

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

鈴木 和 男

平成18（2006）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

鈴木和男 . . . . . 1

### II. 分担研究報告

1. MPO-ANCA 陽性急速進行性糸球体腎炎に対する IVIg 療法前後の免疫学的指標の検討

武曾恵理 . . . . . 15

2. 多発性筋炎/皮膚筋炎に対する IVIg 療法に関する研究

橋本博史 . . . . . 21

3. 劇症型心筋炎に対する IVIg 治療と Ig 融合蛋白治療の検討

相澤義房 . . . . . 25

4. 免疫グロブリンによる Reactive Oxygen Species 抑制効果

—急性期川崎病血管炎における酸化ストレスの動態—

佐地 勉 . . . . . 33

5. *Candida albicans* 由来可溶性菌体外多糖 CAWS の致死活性に関する研究

大野尚人 . . . . . 37

6. マウス血管炎誘発モデルにおける合成免疫グロブリンの血管炎抑制効果

高橋 啓、新井孝夫 . . . . . 41

7. 炎症疾患治療評価を行うためのモデル動物の解析：紫外線誘発皮膚炎における

好中球由来活性酸素の関与

荒谷康昭 . . . . . 45

8. 量子ドットの多臓器不全診断治療への応用

山本健二 . . . . . 51

9. 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

大川原明子 . . . . . 55

10. プロピルチオウラシルによる MPO-ANCA 産生のメカニズム

鈴木章一 . . . . . 61

III. 公開シンポジウム資料 . . . . . 65

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 97

V. 研究成果の刊行物・別刷（主要のみ） . . . . . 105

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）  
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

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：東邦大学 助教授

氏 名：高橋 啓

所属施設：東京理科大学 教授

氏 名：新井孝夫

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：自己免疫性の血管炎である MPO-ANCA 関連血管炎は、欧米よりわが国に多く、高齢者に発症し、近年増加している。本症は重篤な急速進行性糸球体腎炎(RPGN)をきたすことから、ステロイドパルスなどの治療が施行されているが、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。このためより有効な免疫補助療法が切望され、われわれのグループでは大量ガンマグロブリン製剤 (IVIg) 治療法により、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報告した。一方、血管炎である川崎病の治療には、IVIg 療法が標準化されている。ガンマグロブリンの需要は増え、感染症などのリスクが伴うことや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る。そこで、本研究では、ガンマグロブリンを人工化することにより、血液製剤の感染リスクの軽減、安全性と医療経済の向上推進を図る。本年度は、これまで作製してきたマウス型人工グロブリンは、血管炎モデルマウスに有効であり、治療法として予備的に完成した。また、本年度報告した IVIg 治療の血管炎への有効性の予備成績を基に、探索試験も開始された。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あわせて検討した。以上から、ヒト型人工グロブリンの作製準備とその臨床応用の準備はほぼ整った。日経産業新聞への掲載などもあり、国民的関心が寄せられている。

## A. 研究目的

ガンマグロブリン製剤治療は、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重症感染症、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。特に、難病の治療には、その大量療法 (IVIg) が有効である。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、感染症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マウス型を完成させ、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することを目的にした。そこで、二つの血管炎モデルマウス (3種類) を開発し治療実験を行う。モデルマウスの治療実験に必要な大量の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から別途作製した Fc を加えて人工グロブリン

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、また、探索試験も開始するなど、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. 基礎分科会

人工ガンマグロブリン作製、力価判定班および安全性向上評価

(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

### 2. 臨床分科会

IVIg の治療評価

(1) MPO-ANCA 陽性急速進行性糸球体腎炎に対する IVIg 療法前後の免疫学的指標の検討。

MPO-ANCA 関連腎炎・血管炎を呈する患者を対象とし、IVIg 療法前後の免疫学的指標を検討した。

**Bioplex 法**：IVIg 400mg/kg/day を導入期治療

として行った 14 例の Microscopic polyangiitis において導入期治療として IVIg を行い、IVIg 療法直前と、療法後でかつステロイドなどの免疫抑制療法開始前の値を求めた。Bio-Plex™ Cytokine Assays (Bio-RAD, USA) によって、IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MCP-1(MCAF), MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  の 17 種類のサイトカイン類を測定した。

