

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
急速進行性糸球体腎炎分科会分担研究報告書

「ANCA 関連血管炎に対する $\gamma$ グロブリン大量療法  
～臨床症例のまとめと、前期第II相試験の進捗状況～」

分担研究者 武曾恵理

田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科部長

〈共同研究者〉

猪原登志子：田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科研究員

京都大学大学院医学研究科循環器病態学

古宮俊幸：田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科医員

宇野賀津子：財団法人レイ・パストゥール医学研究センター基礎研究部室長

今井圓裕：大阪大学医学部附属病院腎臓内科助教授

山縣邦弘：筑波大学附属病院腎臓内科助教授

有村義宏：杏林大学医学部附属病院第一内科助教授

湯村和子：東京女子医科大学医学部附属病院第四内科助教授

赤松 明：愛媛県立新居浜病院副院長

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**

わが国に於いてはMPO-ANCA関連急速進行性糸球体腎炎に対する標準的治療の指針が示されているが、高齢者や感染症を伴った例が多い本症に強力な免疫抑制療法の施行が困難な例もある。これらに対し導入期にIVIg療法を行うことで、予後の改善が得られることが我が国を中心として数カ所の施設で証明された。しかし、真のエビデンスを得るため、前期第II相の多施設共同研究が計画されて、進行中である。その概要と進捗状況を示す。

討され、良好な結果を得た。その概要を検証する。

**I. 臨床症例のまとめと検証**

**A. 研究目的**

MPO-ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎に対する標準的治療の免疫補助療法としての、導入期のIVIg療法の安全性と、予後改善効果について、早期単独使用症例、他施設の使用例で検

**B. 研究方法**

1. 治療前、単独使用例の効果の検討

1) 症例

京都大学附属病院と北野病院において、2001年1月から2002年12月まで

に入院した 13 人の MPO-ANCA 関連血管炎症例。

## 2) 方法

### 治療方法

初期治療として乾燥スルホ化ヒト免疫グロブリン(献血ベニロン-I, 帝人株式会社, 日本) 400mg/kg/day を用いて 5 日間の IVIg 治療を行った。その後、Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS), CRP, rate of 1/Cre を評価後に後療法としてステロイド治療あるいはその他の免疫抑制療法を施行した。10 例における治療前と、IVIg 治療後でステロイド投与前までの間に患者血漿を採取し TNF-a, IL-6, IL-8 を測定した。健常人 12 例の平均 $\pm$ 2SD を正常範囲内と考えた。使用したサイトカインキットは次のとおりである。Biosource international, California, USA; Human tumor necrosis factor-alpha UltraSensitive (hTNF-a US) ELISA kit, human Interleukin-6 UltraSensitive (hIL-6 US) ELISA kit, human Interleukin-8 UltraSensitive (hIL-8 US) ELISA kit.

### 2. 他施設の症例のまとめ

現在まで 5 施設で計 34 症例の MPO-ANCA 関連急速進行性糸球体腎炎に対する IVIg 療法が施行されているが、これらのうち 30 例の解析可能なデータについて検討した。

## C. 結果

1. 治療前、単独使用例の効果の検討  
13 例の患者の年齢は  $72\pm 10$  歳、男性 7 名、女性 6 名であった。症例 1 は B 型

肝炎ウイルスのキャリアーであり、ステロイド大量投与後減量中に生ずるウイルス再増殖が懸念された。また、症例 9 は既往に気管支拡張症があり、治療前にアスペルギルス抗原が喀痰より検出された。

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

良好な 3 ヶ月予後を得ており、1 例のみ維持血液透析に至ったものの、他の例では血液透析なく経過。また 3 ヶ月間における重症感染症の発症や血管炎の再発はなかった。

IVIg 治療後、TNF-a は治療前と比較し、有意に低下した (before IVIg  $3.97 \pm 2.73$  vs after IVIg  $2.16 \pm 1.68$  pg/ml,  $n=10$ ,  $p=0.0156$ )。IL-6 は治療前と比較し、低下したが統計学的有意差はなかった。治療前に高値を示した患者では IL-8 の劇的な低下が観察された。

### 2. 他施設の症例のまとめ

30 症例 (男性 17 例、女性 13 例) の年齢は 36 歳-83 歳で平均年齢  $68.9 \pm 11.8$  歳であった。IVIg 療法は一例をのぞき 400mg/kg/day、5 日間の施行で、単独での有効性の検討が可能なものは 18 例であった。再発例に IVIg が施行されたのは 3 例であった。治療前

の血清CRP, Cre, MPO-ANCAの平均は7.2±5.5mg/dl, 4.04±2.94mg/dl, 243.7±355.2EUであった。治療後3ヶ月以後ではそれぞれ、0.78±2.34mg/dl, 3.3±5.7mg/dl, 51.9±91.15EUと有意に低下した。臨床経過の検討ではIVIg療法のみでBVASを含めた臨床症状の改善を認めた症例が、18例中17例に及び、直後にあらたな後療法を要しなかった症例も2例あった。3か月の時点で維持透析状態のものが4例(内1名は糖尿病性腎症により、1例は治療前より腎死の状態)、IVIg後の再燃例は2例あったが、重篤な感染症の発症は皆無であった。

(研究の倫理面への配慮)

IVIgの使用にあたっては、施設の倫理委員会で承認を受け、患者の同意を得て、施行した。また、保険収載されていない治療法である為、大学や研究所での研究費による治療とした。

