovine serum albumin (BSA) 誘導マウス。

両モデルマウスの病態を評価した。SCG/Kj マウスは、IVIg 治療モデルとして有用であることを明らかにした (Nephrology, Dialysis and Transplantation, 19:1708-1715, 2004)。また、BSA 誘導腎炎マウスの評価は終了し、有用性が高い (投稿中)。

### (3) モデルマウスによる IVIg 治療効果:

#### 1) CAWS 誘導冠状動脈炎モデルマウスの治療

CAWS 誘導冠状動脈炎モデルマウスを用いて、Native IVIg 治療を施行し、有意に有効性が確認された (表1)。また、人工化グロブリンによる治療も試行した。

CAWS によるマウス血管炎誘発モデルに対して、ヒト免疫グロブリン (*h*-IG) を投与した際の血管炎抑制効果を検討した。*h*-IG 投与により本実験系の汎血管炎発生頻度は有

意に抑制された。汎血管炎が抑制された群においては、内膜あるいは外膜に炎症が局限する個体が増加していたが、全ての個体で血管壁に何らかの炎症性変化がみられた。本実験系に *h-IG* を投与した場合、血管炎の発生を抑制することは困難であるが、汎血管炎への進展が抑制されると推測された。

(分担者=高橋啓：東邦大・医・大橋病院)

	Number of mice	Incidence (%)	
non-treatment (control)	32/37	86	
<i>h-IG</i>	8/20	40	*
high dose MPO-ANCA	4/10	40	*
low dose MPO-ANCA	5/10	50	**
single <i>h-IG</i> , 1 <sup>st</sup> day	8/10	80	
single <i>h-IG</i> , 3 <sup>rd</sup> day	7/10	70	

\*p<0.01, \*\*p<0.05

表 1. 各群における汎 CAWS 誘導血管炎発生頻度

## 2) 劇症型心筋炎モデル

当研究グループで開発したラット自己免疫性心筋炎 (EAM) は急性期には劇症型心筋炎モデルと考えられ、炎症を生き抜いた例では拡張型心筋症/心不全モデルとして、難治性に心筋炎や心不全の治療モデルとなる。我々は抗炎症作用および Th1/Th2 バランスを修飾した治療を目的に、いくつかの目的タンパクの Ig 融合タンパクを遺伝子導入によって産生させ高濃度に維持することで、それらによる著明な有効性を確認した。(分担者=相澤義房：新潟大・院医)

## 3) MPO の生体での役割の解析

紫外線 (UVB) が皮膚に照射されると、皮膚組織への好中球の浸潤やミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の増加が報告されている。このことから、UVB により誘発される皮膚炎にお

いて、浸潤してきた好中球により産生される過剰な活性酸素が皮膚組織に傷害を与えているものと考えられるがその詳細は明らかにされていない。活性化した好中球は NADPH オキシダーゼによって酸素からスーパーオキシドを、またミエロペルオキシダーゼ (MPO) によって過酸化水素から次亜塩素酸を活性に産生する。本研究では、我々が作製した MPO 欠損 (MPO-KO) マウスに加えて、NADPH オキシダーゼ欠損マウス (CGD マウス)、およびその両酵素の二重欠損マウス (MPO-KO/CGD マウス) も用いて、本炎症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した。UVB をマウスの背部に照射し、実験的皮膚炎を誘発させ、皮膚の組織病理像を比較したところ、Wild-type マウスと比較して MPO-KO マウスの方が早期に皮膚炎を進行させ、CGD マウスはより早期に、MPO-KO/CGD マウスが最も早期に皮膚炎を進行させることが明らかになった。また、皮膚に浸潤してきた炎症細胞の大半が好中球およびマクロファージであること、さらに好中球およびマクロファージの浸潤量は炎症の進行に伴い増加することを免疫組織化学染色により明らかにした。すなわち、好中球に存在する活性酸素の代謝酵素を欠損することによって紫外線誘発皮膚炎の発症が促進することが明らかとなった。(分担者=荒谷康昭：横浜市大・木原生物研)

## 4) 量子ドットを用いたグロブリンの生体内動態の解析法の開発

量子ドット (半導体ナノ粒子) を用いたナノプローブの開発とその利用による生体組織、培養細胞内の可視化技術の開発であり、ガンマグロブリンの生体内動態解析を行うことを目的とした。様々な疾患に対するガンマグロブリンによる治療過程、およびそのメカニズムについて局所高感度診断を遂行、超極限分子プローブを用いたガンマグロブリンの治療効果を評価することを示す。(分担者=山本健二：国立国際医療センター研)

## 5) 好中球の分化誘導と MPO 抗体産生にかかわる DC

樹状細胞 (DC) は自己免疫疾患に深く関与した細胞であり、人工グロブリンが DC の分化や機能に及ぼす影響を知ることはその副作用や治癒機序を明らかにするうえで重要である。その解析方法として、マウス骨髄細胞を用い