QD-MPO 法：治療前、IVIg 治療後においてヘパリン化全血から得た分離好中球を、rubber well で 37°C, 10 分 incubate。PBS 洗浄後、FMLP(10<sup>-6</sup>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。

(2) 免疫グロブリンによる Reactive Oxygen Species 抑制効果：急性期川崎病症例 10 例で、IVIg 投与前、投与 3 日後、7 日後の血清 ROS 値を (Total ROS assay system) を測定した。対照は健常小児 19 例、年齢は 3m-3y とした。冠動脈病変を来した症例は無かった。

#### (倫理面での配慮)

患者の血液・血清の使用に当たっては、主任研究者の該当部分については、国立感染症研究所の倫理委員会 (以下「委員会」) 規定に従い実施した。具体的には、患者の検体が派生することが予想される場合には、1) 研究計画を含む具体的な研究計画書、2) 主治医を含む共同研究者との合意文書、患者とのインフォームドコンセントに関する実施計画概要を記載した書式を予め「委員会」に提出し、「委員会」の許可を得て実施することとし、個人情報にはコード化し、ネットワークでの個人情報交換はしないなど、プライバシー情報の漏洩がないよう万事を期した。また、分担研究者において実施する場合も同様の手順により行い、所属機関の倫理規定により許可を得て実施した。さらに、動物実験に関しては、動物実験計画書を所属機関の動物委員会 (分担研究者においては当該機関の同等委員会) の許可を得て、動物愛護のもとに行った。

## 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. 人工化ガンマグロブリン作製

#### (1) マウス型人工化グロブリンのポリクローナル抗体作製

人工グロブリン化用のマウス型ポリクローナル抗体の Fv の合成が完了し、Fc、CH など、必要なフラグメントの作製も終了した。完全長と IgG フラグメントの精製法も確立し、マウスの治療用の大量精製法も、ほぼ完成し、問題であった可溶性技術もクリアできた。

#### 1) ポリクローナル Fv の作製

MPO で免疫された MPO-KO マウスの脾臓 RNA より  $\gamma$ 、 $\mu$ 、および  $\kappa$  鎖の定常領域に特異的なプライマーによって抗体 cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として、マウス Fv 領域増幅プライマーを用いる PCR によって VH および VL 遺伝子を増幅した。また得られた VH および VL 遺伝子よりオーバーラップ PCR によって遺伝子を合成した。一方、大腸菌発現ベクター pET21a のクローニングサイト改変ベクター pTFV を構築した。pTFV を AsiSI および NotI で切断し、ウシ脾臓アルカリフォスファターゼで処理した後、同制限酵素処理が施された上記 scFv 遺伝子を T4 DNA リガーゼによって導入した。反応液より DNA を精製し、3 x 10<sup>7</sup>/ $\mu$ g DNA 以上の効率で大腸菌 BL21 Gold (DE3) 株 (Stratagene 社) へ導入した。形質転換された大腸菌で 6 L の大量培養 (37°C) した。菌体よりポリクローナルを回収した。封入体を 3M 尿素で十分に洗浄した後、8M 尿素で溶解した。

#### 2) 重鎖定常領域の作製

ヒト抗体重鎖定常領域 (CH-CH2-CH3) を分子シャペロン的一种である FKBP (FK506 binding protein) との融合蛋白質として大腸菌細胞質可溶性画分に合成した。大腸菌抽出液より、Protein A カラムにより FKBP-CH1-CH2-CH3 を吸着させ、0.1M グリシン塩酸緩衝液 (pH3.0) で溶出した。溶出された融合蛋白質を 50mM トリスリン酸緩衝液 (pH7.0) へ透析した。透析内液に PreScission protease を作用させ、CH1-CH2-CH3 を FKBP から遊離させた。プロテアーゼ消化物を pH8.9 下で TSLgel SuperQ-5PW カラムにより分離し、CH1-CH2-CH3 の画分を回収した。