#### D. 考察

一般にIVIg療法の免疫修飾作用の発現にはFcレセプターへの作用、抗炎症作用、B cellおよび抗体への作用、T cellに対する作用、細胞増殖への作用、薬剤感受性の回復のような機序が考えられている。これらはANCA関連腎炎、血管炎においてもあてはまる機序であり、実際様々な検証がなされている。詳細は他稿に譲るが<sup>1)</sup>、F(ab')<sub>2</sub>部分のみの製剤では、効果が低いことよりIgGのFcレセプターを介する機序が推測され、また最近のモデルマウスを用いた報告でIVIgによる抑制性

FcレセプターであるFcγRIIBの発現促進による効果も考えられる<sup>2)</sup>。さらに補体を直接抑制する抗炎症作用<sup>3)</sup>、TNFαなどのサイトカイン抑制作用<sup>4)</sup>などは著者らも報告してきた。一方、IVIgが半月体形成時に活性化するTh1の活動性を抑制する作用については、末梢血T細胞のIL12による反応性の抑制で証明してきた。また、B cellの活性化や自己抗体産生におよぼすIVIgの影響については、B cell FcγRIIへのIVIgの結合による抗体産生を抑制<sup>5)</sup>、多人数のIgが認識する共通のidiotyp抗体によるANCAの抗原への結合の阻止、さらには、IVIgによるグルコシルチコイドレセプターの感受性の上昇がもたらす、投与ステロイド量現象効果なども、IVIgの有効性の機序の一つと考えられる<sup>6)</sup>。また、活性化好中球のMPO発現の抑制作用については、血中のMPO測定や、好中球表面MPOを微細蛍光発色分子であるカンタムドットを結合させた抗MPO抗体を用いた検出法の開発により検討が進行中である<sup>7)</sup>。

#### 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 31(1):67-74, 2004
2. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch J, et al: Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. Science. 19;291(5503): 484-486, 2001

3. Basta M, Dalakas MC. High-dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. *J Clin Invest.* 94(5): 1729-1735, 1994
4. Harper L, Cockwell P, Adu D et al: Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney Int* 59: 1729-38, 2001
5. Kondo N, Kasahara K, Kammeyama T., et al: Intravenous immunoglobulins suppress immunoglobulin productions by suppressing Ca(2+)-dependent signal transduction through Fc gamma receptors in B lymphocytes. *Scand J Immunol.* 40(1): 37-42, 1994
6. Spahn JD, Leung DY, Chan MT, et al: Mechanisms of glucocorticoid reduction in asthmatic subjects treated with intravenous immunoglobulin. *J Allergy Clin Immunol* 103: 421-6, 1999
7. Ito-Ihara T, Ono T, Nogaki F, Suyama K, Tanaka M, Yonemoto S, Fukatsu A, Kita T, Suzuki K, Muso E: Clinical Efficacy of Intravenous Immunoglobulin for Patients with MPO-ANCA Associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract.* 102(1):c35-c42 [Epub a

head of print] Sep 19, 2005

## II.臨床治験 MPO-ANCA 陽性 RPGN 患者を対象とした経静脈的免疫グロブリンの前期第 II 相探索試験.

プラセボ対照無作為化二重盲検比較試験

### A.研究目的

MPO-ANCA 陽性で RPGN (臨床学的重症度: Grade I 又は II) と確定診断された患者を対象に、急速進行性腎炎症候群の診療指針を基準とした治療を行うと共に、治験薬\*を 5 日間連日投与(0,400 mg/kg/日)し、有効性及び安全性を探索する。

### B. 方法

#### 【フェーズ】

前期第 II 相探索

#### 【デザイン】

プラセボ対照・無作為化・多施設共同・二重盲検

並行群間比較試験

※被験薬: 静注用免疫グロブリン製剤  
対照薬(プラセボ): 日本薬局方生理食塩液

#### 【対象疾患】

RPGN 確定診断方法により RPGN と確定診断された患者を対象とする。

「RPGN 確定診断方法」\*

下記の①,②の 2 項目を満たす場合、RPGN と診断する。

ただし、過去の検査歴などが無い場合や、来院時無尿状態で尿所見が得られない場合は、血中クレアチニン値及び

③により総合的に判断する。

① 数週から数ヶ月の経過で急速に腎不全が進行する（病歴の聴取、過去の検診、その他の腎機能データを確認する）

② 血尿(多くは顕微鏡的血尿、まれに肉眼的血尿)、蛋白尿、赤血球円柱、顆粒円柱などの腎炎性尿所見を認める。

③ 過去の検査歴などが無い場合や、来院時無尿状態で尿所見が得られない場合は、臨床症候や腎臓超音波検査、CTなどにより、腎のサイズ、腎皮質の厚さ、皮髄境界、尿路閉塞などのチェックにより総合的に判断する。

\*急速進行性糸球体腎炎診療指針作成合同委員会作成の診療指針

#### 【選択基準】

RPGN と確定診断され、且つ本治験への参加に対する文書同意が得られた対象患者で、次の 1)~4)の基準を全て満たす患者(表 1、表 2 参照)

- 1) MPO-ANCA 陽性
- 2) 臨床学的重症度\*が Grade I 又は II
- 3) 治験参加の同意取得時点において、年齢が 20 歳以上
- 4) 治験薬投与期に入院が可能