た DC 分化培養系は有用な方法である。DC は conventional DC と plasmacytoid DC とに大別されている。conventional DC の分化培養系に関しては GM-CSF を用いた骨髓細胞培養系という非常に再現性がよい系が確立されているのに対し、plasmacytoid DC に関しては Flt-3 ligand を用いた骨髓細胞培養系が報告されているものの、再現性が非常に悪く、この系で産生される DC の殆どは conventional DC であるという相反する結果が複数のグループから報告されていた。これまで得られた結果より、再現性が悪い原因として、Flt-3 ligand のヒトとマウスの由来の違いや糖鎖の有無といった質的な違いが考えられたので、マウス骨髓細胞培養系における Flt-3 ligand の質的条件を比較検討した。まず、ヒトとマウスの糖鎖結合同型 Flt-3 ligand を用いて plasmacytoid DC の分化に及ぼす影響を比較した。ヒト Flt-3 ligand を用いた場合には、観察された DC の約 30% は plasmacytoid DC であり、ウェルあたり  $1.8 \times 10^6$  個の細胞が産生されることがわかった。一方、マウス Flt-3 ligand を用いた場合にはその割合は 2% 程度であり、 $4.9 \times 10^4$  個の細胞しか産生されないことがわかった。このように、ヒトとマウスの由来の違いが、本骨髓細胞培養系における plasmacytoid DC の分化に著しい影響を与えることを明らかにした。次にマウス Flt-3 ligand の糖鎖結合同型と非結合同型を用いて比較した。その結果、糖鎖結合同型と比較し、非結合同型 Flt-3 ligand を用いた場合は、plasmacytoid DC の産生数は 3 倍程度増加することがわかった。また、conventional DC に関してはその産生数が著しく減少することがわかった。このように糖鎖が骨髓細胞培養系における各々の DC の分化に影響を及ぼす可能性も見いだした。これらの発見により DC の新たな分化機構を提示すると共に人工グロブリンが plasmacytoid DC の分化や機能に及ぼす影響を解析することを容易にした。次に、plasmacytoid DC は conventional DC の分化を制御する Interferon Regulatory Factor-4 (IRF-4) を発現していることから、IRF-4 が plasmacytoid DC の分化や機能も調節している可能性が考えられたので、plasmacytoid DC の分化における IRF-4 の必要性を IRF-4 欠損マウスを用いて調べた。この結果、脾臓の plasmacytoid DC の数は IRF-4 欠損マウスで減少していないことがわかった。しかし、

Flt-3 ligand を用いた骨髓細胞培養系においては IRF-4<sup>-/-</sup> 骨髓細胞より産生される plasmacytoid DC の数が約半分まで減少していた。この結果から、IRF-4 が plasmacytoid DC の分化に関与していると考えられると同時に、IRF-4 の機能を補う機構が存在することが示唆された。(分担者=鈴木章一:長崎大・熱帯医研)

### 3. 安全試験班:

現在施工中の動物実験に使用している人工グロブリンの安全性は、感染性因子、内因性・外因性毒素、炎症惹起分子の特定など、感染研の安全研究ガイドラインを基に新たな安全性の確保を検討し、原案を協議した。

### D. 考察

われわれを中心として施行した IVIg による血管炎治療試験が好成績を得た。その背景は、MPO-ANCA 関連血管炎が、ヨーロッパより日本で発症数が多く、日本での血管炎に適した IVIg 治療が求められていた。これまでの川崎病の治療法を適用してきた日本での治療実績が、血管炎の有効な治療法として確立できる段階まで来た。また、血管患者は高齢者であるので、IVIg 治療により、ステロイド投与量を少なくしてその危険性の軽減することができるようになった。しかし、ガンマグロブリンの需要は増え、感染症などのリスクを軽減し、医療経済の点からも人工化することが今日的急務となっていた。本研究において、人工ガンマグロブリンを開発し新しい治療法として確立するとともに、安全性を十分確保をすることをめざしてきており、本年度の研究において、血管炎治療用の人工グロブリンのプロトタイプに改良を加えた。IVIg 治療法の EBM の観点から、モデルマウスで治療を実施し、その有意な有効性を認めた。また、臨床応用の観点から、人工グロブリンの安全性について、感染性因子、内因性・外因性毒素、炎症惹起分子の特定など、感染研の安全研究ガイドラインを基に安全性の確保についても検討できた。

以上から、当初の目標はクリアし、モデルマウスの結果、臨床研究の報告、人工化グロブリンの作製法について論文掲載した(投稿中も含む)。また、臨床および基礎班での来年度においてもひきつづき、本研究事業を通じて、国民の保健・医療ならびに効率的な医療経済に応えるようにしたい。

## 参考資料（別紙）

1. わが国とヨーロッパでの IVIG 治療の安全性の確保。日英での血管炎の相違の検討：日英一血管炎の疫学調査研究（国際シンポジウム）

2. 川崎病急性期の治療ガイドライン

## E. 結論

血管炎である川崎病では、IVIg 治療に変えてから重篤な病態は激減した。本研究事業において、自己免疫性の血管炎である MPO-ANCA 関連血管炎である重篤な急速進行性糸球体腎炎においてステロイド療法のリスク軽減のため IVIg 療法により、早期の疾患活動性の抑制、腎死や感染症発症頻度の低下などの有効な成績を得た。血液製剤の感染リスク軽減など改善のため、本研究では、人エグロブリン化による血液製剤の安全性の向上推進を図った。人エグロブリン化用 Fv のライブラリーの作製と治療試験用モデルマウスを開発した。本年度は、モデルマウスでの IVIg 治療法の有意な有効性を認めた。また、血管炎治療用に製剤として使用できる人エグロブリンの改良を行い、治療を行った。さらに、人エグロブリンの安全性の確保について検討した。