CH1-CH2-CH3 を再び ProteinA カラムによって回収し 0.2%グルコース入りの生理食塩水へ透析し、25mg/ml まで濃縮した。モデル動物実験サンプルとした。得られた CH1-CH2-CH3 の還元、非還元状態での SDS-PAGE を図 1 に示す。

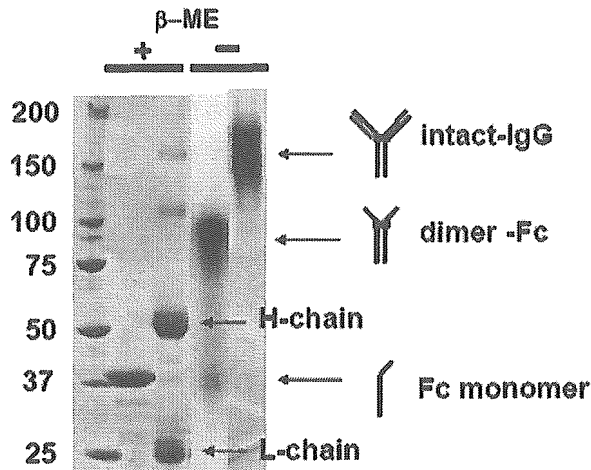


図 1. マウス型 IgG の SDS-PAGE

## (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

昨年度にひきつづき、病態エピトープを有するモノクローナル MPO 抗体の作製した。MPO-ANCA 血管炎のリスクエピトープが、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ている。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、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。(新井孝夫[東京理科大]、主任者、分担研究者)

## 2. モデル動物によるマウス型人工ガンマグロブリンの治療効果

IVIg の臨床応用にむけ、治療評価のために病態モデルマウスを開発してきた。

## (1) 血管炎モデルマウス

### 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。(基礎班全員)

### 2) RPGN モデルマウス

SCG/Kj マウスおよび Bovine serum albumin(BSA)誘導マウス。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 (W. Yumura, et al. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis. Microbiol.Immunol. 50: 149-157, 2006)。RPGN の疾患モデルの SCG/Kj マウスは、半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する。本マウスは、末梢血中に活性化好中球数が増加し、炎症を拡大し、腎臓への活性化好中球浸潤が半月体形成に重大な影響を及ぼしている。本研究において、SCG/Kj マウスの解析から MPO-ANCA の責任遺伝子座(*Man-1* および *Man-2* と命名)を明らかにした。(主任者他)

## (2) CAWS 誘導冠状動脈炎モデルマウスによるマウス型人工ガンマグロブリンの治療効果

CAWS 誘導によるマウス系統的血管炎誘発モデルに、人工免疫グロブリン(SyIG)を投与した際の血管炎抑制効果を検討した。Fv 部分からなる SyIG が投与された群では、対照群と比較して汎血管炎の進展範囲は限局化された。(高橋啓[東邦大学医学部附属大橋病院病理]、基礎班[分担者、協力者全員])