#### 【治験のスケジュール】

急速進行性腎炎症候群の診療指針を基準とした治療を行うと共に、治験薬を 5 日間連日投与し、その後 6 箇月間観察実施

#### 【評価項目】

有効性評価項目

- ・ Cre, 1 / Cre, BUN, BVAS, CRP, MPO-ANCA,透析に至るまでの日数

等

安全性評価項目

- ・ 治験薬投与後の有害事象

#### 【治験実施医療機関】

20 施設

#### 【目標症例数】

被験薬投与群 16 例  
対照薬投与群 8 例 計 24 例

結果

以上のプロトコールで、現在進行中であり、順次症例登録がなされている。

### E. (I,II 共通) 結論

高齢化に伴い、急増している ANCA 関連血管炎の治療に、IVIg を特にその発症初期に導入療法として施行する事で、従来の免疫抑制療法の弊害である、感染症や治療低抗性を改善しうると考えられる。現在進行中のプラセボをコントロールとした全国規模の比較試験により、有意な効果の証明が期待される。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 知的所有権の出現登録状況

なし。

### H. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 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 Infect Dis* 57(5):S17-18, 2004
2. Ito-Ihara T, Ono T, Nogaki F, Suyama K, Tanaka M, Yonemoto S, Fukatsu A, Kita T, Suzuki K, Muso E: Clinical Efficacy of Intravenous Immunoglobulin for Patients with MPO-ANCA Associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract* 102(1):c35-c42 [Epub ahead of print] Sep 19, 2005
  3. 武曾恵理: MPO-ANCA 関連血管炎・腎炎に対する免疫グロブリン (IVIg) 療法 医学のあゆみ 215(9):759-761, 2005
  4. 武曾恵理: MPO-ANCA 陽性血管炎に対する経静脈的大量グロブリン (IVIg) 療法 医学のあゆみ 214(1):113-119, 2005
  5. 宇野賀津子、猪原登志子、古宮俊幸、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 関連腎炎再発症例における免疫グロブリン大量療法 (IVIg) 前後の免疫動態 *Pharma Medica* 23(5):94-96, 2005
2. 学会発表
- 【国内】
1. 武曾恵理: MPO-ANCA と nMPO-ANCA 解離の症例 創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業国際共同研究「抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎の本邦・欧州間での臨床疫学調査および診断薬と治療法開発に関する研究」平成 17 年度第一回班会議 2005.4.28-29 (広島)
  2. 古宮俊幸、田原佐知子、辻井知美、塚本達雄、武曾恵理、宇野賀津子、岸田綱太郎、猪原登志子、大川原明子、鈴木和男: 腎機能の増悪にて診断に至った MPO-ANCA “偽”陰性の顕微鏡的多発血管炎一例— MPO-ANCA 陽性度の測定法による heterogeneity について— 第 35 回京都腎臓免疫研究会 2005.5.28 (京都)
  3. 猪原登志子、大川原明子、劉寧、日浅俊介、雑賀寛、根本久一、武曾恵理、鈴木和男、北徹、小野孝彦: ANCA 関連半月体形成性糸球体腎炎モデル SCG/Kj mice における好中球と凝固系活性化を介した半月体形成機序 第 48 回日本腎臓学会学術総会 2005.6.23-25 (横浜)
  4. 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、小野孝彦、岸田綱太郎、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理: MPO-ANCA 関連糸球体腎炎の血中サイトカインの動態 第

4 8 回日本腎臓学会学術総会  
2005.6.23-25 (横浜)

5. 古宮俊幸、浅田秀基、岩崎由加子、杉下岳詩、辻井知美、田原佐知子、塚本達雄、武曾恵理：HIGA マウスにおける IL12 誘導系球体修飾に対する Angiotensin II receptor blocker の影響 第 4 8 回日本腎臓学会学術総会 2005.6.23-25 (横浜)
6. 武曾恵理、猪原登志子、古宮俊幸、宇野賀津子、岸田綱太郎、鈴木和男：難治性血管炎の発症機序と治療戦略 第 16 回日本生態防御学会学術総会 2005.8.4-6 (東京)
7. 亀岡洋祐、伊藤玲子、笹間毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、鈴木和男：ミエロペルオキシダーゼ遺伝子コード領域の多型 (SNP) と炎症性疾患の重篤度との関係 第 16 回日本生態防御学会学術総会 2005.8.4-6 (東京)

【国際会議】

1. Muso E, Ito-Ihara T, Ono T, Imai E, Yamagata K, Akamatsu A, Suzuki K : Establishment of the Evidence of Beneficial Effect of Intravenous Immunoglobulin 8IVIg) Therapy on MPO-ANCA Related Polyangiitis Combining Rapidly Progressive Glomerulonephritis (RPGN) in Japan. *12<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop* June 15-18, 2005 (Heidelberg)
2. Ito-Ihara T, Uno K, Hoshino A, Yamamoto K, Komiya T,

Ishida-Okawara A, Fukatsu A, Kita T, Suzuki K, Muso E: Sensitive Detection of Myeloperoxidase Expression on Neutrophil of Patients with Myeloperoxidase-antineutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Glomerulonephritis. *12<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop* June 15-18, 2005 (Heidelberg)