尚、本プロジェクトは、分担者研究に加え、以下の協力研究者の協力を得た。

## 協力研究者（アドバイザーを含む）

### 1) 臨床班

小野孝彦（静岡県立大・薬、教授）  
深津敦司（京都大・附属病院・腎臓内科、講師）  
今井圓裕（大阪大・院・病態情報内科、講師）  
湯村和子（東京女子医科大・四内、助教授）  
山崎 力（東京大・院医、教授）  
有村義宏（杏林大・医・助教授）  
胡麻田学（山口大・医・医員）

### 2) IVIg の治療評価・安全性評価

佐々木次雄（国立感染研・血液—安全性、室長）  
古谷昌弘（積水化学・水無瀬研究所、主任研究員）  
宇野賀津子（財ルイ・パストゥール医学研セ・

室長）

### 3) アドバイザー

仁保喜之（九州大学医学部名誉教授、千早病院長）  
直江史郎（東邦大学医学部名誉教授）  
岡崎富男（広島市民病院長）  
中山俊憲（千葉大大学院医学研究院教授）  
David Jayne（英国ケンブリッジ大顧問）

## F. 健康危険情報

今年度は、特になし。

## G. 研究発表（主任研究者分のみ）

### 1. 論文発表

1. T. Oharaseki, Y. Kameoka, F. Kura, A.S. Persad, K. Suzuki, S. Naoe. Susceptibility loci to coronary arteritis in animal model of Kawasaki disease induced with *Candida albicans*-derived substances. *Microbiol. Immunol.* 49: 181-189, 2005.
2. A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, S. Nakayama, M. Suga, Y. Yamaguchi, K. Suzuki, K., M. Yasuhara, K. Yamamoto. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells *Microbiol. Immunol.* 48: 985-994, 2004
3. N. Nagai-Miura, Y. Shingo, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S. Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Induction of Coronary Arteritis with Administration of CAWS (*Candida albicans* Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 26:527-543, 2004.
4. Y. Kameoka, A. S. Persad and K. Suzuki. Genomic variations in myeloperoxidase gene in the Japanese population. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: S12-13, 2004
5. Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, M.C. Dinauer, N. Maeda, and H. Koyama. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn. J. Infect. Dis.*

- 57: S15, 2004
6. E. Muso, T. Ito-Ihara, T. Ono, E. Imai, K. Yamagata, A. Akamatsu, K. Suzuki. Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: S17-18, 2004
  7. Shiohara A, Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, and Yamamoto K. On the cyto-toxicity caused by quantum dots. *Microbiol.Immunol.*48:669-676, 2004.
  8. Ito, M., Nagata, N., Yumoto, F., Yamagoe, S., Suzuki, K., Adachi, K. and Tanokura, M.:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  resonance assignments of the cytokine LECT2. *Journal of Biomolecular NMR* 29:543-544, 2004.
  9. C. Ovejero, C. Cavard, A. Perianin, T. Hakvoort, J. Vermeulen, C. Godard, M. Fabre, P. Chafey, K. Suzuki, B. Romagnolo, S. Yamagoe, C. Perret. Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin2 (LECT2) as a direct target gene of  $\beta$ -catenin in the liver. *Hepatology* 40:167-176, 2004.
  10. T. Saito, A. Okumura, H. Watanabe, M. Asano, A. Ishida-Okawara, J. Sakagami, K. Sudo, Y. Hatano-Yokoe, T. Abo, Y. Iwakura, K. Suzuki, and S. Yamagoe. Increase of Hepatic NKT Cells in LECT2-Deficient Mice Contributes to Severe Concanavalin A-Induced Hepatitis. *J Immunol.* 173:579-585, 2004.
  11. S. Suzuki, K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, K. Yamamoto, K. Miyazaki, M. Nakamura, K. Yu, A. Kumatori. Critical roles of Interferon regulatory factor-4 in CD11b<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> dendritic cell development *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:8981-8986, 2004.
  12. A. Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, E. Muso, T. Ono, K. Saiga, K. Nemoto, K. Suzuki. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrol., Dial. Transplant.* 19:1708-1715, 2004.
  13. Ohashi, Y.Y., Kameoka, Y., Persad, A.S., Kohi, F., Yamagoe, S., Hashimoto, K., and Suzuki, K.. Novel missense mutation found in Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene* 327: 195-200, 2004.
  14. Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K., Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 314: 46-53, 2004.
- 和文発表
1. 鈴木和男「バイオイメージングが切り開く新たな診断・治療評価技術」医学のあゆみ 210 巻 171
  2. 長尾朋和、鈴木和男「血管炎初期反応のイメージング」医学のあゆみ 210 巻 196-199
  3. 長尾朋和、村山 研、越尾 修、大野尚仁、三浦典子、高橋 啓、馬淵綾子、南谷晴之、鈴木和男 腎臓血管傷害のイメージング *PharmaMedica*22: 185-189, 2004 (医療薬学雑誌)
2. 学会発表
- 国際会議
1. Kazuo Suzuki, Eri Muso, Shigeto Kobayashi, Toshiko Ito-Ihara, David Scott, Richard Watts, Oliver Flossmann, Suzanne Lane, and David Jayne. Japan-UK Vasculitis Epidemiology Study - First meeting, Emmanuel College, Cambridge, UK
  2. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M., Maeda, N., and Koyama, H: In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. The 4th international Peroxidase Meeting, October, 2004 (Japan).
  3. Suzuki K, Muso E, Nauseef WM: Contribution of peroxidases in host-defense, diseases and cellular functions. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004.10.27-30 (Kyoto)
  4. Muso E, Ito-Ihara T, Ono T, Imai E, Yamagata K, Akamatsu A, Suzuki K: Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA

related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan 2004. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004.10.27-30, Kyoto