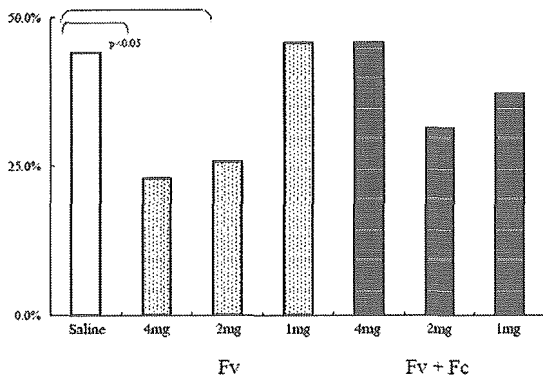


図2. マウス型 IgG による抑制効果

### (3) 心筋炎モデル動物マウスでの検証

劇症型心筋炎は、集中治療をしても約半数が死亡する難治性の疾患であり、積極的に炎症を沈静化する治療法の確立が望まれる。IVIg 療法はその一つとして期待されている治療法であるが有効性については不明な点が多い。一方、目的蛋白と免疫グロブリンの Fc 部分(Ig) 融合蛋白は、様々な炎症性疾患の治療に試みられるようになってきている。そこで我々は、ヒト劇症型心筋炎の IVIg の治療による効果と動物モデルでの Ig 融合蛋白治療の効果について検討した。まず劇症型心筋炎の IVIg 治療 (IVIg(+))群 8 例、IVIg(-)群 16 例) の経験から IVIg の効果や特徴を解析し、さらにヒトの劇症型心筋炎に類似すると考えられるラット自己免疫性心筋炎の Ig 融合蛋白治療の効果 (IL-13Ig、CTLA4Ig、IL-1RAIg など) を検討した。結果は、IVIg による死亡率の統計学的有意差は認めなかったが、投与例の死亡率が低い傾向を認め、臨床的には  $\gamma$  グロブリンが奏効したと推測される症例が存在した。ラット自己免疫性心筋炎ではいくつかの Ig 融合蛋白治療によって明らかに有効性を示した。劇症型心筋炎に対して IVIg 治療や Ig 融合蛋白治療が今後期待される治療となることが示唆された。(相澤義房[新潟大学大学院医歯学総合研究科])

### 3. 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。本疾患の IVIg の治療評価も検討した。また、自己免疫性の血管炎である MPO-ANCA 関連血管炎(RPGN)を呈する腎炎の治療法に川崎病の IVIg 治療のプ

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検討の前段階として、まず、RPGN における IVIg を施行し、国際誌に報告し (T. Ito-Ihara, *et al.* Clinical Efficacy of Intravenous Immunoglobulin for Patients with MPO-ANCA-associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract.* 102:c35-c42, 2005)、高い評価を受けた。現在コントロール試験を加えた探索試験を開始した。人工化 IVIg の治療法へ向けて準備が着々と進んでいる。日経産業新聞への掲載などもあり、国民的関心が寄せられている。(武曾恵理[北野病院]、臨床班分科会員および協力研究者)

### (1) IVIg 治療評価

#### 1) RPGN における 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 Fc $\gamma$ R 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。これらの効果の評価法の探索として、Th1 誘導性サイトカインである IL12 をはじめとして、様々な炎症性サイトカインの変動を検討してきたが、今年度はこれら多彩なサイトカインを少量の検体で短時間で処理できる、Bioplex の各分画の血中濃度の変異につき 14 症例の IVIg 前後での変化を検討した。一方、活性化した好中球の指標である MPO 発現については、昨年より検討していた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により IVIg による活性化好中球の抑制が観察され今後の病変活動性の変動を検討する手段の確立がなされつつある (武曾恵理[北野病院]、班員および協力研究者)

#### 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。その OS の原因物質として reactive oxygen species (ROS)が報告され、ROS には、super anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical が含まれ、再灌流傷害、糖尿

病、低酸素血症で上昇する。今回、血液中で安定した ROS を測定し得た。使用 IVIG 1g/kg・日：2例、2g/kg・日：8例。aKD—IVIG 前値 284±57(unit)：健常対照：190±53 で有意に ROS 値は上昇していた。IVIG 投与前と投与 3 日後 (240±49)、投与 7 日後 (226±66) では有意に低下していた。ROS は心筋傷害のパラメータである BNP と有意に相関していた。(佐地 勉[東邦大学医療センター大森病院小児科]、他)

### 3) 多発性筋炎/皮膚筋炎に対するIVIg療法に関する研究

ステロイド抵抗性の多発性筋炎/皮膚筋炎 (polymyositis/dermatomyositis:PM/DM) 2 症例に対して、IVIg 療法を行った。筋力、日常生活動作 (ADL) スコアおよび血中クレアチニンキナーゼ (CK) 値を観察したところ、いずれの症例においても、IVIg 施行後に筋力、ADL スコアの改善、CK 値の正常化が認められ、ステロイド薬の減量が可能となった。明らかな副作用は認められなかった。IVIg 療法は PM/DM に対して有効であることが知られており、難治性の症例や副作用のためステロイド薬などが使用できない症例では特に有用であり、今後は使用適応基準の検討が必要と考えられる。(橋本博史[順天堂大学]および協力者)