3. Hoshino A, Nagao T, Murayama K, Ishida-Okawara A, Ito-Ihara T, Uno K, Muso E, Nagai-Miura N, Ohno N, Naoe S, Tokunaka K, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K: Contribution of Myeloperoxidase (MPO) on Surface of Neutrophils to Glomerulonephritis Using Nanocrystal Quantum Dots-labeled MPO Antibody. *12<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop* June 15-18, 2005 (Heidelberg)
4. Kobayashi S, Tamura N, Ihara T, Muso E, Suzuki K, Yoshida M, Nakabayashi K, Tsuchiya N, Kurosawa M, Inaba Y, Fujimoto S, Nunoi H, Hashimoto H: Prevalence of Microscopic Polyangiitis/Wegener's Granulomatosis and the Ratio of MPO, PR-3-ANCA in Patients with ANCA-associated Vasculitis in Japan. *12<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop* June 15-18, 2005 (Heidelberg)
5. Muso E, Yukawa S, Nishizawa Y,

- Saito T, Yorioka N, Mune M, Hirano T, Hattori M, Kimura K: Survey of 94 cases of refractory nephrotic syndrome (NS) showing rapid remission by low-density lipoprotein apheresis (LDL-A). *3<sup>rd</sup> World Congress of Nephrology* June 26-30, 2005 (Singapore)
6. Ito-Ihara T, Uno K, Ono T, Fukatsu A, Kita T, Suzuki K, Muso E: Circulating myeloperoxidase and cytokine profiles in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. *3<sup>rd</sup> World Congress of Nephrology* June 26-30, 2005 (Singapore)
7. Komiya T, Iwasaki Y, Asadav H, Tahara S, Sugishita T, Tsujii T, Tsukamoto T, Muso E: Angiotensin Receptor Blocker (ARB) Prevents the Induction of Active Crescentic Glomerular Lesion by IL-12 Possibly through Suppression of Oxidative Stress with TNF- $\alpha$  Expression in High IgA Strain (HIGA) of ddY Mice. *ASN Renal week* November 14-19, 2006 (Philadelphia)

表1 臨床所見スコア

スコア	Cre (mg/dl)	年齢	肺病変の 有無	CRP値 (mg/dL)
0	Cre<3.0	Age<60	無	CRP<2.6
1	3.0≤Cre<6.0	60≤Age<70	—	2.6≤CRP<10.0
2	6.0≤Cre	70≤Age	有	10.0≤CRP
3	透析**	—	—	—

\*\*対象患者から除外

表2 \*臨床学的重症度

臨床学的 重症度 (Grade)	合計 スコア
I	0~2
II	3~5
III	6~7
IV	8~9

「臨床学的重症度」：急速進行性腎炎症候群の診療指針より（日腎会誌，2002，44，2，55-82）

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「半月体形成性腎炎における high mobility group box chromosomal protein  
(HMGB)-1 の関与」

研究協力者 和田 隆志 金沢大学大学院医学系研究科腎臓内科 講師  
協力研究者 金沢大学医学部附属病院血液浄化療法部 部長 横山 仁  
金沢医療センター 院長 木田 寛

研究要旨

研究要旨： 病理学的に半月体形成を特徴とするヒト半月体形成性腎炎(CrGN)は、臨床的に急速進行性糸球体腎炎症候群(RPGN)を呈する予後不良な疾患群である。その半月体形成の詳細な分子機序は不明である。本研究では1.CrGN群において、high mobility group box chromosomal protein-1(HMGB-1)が半月体形成部、メサンギウム領域および間質内浸潤細胞に陽性であった。CrGNではその陽性細胞数が他の腎疾患に比して多く見られた。2.二重染色によりHMGB-1陽性細胞の一部はCD68陽性マクロファージならびに好中球であった。3.糸球体内HMGB-1陽性細胞数は半月体形成率のうち、総形成率ならびに病期が進んでいると考えられる線維性一線維細胞性半月体形成率と相関した。4.間質内HMGB-1陽性細胞数は間質線維化と相関した。加えてHMGB-1陽性細胞は糸球体・間質ともCD68陽性マクロファージ/好中球数と相関した。5.ステロイド療法前後で腎生検をした例において、糸球体内および間質内HMGB-1陽性細胞数は有意に低下した。6. IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ の刺激により、培養メサンギウム細胞からHMGB-1が産生された。以上より、HMGB-1は半月体形成をはじめとする糸球体ならびに間質病変の進展機序に関与することが示された。

A. 研究目的

病理学的に半月体形成性腎炎(CrGN)に代表される急速進行性糸球体腎炎症候群(RPGN)は糸球体硬化・間質線維化という共通の病理所見を示し腎不全に至る。この過程において、半月体形成の発症・進展機序を明らか

にすることは病態のさらなる理解とともに治療法の確立にむけ意義深いものと考えられる。しかしながら、病理学的な特徴である半月体形成ならびに間質病変を生じる共通の分子機序・背景については十分な検討がなされていない。

RPGN においては、その病因および病型を問わず糸球体ならびに間質にマクロファージ(M $\phi$ )の浸潤を認めることが特徴である。M $\phi$ はサイトカイン、ケモカインといった各種炎症性メディエーターを放出することに加え、糸球体上皮細胞はじめ腎固有細胞との相互作用により、半月体形成をはじめとする RPGN の病態に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

high mobility group box chromosomal protein-1(HMGB-1)は本来核内にあり、転写や DNA 機能を行う DNA 結合タンパクとして知られている。一方、壊死細胞もしくは活性化M $\phi$ では核内から遊離し、HMGB-1 の受容体である receptor for advanced glycation end products (RAGE)を介して炎症や臓器不全を惹起することが判明してきた。しかしながら半月体形成性腎炎はじめ進行性腎疾患の進展過程における HMGB-1 の関与は未だ検討されていない。そこで本研究では、ヒト半月体形成性腎炎の進展機序における HMGB-1 の関与を検討し、ステロイド治療に伴う HMGB-1 の動態についても検討した。