5. Akiyoshi Hoshino, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Masato Yasuhara, Taeko Dohi, Kenji Yamamoto, and Kazuo SUZUKI Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots · MPO expressed on surface of activated neutrophils with Quantum dot-conjugated antibody. 4th International Peroxidase Meeting. Oct 27-30, 2004, Kyoto

#### 国内会議

1. 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 血管炎における活性化好中球の CD69 分子 第 3 4 回京都腎臓免疫研究会、京都、5 月 22 日
2. 宇野賀津子、猪原登志子、田原佐知子、田中麻理、米本智美、塚本達雄、深津敦司、鈴木和男、岸田綱太郎、武曾恵理 腎炎患者における末梢血リンパ球分画の IL12/IL18 への反応性の検討 第 3 4 回京都腎臓免疫研究会、京都、5 月 22 日
3. 猪原登志子、小野孝彦、深津敦司、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 15 例における治療効果と 6 ヶ月予後の検討。第 47 回日本腎臓病学会学術総会。平成 16 年 5 月 27 日。栃木
4. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、村田久雄、高橋 啓 カンジダ誘導マウス動脈炎モデルにおける動脈炎成立過程の組織学的検討 第 93 回日本病理学会総会、2004/6/9-11、札幌
5. 鈴木和男 活性化好中球による血管炎発症への関与—MPO·ANCA による糸球体内皮細胞傷害—生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004 年 6 月 17 18 日 (沖縄)
6. 長尾朋和、松村実美子、馬淵綾子、越尾修、南谷晴之、鈴木和男 MPO·ANCA の糸球体内皮細胞への作用 生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004 年 6 月 17 18 日 (沖縄)
7. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼと真菌感染 生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004 年 6 月 17 18 日、(沖縄)
8. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、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機能 第 26 回日本フリーラジカル学会学術集会、2004 年 6 月 24 25 日 (山形)
9. 大原関利章、高橋 啓、三浦典子、大川原明子、村山 研、土田和徳、金城義明、金子健二、大野尚仁、鈴木和男 川崎病類似マウス系統的動脈炎モデルにおけるヒト免疫グロブリンの治療効果の検討 第 40 回日本小児循環器学会総会、抄録、2004/6/30~7/2、東京
10. 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 第 1 5 回日本生体防御学会 (長崎)「血管炎における活性化好中球の CD69 分子」
11. 長尾朋和、松村実美子、馬淵綾子、越尾修、南谷晴之、鈴木和男「MPO·ANCA による糸球体内皮細胞の粘着分子 Up-regulation」 第 1 5 回日本生体防御学会 (長崎) 鈴木和男 第 1 1 回代替血液学会 (札幌)「免疫グロブリンの血管炎抑制効果と人工化」
12. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋 啓、岡村春樹、大野尚仁、鈴木和男「血管炎を誘導する CAWS 投与初期のマウス好中球活性化とサイトカインの変動」第 6 9 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 (三沢)
13. 小野孝彦、猪原登志子、劉寧、北徹、雑賀寛、根本久一、武曾恵理、大川原明子、鈴木和男 第 16 回腎とフリーラジカル研究会 (京都)「好中球活性化、活性酸素産生とフィブリン沈着を介した SCG/Kj マウスにおける半月体形成機序」
14. Youhei Koshimizu, Satoshi Yamagoe, Kazuo Suzuki, and Michiko Ohtomi. "Expression and localization of LECT2 in mouse brain 第 27 回日本神経科学会・第 47 回日本神経化学会合同大会 (大阪)

15. Akiyoshi Hoshino, Ken Murayama, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Noriko N. Miura, Naohito Ohno, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, and Kazuo Suzuki. MPO Expressed on the Surface of Activated Neutrophils with Quantum Dot-conjugated Antibody. 第13回バイオイメージング学会学術集会 11/4-6、京都)
16. H. Sankawa, Y. Kameoka, N. Miura, N. Ohno, and K. Suzuki. Gene Expression in Splenocyte Response to CAWS Injection of Two Murine Strains. The 4th International Peroxidase Meeting Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004. 11. 15 京都
17. 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男 cDNA マイクロアレイによる血管炎惹起物質 C. albicans 由来菌体外多糖 第34回日本免疫学会総会・学術集会 2004. 12. 01 札幌
18. 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男 cDNA マイクロアレイ解析による血管炎に關与する炎症性分子の遺伝子発現 第27回日本分子生物学会年会 2004. 12. 08 神戸