### 4. モデルマウスの誘導に関する基礎的検討および評価法の開発

#### (1) *Candida albicans* 由来可溶性菌体外多糖 CAWS の致死活性に関する研究

*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可溶性多糖画分 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。一方、マウスに静脈内投与すると致死毒性を示すことが明らかとなっている。急性致死毒性は CAWS 投与後、1 時間以内に起こり、痙攣、下痢、虚脱などのアナフィラキシーショック様の症状を示す。本研究では、この急性致死毒性発現に関わる因子について解析した。CAWS の致死毒性発現は臨床のアナフィラキシーショックの治療薬であるエピネフリンの投与によって抑制され、生理活性物質であるヒスタミン、セロトニン、PAF を同時にブロックすることで抑制された。ヒスタミン、セロトニン、PAF のいずれか 1

つだけのブロックでは CAWS の致死は抑制できなかった。以上のことから、CAWS の急性致死毒性発現には、いくつかの生理活性物質が同時に産生されることで起こる可能性のあることが強く示唆された。(大野尚仁[東京薬科大学薬学部]、分担研究者および協力研究者)

#### (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を用い解析を行った。CAWS 投与後初期に骨髄からの移動によって末梢好中球が増加、活性化すること、また炎症性サイトカイン、ケモカインが産生されることを既に報告した。本年度は、*in vitro* の系で CAWS 刺激によって好中球が産生するサイトカインについて検討した。また、ICAM-1 を指標として心大動脈局所における初期の傷害の可能性について、さらに、好中球活性化の原因のひとつとして補体活性化が関与することを明らかにした。(大川原明子[国立感染症研究所生物活性物質部]および主任者、研究協力者)

#### (3) MPO の生体での役割の解析

紫外線で誘発される皮膚炎における好中球機能異常の影響を解析した。紫外線をマウスの背部に照射して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、好中球からの活性酸素産生を欠如するミエロペルオキシダーゼ欠損マウスや NADPH オキシダーゼ欠損マウスの方が、野生型マウスよりも皮膚の炎症が早期に進行した。これらのノックアウトマウスの好中球は、KC に対する走化性と MIP-2 産生量が、野生型好中球よりも高いことがわかった。このような好中球機能異常が、紫外線で誘発される皮膚炎を促進している可能性が示唆された。(荒谷康昭[横浜市立大学木原生物学研究所])

#### (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

本研究の目的は、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細胞染色、特に血管炎関連抗原について標識した血球成分の動態を生体内で観測する技術を開発することを目的としている。今年度は、特にナノプローブを用いて好中球関連の抗原である MPO に対する抗体を標識



し活性化した好中球を可視化した。(山本健二 [国立国際医療センター 研究所・副所長]および主任者、研究協力者)

#### (5) MPO-ANCA の産生機序の解析

抗甲状腺剤であるプロピルチオウラシル (PTU) 投与した患者における (MPO-ANCA 産生機序に関し、PTU の樹状細胞の分化に及ぼす影響を、マウス骨髄細胞培養系を用いて解析した。PTU の治療を受けた患者では pDC と CD11b(low)DC の数が減少した。CD11b(high)DC の割合が増加している可能性が考えられ、CD11b(high)DC の割合が増加により自己抗体が産生されやすくなり、その結果、CD11b(high)DC の割合の増加が PTU による MPO-ANCA 産生の引き金となっている可能性が考えられる。(鈴木章一 [長崎大学熱帯医学研究所])

#### 5. 安全試験

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

本年度は、これまで作製してきたマウス型人工グロブリンは、血管炎モデルマウスに有効であり、治療法として予備的に完成した。また、すでに報告した IVIg 治療の血管炎への有効性の予備成績を基に、本年度から探索試験も開始した。