## B. 研究方法

腎生検または剖検にて腎病変を確認しえた各種腎疾患 119 例(男 48 例, 女 71 例, 平均 48 才)を対象とした。内訳は CrGN29 例, 全身性エリテマトーデス(SLE)35 例, 糖尿病性腎症(DM)25 例, IgA 腎症 15 例および疾患コントロールとして巣状分節性糸球体硬化症

(FSGS)5 例, 微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)5 例, 基底膜菲薄症候群(TBMD) 5 例であった。

CrGN 例の内訳は、抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連型 22 例, 免疫複合体(IC)型 7 例であった。腎内の HMGB-1 の局在を確認し、病理学的指標との関連を検討した。HMGB-1 陽性細胞を同定するため、CD68/好中球エラスターゼとの二重染色を施行した。さらにラット培養メサンギウム細胞を用い、IL-1 $\beta$  (10ng/ml), TNF- $\alpha$  (10ng/ml)共存下で、24 時間および 48 時間培養した。HMGB-1 発現を ELISA 法ならびに real time RT-PCR にて検討した。なお倫理面への配慮は十分にされている。

## C. 結果

1. HMGB-1 陽性細胞の腎での局在  
免疫組織染色により各種腎疾患例において HMGB-1 の局在を検討した。HMGB-1 は半月体形成部、メサンギウム領域および間質内浸潤細胞に陽性所見を認めた。これらの染色部位はいずれの腎疾患でも同様だった(図 1)。なお HMGB-1・CD68 の二重染色では、HMGB-1 陽性細胞は一部 CD68 陽性であった。HMGB-1・好中球エラスターゼの二重染色でも同様に、HMGB-1 陽性細胞の一部は好中球エラスターゼ陽性であった。
2. 各腎疾患における HMGB-1 陽性細胞数

FSGS/MCMS ならびに TBMD では糸球体/間質ともにほとんど陽性細胞はみられなかった。RPGN, LN, IgA 腎

症, DM 例では糸球体ならびに間質で増加した(図2)。

### 3. CrGNにおけるHMGB-1陽性細胞数と病理学的指標との相関

今回の検討で,最もHMGB-1陽性細胞が多くみられたCrGNについて,糸球体および間質病変におけるHMGB-1の関与を検討した(表1)。まず,糸球体内HMGB-1陽性細胞数は半月体形成率のうち,総形成率ならびに病期が進んでいると考えられる線維性-線維細胞性半月体形成率と相関した。しかしながら半月体極期である細胞性半月体形成率とは相関はみられなかった。一方,間質内HMGB-1陽性細胞数は間質線維化と相関した。加えてHMGB-1陽性細胞は糸球体・間質ともCD68陽性M $\phi$ 数ならびに好中球数と相関した。

### 4.ステロイド療法によるHMGB-1陽性細胞数の推移

ステロイド療法前後で腎生検をした6例において,糸球体内HMGB-1陽性細胞数はステロイド療法前で疾患活動性の低下とともに減少した。

(15.8個/mm<sup>2</sup>から7.9個/mm<sup>2</sup>)。さらに間質も同様に平均435.8個/mm<sup>2</sup>から178.3個/mm<sup>2</sup>へと減少した

### 5. IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ によるメサンギウム細胞からのHMGB-1産生

IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ の刺激により,培養メサンギウム細胞からHMGB-1の蛋白レベルが経時的に増加することが示された(図3)。さらにHMGB-1 mRNA発現は刺激前にHMGB-1/ACT b比は0.08であった。一方,かかる刺

激下で24時間後に0.18,48時間後に0.48と経時的に増加した。このメサンギウム細胞からのHMGB-1の直接の産生は,免疫組織染色の結果を支持するものと考えた。

### D. 考察

本研究により,腎局所の浸潤細胞ならびに腎固有細胞から産生されるHMGB-1が,CrGNに代表される各種腎疾患の進展機序に深くかかわっている可能性が示された。

これまでHMGB-1の主要産生細胞はCD68陽性M $\phi$ と考えられていた。実際,二重染色によりHMGB-1陽性細胞の一部はM $\phi$ ならびに好中球であることが確認された。さらに今回の検討において,IL-1 $\beta$ ならびにTNF- $\alpha$ の存在下でM $\phi$ に加えて,培養メサンギウム細胞からHMGB-1が産生されたことは注目される。一方,TBMD, FSGS/MCNSではHMGB-1陽性細胞がみられなかった。これまで関節リウマチに代表される炎症では,局所で産生されたHMGB-1が炎症の増幅に関与すると報告されている。したがって腎疾患においても,HMGB-1は炎症増幅経路を活性化させ,半月体形成や間質細胞浸潤から間質線維化に至る機序に関与することが推測された。

本研究において,ステロイド療法により疾患活動性の低下により腎内HMGB-1陽性細胞が減少した。これまで皮膚筋炎・多発筋炎例において,筋組織に発現が亢進したHMGB-1は,ステロイド療法によりその発現が抑

制されたことが報告されている。これは HMGB-1 を介した炎症増幅機構にステロイド療法が有用であることを示している。しかしながら、HMGB-1 の産生機序ならびにステロイド療法による抑制機序は目下のところ十分に解明されておらず今後の検討課題である。