G. 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

## MPO-ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎に対する IVIg 単独療法の免疫病態への影響に関する研究

分担研究者 武曾恵理 田附興風会医学研究所北野病院 研究所副所長・腎臓内科部長  
協力研究者 古宮俊幸<sup>1</sup>、猪原登志子<sup>1, 2, 3</sup>、深津敦司<sup>2</sup>、小野孝彦<sup>6</sup>、宇野賀津子<sup>3</sup>  
岸田綱太郎<sup>3</sup>、星野昭芳<sup>4</sup>、山本健二<sup>4</sup>、鈴木和男<sup>6</sup>

1. 田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科
2. 京都大学大学院医学研究科循環器病態学
3. 京都ルー・パスツール医学研究センター
4. 国立国際医療センター研究所
5. 国立感染症研究所・生物活性部
6. 静岡県立大学薬学部

### 研究要旨

MPO-ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎に対する標準的治療の導入期に IVIg 療法を行うことで、予後の改善が得られることを本研究班を中心に報告してきた。その効果発現機序には、流血中の自己抗体の中和作用、好中球の活性化の抑制による活性酸素発生の抑制、モノサイト (Mo) の FcγR 修飾によるサイトカイン産生への影響、NK 細胞機能への影響、抗体産生の抑制、補体活性の抑制などが考えられている。その後の症例の積み重ねの中で、IVIg の単独療法症例の効果発現の heterogeneity を解析することが免疫学的背景を探る上で重要と考えられた。さらに、これらの効果の評価法の探索として、好中球の MPO 発現、Th1 誘導性サイトカインである IL12 の各分画の血中濃度の変異につき検討したが、これらの解析により、急性活動性時期には、腎組織においては活動性小動脈血管炎の発現前に peritubular capillaritis を発症する症例があることが確認され、さらに血清中のサイトカインの動向として、活性型である IL12p70 の高値を呈するものがあることも明らかとなった。また、IL12p70 の測定については、各キット間で差があり、これらの解析が病態解明につながることも示唆された。一方、活性化した好中球の指標である MPO 発現については、わずかな変化をとらえる手法の開拓が、今後の好中球病態学の進展に寄与すると考えられた。

### A. 研究目的

ANCA 関連血管炎患者に対する IVIg 単独療法 (400mg/kg/日、5 日間) を行ってきた結

果として後療法としてのスプリントを比較的少量にすることが可能となり、現在その evidence の確立を進めている。一方、IVIg

療法に反応の悪い症例・比較的早期に再燃する患者も存在し、本研究では、これらの治療反応性の heterogeneity の免疫学的背景を新規患者4名において免疫病理学的に解析する。さらに他症例も合わせて、その血中サイトカイン動態の検討を行い、好中球の活性化動態を新規検索法の開発や、IL12測定キットの解析を通して疾患の病態を明らかにし、IVIg療法の効果発現機序の解明を深める。

## B. 研究方法

### 方法1：症例の解析

ANCA関連血管炎患者4名にIVIg単独療法をおこない、IVIg前後のCRP・Crの変化について検討した。また、その後に必要としたステロイドの量、免疫抑制剤投与の必要性の有無、感染症の合併の有無について検討した。さらに、各症例の、臨床的特徴、腎生検組織所見などを提示し、IVIg著効例と無効例の違いについても検討した。

(倫理面への配慮) 治療プロトコルに際する説明と同意を得た。

方法2：血中遊離MPO、各種サイトカインの動態ならびに好中球表面上へのMPOの発現のQdot結合抗MPO抗体による検討

1) IVIg療法を行ったMPO-ANCA関連腎炎(患者群, n=12)におけるIVIg治療前後と健常人コントロール(健常群, n=12)の血漿中TNF-alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p40+p70), IL-18, IFN-gamma, MCP-1をELISAにて測定。患者群治療前後(n=12)と健常群(n=12)の血漿MPOをRIAにて測定した。サイトカイン測定にはBiosource International社のELISA kitを用い、血漿MPO測定にはPharmacia社のMPO RIA radioimmunoassay kitを用い

て測定した。

2) 患者1:81歳女性。患者2:67歳男性。患者3:88歳女性。3例とも血清MPO-ANCAが陽性で、腎生検にてANCA関連腎炎と診断し、IVIg療法を行った。3例における治療前、IVIg治療後においてヘパリン化全血を採取。同時に健常人からも全血を採取。Mono-Poly Resolving Mediumにて好中球を分離( $2 \times 10^6$  cells/ml in HBSS)。37°C, 10分加温した分離好中球を、rubber wellで37°C, 10分incubate。PBS洗浄後、FMLP( $10^{-6}$ M)で刺激またはHBSS(無刺激)を添加し37°C, 10分加温。その後4%PFAで固定。1%BSAでblockingを行ったのち、anti-rmMPO Qdot640 conjugated, mouse anti-human monoclonal CD11b antibody, Molecular probes Hoechst 33258で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

方法3：治療前後におけるIL-12の動態の測定キットによる検出結果の差についての検討

IVIg療法を行ったMPO-ANCA関連腎炎(患者群, n=15)におけるIVIg治療前後と健常人コントロールの血漿中IL-12をELISAにて測定した。

使用したIL-12測定用キットは以下の4種類で、患者血漿中のIL-12量を測定した。

1. Human IL-12BMS238INST (Bender MedSystems, Vienna, Austria)
2. Interleukin-12 [hIL-12] (p70), Human, Biotrak ELISA System (Amersham Biosciences, UK)
3. Human Interleukin12 Ultra-Sensitive (hIL-12US) (Biosource International, Camarillo, CA)
4. BD OptEIA HumanIL-12(p40) ELISA Kit