以上から、われわれが開発した血管炎のモデルマウスを用いたマウス型人工化グロブリンの治療成績は良好であった。また、臨床研究の報告について論文掲載し、それに基づき、探索試験が開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て国際誌に発表した (T. Ito-Ihara, *et al.* Clinical Efficacy of Intravenous Immunoglobulin for Patients with MPO-ANCA-associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract.* 102:c35-c42, 2005)。MPO-ANCA 関連血管炎は、日本で発症頻度がヨーロッパより多く、日本での血管炎に適した IVIg 治療による補助療法が求められていた。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が伴うことや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、血管炎治療用をめざしたマウス型人工グロブリン合成が可能となり、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、マウス型人工グロブリンの開発はほぼ完了した。

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検討し、今後も、臨床および基礎班での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)

#### E. 結論

血管炎である川崎病では、IVIg 治療が標準治療法になっている。本研究事業において、血管炎である MPO-ANCA 関連血管炎 RPGN において 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て国際誌に報告した。さらに、ガンマグロブリンの需要は増えており、感染症などのリスクが伴うことや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。そこで、本研究において、ガンマグロブリンを人工化することにより、血液製剤の感染リスクの軽減、安全性と医療経済の向上推進を図る。マウス型人工グロブリンは、血管炎モデルマウスに有効であり、治療法として予備的に完成した。また、本年度から探索試

験も開始した。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あわせて検討した。以上から、ヒト型人工グロブリンの作製準備とその臨床応用の準備はほぼ整った。日経産業新聞への掲載などもあり、国民的関心が寄せられている。

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（長門総合病院部長）  
山西裕司（広島市民病院部長）

##### 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、主任研究員）  
宇野賀津子（ルイ・パストゥール医研セ室長）

##### 3) アドバイザー

仁保喜之（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

（分担者については分担者の項を参照）

##### 1. 論文発表

1. Y. Hamano, K. Tsukamoto, M. Abe, G.D. Sun, D. Zhang, H. Fujii, S. Matsuoka, M. Tanaka, A. Ishida-Okawara, H. Tachikawa, H. Nishimura, K. Tokunaka, O. Hino, S. Hirose, and K. Suzuki. Genetic Dissection of Vasculitis, Myeloperoxidase-Specific Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Production, and Related Traits in

Spontaneous Crescentic Glomerulonephritis-Forming/Kinjoh Mice. *J. Immunol.*, in press, 2006.

2. W. Yumura, M. Itabashi, A. Ishida-Okawara, K. Tomizawa, J. Yamashita, Y. Kaneshiro, H. Nihei, and K. Suzuki. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis. *Microbiol.Immunol.* 50: 149-157, 2006.
3. N. Nagai-Miura, T. Harada, H. Shinohara, K. Kurihara, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S., Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal pathogen, CAWS. *Atherosclerosis* in press, 2006.
4. A. S. Persad, Y. Kameoka, S. Kanda, Y. Niho, K. Suzuki. Arginine to Cysteine Mutation (R499C) Found in a Japanese Patient with Complete Myeloperoxidase Deficiency. *Gene Expression* in press, 2006.
5. H. Yasuda, N. Yoshizawa, K. Suzuki Modeling on social spread from immunity. *Jpn J Infect Dis*, 58, S14-S15, 2005
6. K. Suzuki, K. Yamamoto and H. Yoshikura. Focusing on Assessment of Risk to Communities in International Symposium on Infectious Agent Transmission Model Building. *Jpn J Infect Dis*, 58, S1-S2, 2005.
7. T. Matsuki, K. Isoda, R. Horai, A. Nakajima, Y. Aizawa, K. Suzuki, F. Ohsuzu, and Y. Iwakura. Involvement of TNF- $\alpha$  in the development of T cell-dependent aortitis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation* 112: 1323-1331, 2005.
8. T. Ito-Ihara, T. Ono, F. Nogaki, K. Suyama, M. Tanaka, S. Yonemoto, A. Fukatsu, T. Kita, K. Suzuki, and E. Muso. Clinical Efficacy of Intravenous Immunoglobulin for Patients with MPO-ANCA-associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract.* 102:c35-c42, 2005
9. R. Suzuki, K. Tomizawa, K. Suzuki, M. Tanokura. MPO-ANCA binding site on MPO molecule estimated from epitope mapping study and molecular modeling. *Bioimages* 12: 85-90, 2005.
10. M. Fujieda, K. Suzuki, H. Sato, M. Hattori, N. Wada, M. Tsuchiya, N. Okamoto, T. Murata, M. Matsudaira, M. Shimizu, K. Ohta, K.