HMGB-1 の受容体は receptor for advanced glycation end products (RAGE) であることが報告されている。最近になり、この RAGE には C 末端が切断され endogenous secretory RAGE が存在することが判明してきた。これは RAGE の可溶性アイソフォームであり、デコイとして機能することが示されつつある。また、血管内皮細胞にあり凝固との関連が深いトロンボモデュリンの N 末端レクチン様ドメインも HMGB-1 と結合して抗炎症効果を有することが示されるようになってきた。今後はかかる受容体との相互関連も視野にいれて半月体形成性腎炎に代表される進行性腎疾患の進展機序への関与を検討する必要がある。さらに腎疾患の進展機序に果たす HMGB-1 の役割を十分に検討するためには、HMGB-1 投与もしくは HMGB-1 機能中和による評価が不可欠である。今後、実験腎炎モデルにおいて抗 HMGB-1 中和抗体等を用いて詳細に機能評価を行いたいと考えている。

## E. 結論

ヒト半月体形成性腎炎において、

HMGB-1 は半月体形成をはじめとする糸球体ならびに間質病変の進展機序に関与することが示された。このことより HMGB-1 制御は半月体形成性腎炎に対する新たな治療戦略として有用である可能性が示された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

1-1

Sakai N, Wada T, Furuichi K, Shimizu K, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, Okumura T, Matsushima K, Yokoyama H, Kaneko S. MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. *J Leukoc Biol* Jan 13, 2006, Epub ahead of print

1-2

Sakai N, Wada T, Furuichi K, Iwata Y, Yoshimoto K, Kitagawa K, Kokubo S, Kobayashi M, Hara A, Yamahana J, Okumura T, Takasawa K, Takeda S, Yoshimura M, Kida H, Yokoyama H: Involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 45:54-65, 2005