II (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA)

なお、1及び2についてはIL-12p70特異的、3についてはIL-12p40+IL-12p70を共に検出、4についてはIL-12p40特異的とされている。

### C. 研究結果

#### 1. 症例の heterogeneity

4症例についてのまとめを Table 1 に示す。

3例は有効であったが、1例は効果が乏しく、cyclophosphamide の併用を必要とした。著効した一例は、再燃時にも IVIg が有効であった。IVIg は、CRP を速やかに改善し、Cr 値の上昇を抑止する傾向があったが、症例は病理学的にも多彩であることが改めて示された。

#### 2. 遊離 MPO, 好中球表面 MPO 発現の解析と IVIg によるサイトカインを含む変動

1) 血漿 MPO は患者群において優位に高値を示した ( $p < 0.05$ )。血中 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12 (p70+p40), IL-18 は健常群に比べ、患者群において優位に高値を示した ( $p < 0.05$ )。IL-8 は患者群で著しい高値を示す例が存在した。IL-1 $\beta$ , IL-4, IFN- $\gamma$  は健常群でも患者群でも検出できなかった。MCP-1 は患者群で健常群より優位に低値を示した ( $p < 0.05$ )。IVIg 治療前後の比較では、TNF- $\alpha$ , IL-10 の有意な低下 ( $p < 0.05$ ) を認めた。

2) 蛍光顕微鏡では MPO を Qdot640 の赤、CD11b を二次抗体 Alexa Fluor (goat anti-mouse IgG) の緑、DNA を Hoechst の青で判別可能であった。患者好中球は無刺激下で MPO の発現が認められた。健常人好中球は刺激下で MPO の発現を認めた。IVIg 治療後に好中球上 MPO 発現の減少が認めら

れた。

### 3. IVIg 療法前後での IL12 の血中レベルの動態とその測定法による検出の差異

#### 1) Human IL-12BMS238INST による IL-12p70 の測定

Bender 社の Human IL-12BMS238INST を用いて治療前後の血漿中 IL-12p70 について検討した。結果を Fig. 1 に示す。患者の約半数において IL-12p70 が検出され、その多くは治療後低下した、健常人においては、ほとんど検出されなかった。

#### 2) Interleukin-12 [hIL-12] (p70), Human, Biotrak ELISA System による IL-12p70 の測定

Bender 社の Human IL-12BMS238INST で IL-12p70 を測定した検体の一部についてはさらに Amersham 社の Interleukin-12 [hIL-12] (p70), Human, Biotrak ELISA System を用いて、同様に IL-12p70 を測定したところ、Bender 社の Human IL-12BMS238INST で高値を示した検体についてもほとんど IL-12p70 は検出されなかった。健常人においても、全て測定限界以下であった。

一方、Amersham 社のキットで IL-12p70 の検出された癌患者について、Bender 社の Human IL-12BMS238INST でも IL-12p70 を測定したが、癌患者および IL-12 投与中患者の血漿中 IL-12p70 の測定においては、両キットの間の結果に大きな相違は認められなかった。なお両キットの測定系には、IL-12p40 は全く影響を与えなかったことから、両キットともに、IL-12p70 を特異的に測定していると推察された。

#### 3) Human Interleukin12 Ultra-Sensitive (hIL-12US) による IL-12 の測定



さらにBiosource社のHuman Interleukin12 Ultra-Sensitiveキットを用いてANCA陽性の急速進行性糸球体腎炎・血管炎患者血漿中のIL-12についても検討した。全ての検体について80-400pg/mlのIL-12が検出されたが、Bender社のHuman IL-12BMS238INSTおよび、Interleukin-12 [hIL-12] (p70), Human, Biotrak ELISA Systemの結果との整合性は全く認められなかった。健康人では30-80pg/mlのIL-12がこのキットで検出された。これらの結果から、Biosource社のHuman Interleukin12 Ultra-Sensitiveキットで検出されるIL-12については大部分、IL-12p40である可能性が推察されたので、さらにBD OptEIA HumanIL-12(p40) ELISA Kit IIによりIL-12p40を測定した。Fig. 2に示すようにHuman Interleukin12 Ultra-Sensitive (hIL-12US)とBD OptEIA HumanIL-12(p40) ELISA Kit IIの結果はほぼ相関関係が認められ、Biosource社のHuman Interleukin12 Ultra-Sensitiveキットで検出されるIL-12については大部分IL-12p40であることが確認された。さらに、Bender社のHuman IL-12BMS238INSTの結果と、BD OptEIA HumanIL-12(p40)の結果を同一のグラフにプロットしたが、Bender社のHuman IL-12BMS238INSTで高値を示すANCA患者検体のIL-12p40は低値であった。

#### D. 考察

新たな症例の経験で、IVIg単独では、1から2週間後にCRP再上昇などを認めることがあり、またIVIgのみでCRPの陰性化は望みにくいことが確認され、本療法が発症初期もしくは再燃早期の導入療法として優れていることが再認識された<sup>(1)</sup>。腎生検にて、

炎症細胞(特に好中球など)の浸潤が強い症例(症例1及び症例2など)に対し、IVIg療法の反応性が高く、活動性が比較的低い症例では、効果が弱かったことから、血管炎の活動性が高い発症早期の症例に、使用することが好ましいと考えられた。