Naruse, S. Sugihara and H. Wakiguchi. Epitope analysis of myeloperoxidase-specific antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (MPO-ANCA) in childhood onset Graves' disease treated with propylthiouracil. *Clinical Nephrology*, 63:437-445, 2005.

11. 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.
12. 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.

## 2. 学会発表 国際会議

1. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H: Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Cryptococcus neoformans*. 13th Gordon Research Conference, Connecticut, USA.
2. K. Suzuki, K. Murayama, T. Nagao, T. Oharaseki, A. Hasegawa, A. I. Okawara, N. N. Miura, N. Watanabe, M. Handa, K. Takahashi, N. Ohno, H. Minamitani, T. Nakayama, T. Arai. Contribution of CD69 to the development of coronary arteritis induced with a vasculitis Inducer *Candida albicans* water soluble fraction. 13th Gordon Research Conference, Connecticut, USA.
3. N. Ohno, N. N. Miura, H. Shinohara, H. Sankawa, Y. Adachi, A. I. Okawara, and K. Suzuki. Strain dependency of CAWS-induced coronary arteritis in mice. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
4. Eri Muso, Toshiko Ito-Ihara, Takahiko Ono, Enyu Imai, Kunihiro Yamagata, Akira Akamatsu, Kazuo Suzuki. Establishment of the evidence of beneficial effect of Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy on MPO-ANCA related polyangiitis combining rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) in Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
5. Toshiko Ito-Ihara, Kazuko Uno, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Toshiyuki Komiyama, Akiko Ishida-Okawara, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Kazuo Suzuki, and Eri Muso. Sensitive detection of myeloperoxidase expression on neutrophil of patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
6. S. Fujimoto, S. Uezono, S. Hisanaga, K. Fukudome, S. Kobayashi, N. Tamura, K. Suzuki, H. Hashimoto, H. Nunoi. Incidence of primary renal vasculitis in Miyazaki, Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
7. S. Kobayashi, N. Tamura, T. Ihara, E. Muso, K. Suzuki, M. Yoshida, K. Nakabayashi, N. Tsuchiya, M. Kurosawa, Y. Inaba, S. Fujimoto, H. Nunoi, H. Hashimoto. Prevalence of microscopic polyangiitis/Wegener's granulomatosis and the ratio of P-,MPO-/C-,PR-3- ANCA in ANCA-associated vasculitis in Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
8. A. Ishida-Okawara, N. Nagai-Miura, T. Oharaseki, N. Ohno, K. Takahashi, H. Okamura, P.A. Ward, K. Suzuki. Neutrophil activation as in initial step with CAWS in mouse. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
9. K. Suzuki, K. Murayama, T. Nagao, T. Oharaseki, A. Hasegawa, A. Ishida-Okawara, N. N. Miura, N. Watanabe, M. Handa, K. Takahashi, N. Ohno, H. Minamitani, T. Nakayama, T. Arai. Contribution of CD69 to the development of coronary arteritis induced with a vasculitis Inducer *Candida albicans* water soluble fraction. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.