## 2. 学会発表

平成 18 年日本腎臓学会学術総会発表  
予定

半月体形成性腎炎における high  
mobility group box chromosomal  
protein-1(HMGB-1)の関与

和田 隆志, 岩田 恭宣, 坂井 宣彦, 山  
端 潤也, 原 章規, 横山 仁

図1. 半月体形成腎炎における HMGB-1 陽性細胞の局在

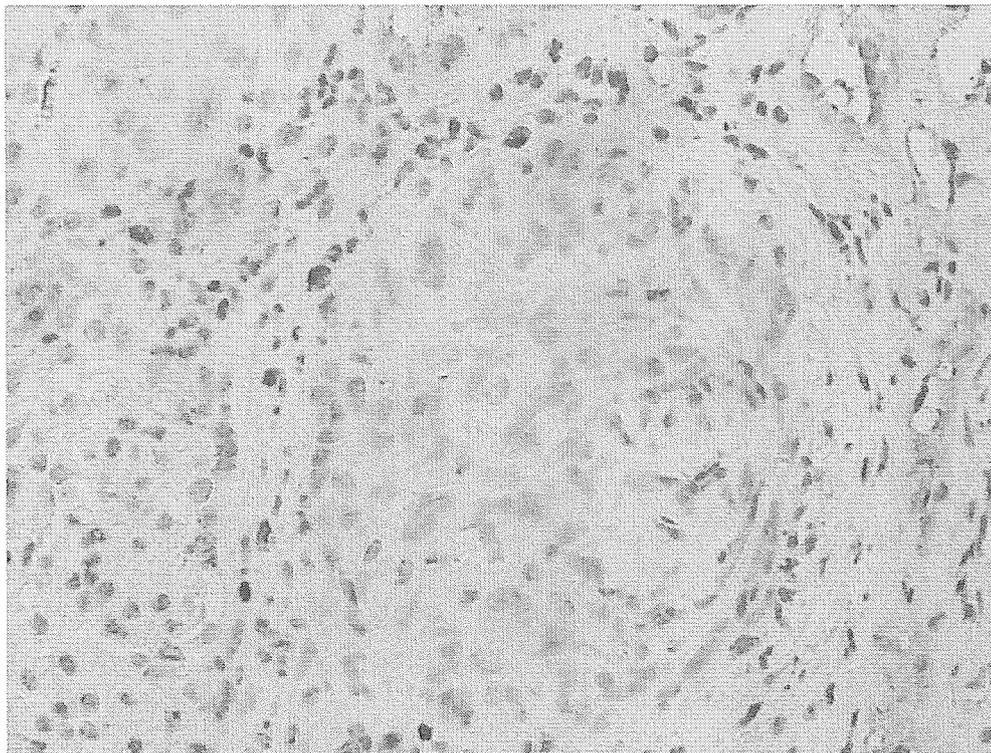


図2. 各種腎疾患における HMGB-1 陽性細胞 \*p<0.05

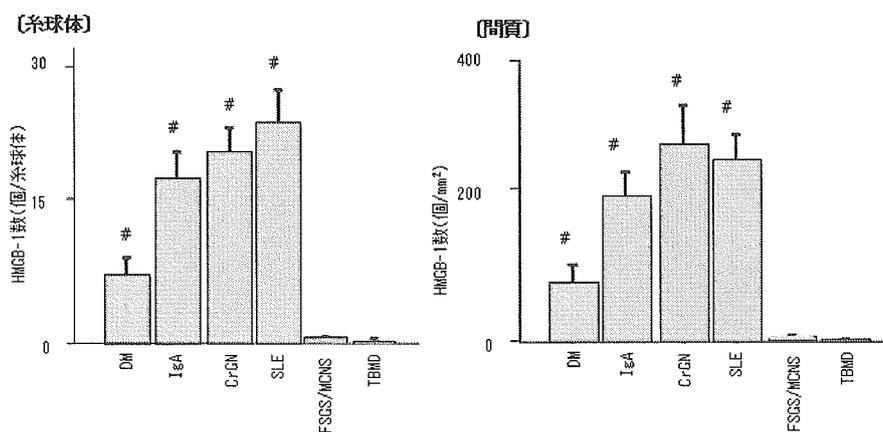


図 3. ラットメサングウム細胞からの HMGB-1 産生

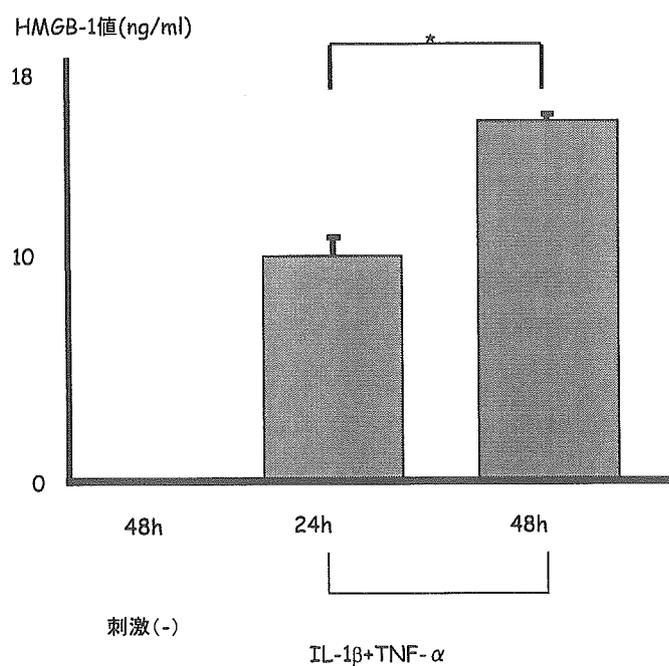


表 1. 半月体形成性腎炎における HMGB-1 陽性細胞数と病理学的指標との関連

【糸球体】	r	p 値
総半月体形成率	0.44	0.01
線維性～線維細胞性半月体形成率	0.65	<0.01
細胞性半月体形成率	0.16	0.38
好中球数	0.44	<0.05
CD68 陽性マクロファージ数	0.81	<0.01

【間質】	r	p 値
線維化	0.48	<0.05
好中球数	0.44	<0.05
CD68 陽性マクロファージ数	0.63	<0.05

難治性ネフローゼ症候群分科会  
分担・各個研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
進行性腎障害に関する調査研究  
難治性ネフローゼ症候群分科会分担研究報告書

「難治性ネフローゼ症候群の診療指針改訂に向けた多施設共同試験実施状況と  
薬物血中濃度モニタリング」

分担研究者 齊藤 喬雄  
福岡大学医学部内科学第四講座教授

**研究要旨**

難治性ネフローゼ症候群の診療指針改訂のために、プレドニゾロン(PSL)とシクロスポリン(CyA)併用療法およびPSLとミゾリビン(MZR)併用療法の多施設共同試験を実施し、コンピュータのWEBサイトから症例登録を行ってきた。現在まで56施設が倫理委員会等の承認を得て登録可能な状況であり、PSLとCyA併用療法に関して24施設より膜性腎症30例および巣状糸球体硬化症14例、PSLとMZRに関して17施設より膜性腎症25例の登録が行われた。また、パイロットスタディの結果から、CyAを食前に服用すると、食後に服用する場合より服用後1時間目(C1)の血中濃度が最高値(Cmax)となり、治療上有用であること、食前服用でも食後服用でも、C2が血中濃度曲線下面積(AUC0-4)とよく相関し、CyAの血中濃度モニタリングの上で、意義深いことが明らかとなった。また、MZRの血中濃度の変化は緩やかであり、C2-C4がCmaxとなるが、Ccr50ml/min以下では、異常上昇をきたす恐れが示された。

**A. 研究目的**

進行性腎障害の1つである難治性ネフローゼ症候群の診療指針改訂に向けて新たな免疫抑制療法のエビデンスを確立するために、平成16年度にプレドニゾロン(PSL)とシクロスポリン(CyA)併用療法およびPSLとミゾリビン(MZR)併用療法の多施設共同試験を開始し、その状況を検討した。また、これらの効果判定上有用なCyAおよびMZRの薬物血中濃度モニタリング(TDM)についても検討した。

**B. 研究方法**

**1. PSLとCyA併用療法およびPSLとMZR併用療法の多施設共同試験**

PSLとCyA併用療法については、膜性腎症と巣状糸球体硬化症を対象とする。方法、評価項目、観察項目等は、昨年までの進行性腎障害に関する調査研究の業績報告書に記したとおりである。平成16年4月より本調査研究班に所属する内科施設をはじめ研究に賛同する施設への参加を呼びかけ、まず、それぞれの施設での倫理

委員会あるいはそれに相当する審査委員会への申請を依頼した。そのうえで WEB サイトにおける症例の登録 (<https://www.wan.jp/mhlw/>) を実施している。