一方、IVIg療法における血中サイトカインレベルの検討で、臨床効果に加えて血中TNF-alphaの優位な低下が認められたことは、大量の免疫グロブリンがモノサイトのFc receptorをブロックし、TNF-alphaの低下をもたらすことで血管炎の炎症サイクルの悪循環を改善したと推察された。本研究ではIVIg投与後にIL-10が有意に減少した。これまでIL-10がanti-inflammatory cytokineに分類されていることからこの減少は一見paradoxicalに見えるかもしれない。しかし、おそらくは炎症に大きな役割を担っていると考えられるTNF-alphaが減少したことから、本来anti-inflammatoryに働くために代償的に上昇していたIL-10が治療により減少したということも考えられる。さらに、SLEでは疾患活動性とIL-10の上昇が相関するという報告もあり<sup>(2, 3, 4)</sup>、抗IL-10抗体による治療がSLEの臨床症状を改善させたという報告もある<sup>(5, 6)</sup>ことから自己免疫疾患におけるIL-10のpro-inflammatory作用も示唆された。

一方、新たなMPO発現の検索の試みとしてのQdot法に関して、生物および医療分野へ応用可能なナノサイズ物質として半導体ナノ粒子(カンタムドット quantum dot, Q-dot)が注目されている。Q-dotは半導体原子からなる直径2-8nm程度の超微粒子結晶で、量子サイズ効果により蛍光を発することが知られている。今回我々はQ-dot結合抗MPO抗体を用いて好中球のMPOの発現

を検討することに成功した。IVIg 後に MPO の発現の減少がみられたことより、Q-dot を用いた MPO 発現の検討は IVIg 療法の効果判定に有用であると考えられた。

炎症性サイトカインでも、MPO-ANCA 関連血管炎の活動性に関わる IL12 に関しては、その動向が、治療判定にも用いられる可能性が高く、従って測定之感度や方法については慎重を期す必要がある。今回の測定では、IL-12p70ELISA の結果は、測定するキットの種類により大きく異なっていた。癌患者では Amersham 社の Interleukin-12 [hIL-12] (p70), Human, Biotrak ELISA キットの結果では整合性が認められたが、ANCA 陽性の急速進行性糸球体腎炎・血管炎患者（以下血管炎患者）血漿には Amersham 社の Interleukin-12 キットでは検出されないが、Bender 社の IL-12p70ELISA キットで検出される IL-12p70 が存在した。これらの結果は血管炎患者血漿中の IL-12p70 は、特殊な状態にある事が考えられた。即ち、これまでに myasthenia gravis patients with thymoma の患者においては、anti-IL-12 自己抗体が存在することが報告されている。また anti-GM-CSF などの自己抗体も患者病態と関連している事が報告されている。これらから、Amersham 社の Interleukin-12 キットでは血漿中で free の状態にある IL-12p70 を検出する一方、Bender 社の Human IL-12BMS238INST で検出される IL-12p70 は、抗体や solubleIL-12 受容体のような物質と結合した IL-12p70 をも検出している可能性が考えられる。

一方 BD OptEIA HumanIL-12(p40)の結果から、血管炎患者血漿中には高い濃度の IL-12p40 も存在していたが、Bender 社の Human IL-12BMS238INST で IL-12p70 の高

い値が検出される患者血漿ではむしろ IL-12p40 は低値である傾向が認められた。IL-12p40 は、むしろ免疫抑制的に働くことも報告されており、今回の IL-12p70 と p40 動態の複雑な結果の解析が進めば、ANCA 陽性の急速進行性糸球体腎炎・血管炎患者の複雑なサイトカインネットワークの解明と、それによって引き起こされる病態の解明に役立つ可能性が推察される。

#### E. 結論

ANCA 関連血管炎に対する IVIg は、発症早期の活動性の高い症例に効果があることが示唆されたが、IVIg 治療効果の機序のひとつとして TNF-a 低下により血管炎の悪循環を改善することが推察された。また、IL12p70 の検出動態も疾患活動性と同期することが示されたが、測定キットによる差が注目され、その検討が病態解明にもつながる可能性が示唆された。更に活動性の指標としての好中球表面上への MPO の発現に Q-dot 標識抗 MPO 抗体による検出が有用で、IVIg 療法による発現減少が作用機序のひとつと考えられた。

#### 参考文献

- 1 武曾恵理、猪原登志子。血管炎症候群と免疫グロブリン大量療法。リウマチ科 2004; 31(1) : 67-74.
- 2 Liu TF, Jones BM. Impaired production of IL-12 in system lupus erythematosus. II: IL-12 production in vitro is correlated negatively with serum IL-10, positively with serum IFN-gamma and negatively with disease activity in SLE. *Cytokine* 1998; 10: 148-53.

- 3 Houssiau FA, Lefebvre C, Vanden Berghe M, et al. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* 1995; 4: 393-95.
  - 4 Lacki JK, Samborski W, Mackiewicz SH. Interleukin-10 and interleukin-6 in lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, correlations with acute phase proteins. *Clin Rheumatol.* 1997; 16: 275-8.
  - 5 Llorente L, Zou W, Levy Y, Richaud-Patin Y, et al. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 839-44.
  - 6 Llorente L, Richaud-Patin Y, Garcia-Padilla C, et al. Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 1790-800.
- Pharma Medica 22(5): 182-184, 2004.
- 糟野健司、武曾恵理、小野孝彦、中村肇、淀井芳子、淀井省三、糟野裕子、児玉直也、東義人、大伴裕美子、淀井淳司。透析患者における酸化ストレスマーカー、チオレドキシン(TRX)と脂質について。*Therapeutic Res.* 25. 9. 1802-1804. 2004.
  - 武曾恵理、糟野健司：腎虚血再灌流とレドックス 医学のあゆみ (印刷中)
  - 宇野賀津子、古宮俊幸、猪原登志子、田原佐知子、田中麻理、米本智美、塚本達雄、深津敦司、北 徹、岸田綱太郎、鈴木和男、武曾恵理。MPO-ANCA 関連急速進行性腎炎再発症例におけるガンマグロブリン大量投与療法 (IVIg) 前後の免疫動態。PasKen J 2004 (印刷中)
  - 武曾恵理、猪原登志子、宇野賀津子：難治性腎疾患治療の新たな展開- ANCA 関連腎炎の大量グロブリン療法：先端医療シリーズ 3 1「腎臓病- 診断と治療の最前線」(印刷中)
  - Ono T, Liu N, Makino T, Nogaki F, Nomura K, Muso E, Shimizu F, Honda G, Kita T. Role of Mesangial Factor V Expression in the Crescent Formation in Rat Experimental Mesangioproliferative Glomerulonephritis: *J Pathol*;204(2) :229-38, 2004.
  - Muso E, Ito-Ihara T, Ono T, Imai E, Yamagata K, Akamatsu A, Suzuki K. Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan: *Jpn J Infetc. Dis* 57(5): S17, 2004.
  - Suzuki K, Muso E, Nauseef WM. Contribution of peroxidases in host-defense, diseases and cellular

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 武曾恵理、猪原登志子。血管炎症候群と免疫グロブリン大量療法。リウマチ科 31(1):67-74, 2004.
- 米本智美、田中麻理、南方保、武曾恵理。他臓器(胃)で発見され、腎生検にて確認された ANCA 関連血管炎の 1 例。

functions: *Jpn J Infec. Dis* 57(5) S1, 2004.

- Ishida-Okawara A, Ito-Ihara T, Muso E, Ono T, Saiga K, Nemoto K, Suzuki K. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice: *Nephrol dial Transplant*. 19(7) :1708-15, 2004.
- Oida E, Nogaki F, Kobayashi I, Kamata K, Ono T, Miyawaki S, Serikawa T, Yoshida Y, Kita T and Muso E. Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals a close linkage between the hinge region and trimeric IgA dominancy in a high IgA strain (HIGA) of ddY mice: *Eur. J Immunol*. 34(8) :2200-8. 2004.

## 2. 学会発表

- 猪原登志子、小野孝彦、深津敦司、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 15 例における治療効果と 6 ヶ月予後の検討。第 47 回日本腎臓病学会学術総会。平成 16 年 5 月 27 日。栃木。
- 宇野賀津子、古宮俊幸、猪原登志子、田原佐知子、田中麻理、米本智美、塚本達雄、深津敦司、北徹、岸田綱太郎、武曾恵理。腎炎患者における末梢血リンパ球分画の IL12/IL18 への反応性の検討。第 34 回京都腎臓免疫研究会。平成 16 年 5 月 22 日。京都。
- 宇野賀津子、武曾恵理、岸田綱太郎。第 69 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会。平成 16 年 7 月 29-31 日。青森。
- 古宮俊幸、宇野賀津子、田原佐知子、田中麻理、米本智美、塚本達雄、武曾恵理。γグロブリン大量療法が著効した ANCA 関連腎炎患者における末梢血リンパ球の IL12/IL18 への反応性の検討。第 34 回 西日本腎臓学会学術集会。平成 16 年 10 月 2 日。岡山。
- 猪原登志子、古宮俊幸、宇野賀津子、田原佐知子、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、星野昭芳、山本健二、鈴木和男、小野孝彦、深津敦司、北徹、武曾恵理。MPO-ANCA 関連急速系球体腎炎の血中サイトカインと活性化好中球の動態。第 8 回 京都免疫ワークショップ。平成 17 年 2 月 12 日。大阪。
- Toshiko Ito-Ihara, Takahiko Ono, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Kazuo Suzuki, and Eri Muso. Clinical Efficacy of IVIg for Patients with MPO-ANCA-Associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis and Cytokine Production. The 4<sup>th</sup> International Peroxidase Meeting. Oct 27, 2004. Kyoto, Japan.
- Kazuko Uno, Toshiyuki Komiya, Tatsuo Tsukamoto, Satomi Yonemoto, Sachiko Tahara, Toshiko Ito-Ihara, Kazuo Suzuki, and Eri Muso. Immunomodulatory Effect of Intravenous Immunoglobulin (IVIg) Therapy as Reflected in the Response of Peripheral Mononuclear Cell Fractions to Th1 inducible Cytokines in a Patient with MPO-ANCA-related Glomerulonephritis and Vasculitis. The 4<sup>th</sup> International Peroxidase Meeting. Oct 27, 2004. Kyoto, Japan.

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)