PSL と MZR 併用療法については、膜性腎症を対象として実施し、方法、評価項目、観察項目等は、昨年の本研究報告書に示したとおりである。PSL と CyA 併用療法試験の場合と同様に平成 16 年 4 月より本調査研究班に所属する内科施設をはじめ研究に賛同する施設への参加を呼びかけ、それぞれの施設での倫理委員会あるいは臨床研究審査委員会での承認のもとに、WEB サイトにおける症例の登録を実施している。

## 2. 難治性ネフローゼ症候群における CyA の TDM

PSL と CyA 併用療法当たりの重要なポイントである CyA の体内への吸収と分布に基づく TDM のパイロットスタディを前年度より継続して実施した。すなわち、朝食前に CyA3mg/kg を服用した 10 例(膜性腎症 8 例、巣状分節性糸球体硬化症 2 例)と朝食後に CyA3mg/kg を服用した 11 例(膜性腎症 9 例、巣状分節性糸球体硬化症 2 例)において、服用前より服用 4 時間目までの血中濃度(C0-C4)を測定し、血中濃度曲線下面積(AUC0-4)と比較検討し、服用の時期や血中濃度測定の意義について検討した。

## 3. 難治性ネフローゼ症候群における MZR の TDM

MZR 投与に当たっても、TDM の重

要性を考慮して、パイロットスタディを実施し、150mg 一括服用 7 例と 150mg3 分割服用 3 例、75mg3 分割服用 2 例における服用前からの経時的血中濃度を測定し、適切な血中濃度とその腎機能との関係について検討した。(研究の倫理面への配慮)

昨年も記したように、これらの多施設共同研究の実施に当たっては、文部科学省および厚生労働省による「疫学研究に関する倫理指針」に従うこととし、とくにインターネットを利用しての登録については、個人情報保護法に基づき、個人情報保護方針を定めるとともに、各施設での連結不可能匿名化を厳格に行い、集計上個人が特定されないように配慮した。また、被験者に対する研究内容の説明や同意書の作成を義務付けている。なお、前述のように、この研究は参加各施設の倫理委員会およびそれに相当する審査委員会の承認を得ることで実施している。

## C. 結果

### 1. 多施設共同試験の実施状況

PSL と CyA 併用療法および PSL と MZR 併用療法の多施設共同試験への参加を表明し、倫理委員会等の承認を受けた施設は 56 施設である。このうち、平成 18 年 2 月末における登録症例数は、PSL と CyA 併用療法試験では膜性腎症 30 例、巣状糸球体硬化症 14 例であり、PSL と MZR 併用試験では膜性腎症 25 例となっている。

### 2. 難治性ネフローゼ症候群における CyA 血中濃度モニタリング

CyA 食前服用群と食後服用群の血中濃度 C0-C4 は図 1 に示したとおりである。食前服用の症例の大半は C1 が最高濃度(Cmax)であるが、食後服用の症例では C2 が Cmax の例も多かった。しかし、濃度の変化も緩やかであった。また、Cmax は食前服用群でより高値であった。しかし、食前服用群、食後服用群のいずれでも C2 はほぼ同じ値を示し(図 2)、C0-C4 のそれぞれと AUC0-4 の関係を検討すると、C2 にもっとも強い相関性がみられた(図 3)。

### 3. 難治性ネフローゼ症候群における MZR の TDM

MZR 一括服用と 3 分割服用の血中濃度の変化をそれぞれ図 4, 図 5 に示した。一括服用群では、各例において C2 から C4 にかけて緩やかに Cmax に達したが、症例により血中濃度には差がみられた。とくに、Ccr が 50ml/min 以下の症例で血中濃度が高値を示した。

## D. 考察

### 1. 多施設共同研究の実施

難治性ネフローゼ症候群の診療指針改訂に向けて、ステロイドと免疫抑制薬の併用療法の効果に関するエビデンスを得るために多施設共同研究を実施している。最近、登録症例数はかなり増加したが、現在までの登録症例数から登録締切予定の平成 18 年末における登録数を推定すると、PSL+CyA 併用試験では、膜性腎症 39 例、巣状糸球体硬化症 19 例、PSL+MZR

併用試験では、膜性腎症 36 例であり、それぞれ目標の 19.5%、19.0%、36% に過ぎない。参加各施設に一層の協力をお願いし、目標に近づけたいと考えている。

### 2. 難治性ネフローゼ症候群における CyA の TDM

CyA は T リンパ球におけるカルシニューリン活性や IL-2 産生を抑え、免疫抑制薬として作用するが、一方で、腎障害や高血圧などの副作用が知られている。免疫抑制効果を十分なものとし、副作用を最小限に抑えるためには、血中薬物濃度を測定し薬物投与方法を計画する必要がある。これまでは、服用前の血中濃度すなわちトラフ値 (C0) を測定することで投与量の決定がなされてきた。しかし、マイクロエムルジョン製剤が使用されるようになった現在、C0 より C2 の有用性が指摘されている。一方、CyA の血中濃度を効果的に上昇させるためには、食前服用が良いとの研究がみられる。この点については、昨年の当分科会報告でも検証したが、本年度は、難治性ネフローゼ症候群の症例において食前服用と食後服用を比較することで、この点をより明確なものとした。とくに、興味深いことは、食前服用において、C1 が高値となるため十分な薬物効果があると考えられるにもかかわらず、AUC0-4 は C2 ともっとも強く相関することであり、今回の PSL+CyA 併用試験でも C2 測定は重要と考えられた。

### 3. 難治性ネフローゼ症候群における MZR の TDM