10. Hoshino, T. Nagao, K. Murayama, A. Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, K. Uno, E. Muso, N. Nagi-Miura, N. Ohno, S. Naoe, K. Tokunaka, M. Yasuhara, K. Yamamoto and K. Suzuki. Trace of antibody to myeloperoxidase (MPO) with nanocrystal quantum dots-labeled antibody recognizing activating neutrophils in glomerulonephritis and a vasculitis inducer CAWS-injected mice. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
11. T. Ito-Ihara, K. Uno, T. Ono, A. Fukatsu, T. Kita, K. Suzuki, and E. Muso. Circulating myeloperoxidase and cytokine profiles in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. 3rd World Congress of Nephrology. Singapore.
12. Kura F, Kobayashi S, Amemura-Maekawa J, Aratani Y, Suzuki K, Watanabe H. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Legionella pneumophila*. 6th International Conference on *Legionella*. October 16-20, 2005, Chicago, USA.
13. Miura NN, Komai M, Shingo Y. Adachi Y, Okawara AI, Oharaseki T, Takahashi K., Naoe S, Suzuki K, Ohno N. Cytokine synthesis of splenic lymphocytes in murine coronary arteritis model induced by CAWS (*Candida albicans* water-soluble fraction) administration. International Cytokine Society Conference 2005, October 27-31, 2005, Soul, Korea.
14. Suzuki K. Estimation of the development of rapid progressive glomerulonephritis (RPGN) by the Quantum Dots. International Symposium on Colloidal Quantum Dots for Bio-Medical Applications and Their Safety, November 26, 2005, Kobe, Japan.
15. A. Hoshino, T. Nagao, K. Fujioka, T. Ito-Ihara, K. Uno, E. Muso, K. Murayama, A. Ishida-Okawara, N. Nagi-Miura, N. Ohno, S. Naoe, K. Tokunaka, M. Yasuhara, K. Yamamoto, and K. Suzuki. Trace of Antibody to Myeloperoxidase with Nanocrystal Quantum Dot-Labeled Antibody Recognizing Activating Neutrophils in Glomerulonephritis and Vasculitis Inducer *Candida albicans* Water-Soluble Glycoprotein-Injected Mice. The International Society for Optical Engineering-BIOS 2006 - Symposia - Photonics West 2006 - Program - Conferences 21-26 January 2006, San Jose, California, USA
16. K. Suzuki. Needs of Synthetic IVIg in the World. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
17. T. Nozu, M. Kondo, K. Suzuki, A. Nagai, Prevalence and clinical manifestation of pulmonary fibrosis in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
18. K. Takahashi, K. Suzuki, et al. The Effect of Synthetic Immunoglobulin (SyIG) in Mice Vasculitis Model caused by CAWS. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
19. N. Ohno, K. Suzuki, et al. Culture condition modulates active moiety of CAWS, vasculitis inducer from *C. albicans*. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
20. A.I. Okawara, K. Suzuki, et al. Activation of neutrophils in the initial step of arteritis induction by CAWS. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
21. T. Ito-Ihara, K. Suzuki, et al. Circulating Levels of IL-12, 23 and IL-18 in Patients with MPO-ANCA-associated Vasculitis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of

- Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
22. T. Ono, K. Suzuki, et al. The relationship between renal lesions and lung vascular lesions in SCG/Kj mice as a model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  23. W. Yumura, K. Suzuki, et al. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis - Analysis of Pathogenesis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  24. Y. Yamanishi, K. Suzuki, et al. Usefulness of nMPO-ANCA in diagnosing and treating vasculitis - discrepancy between MPO-ANCA and nMPO-ANCA-. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  25. M. Furutani, K. Suzuki, et al. Synthetic polyclonal immunoglobulin. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
4. 原田 敏江, 川南 裕美, 三浦 典子, 安達 禎之, 鈴木 和男, 大野 尚仁 真菌多糖による GM-CSF を介したサイトカイン産生誘導機構 生体防御機能ワークショップ 2005 -第 2 回香川ガレクチンカンファレンス共催 6 月 9 日-10 日(高松)
  5. 鈴木和男, 村山研, 長尾朋和, 大川原明子, 大原関利章, 高橋啓, 長谷川明洋, 三浦典子, 大野尚仁, 渡邊直英, 半田誠, 南谷晴之, 野津朋子, 永井厚志, 新井孝夫, 中山俊憲 Candida albicans water soluble fraction(CAWS)によって誘導される冠状動脈炎の発症への CD69 の関与 生体防御機能ワークショップ 2005 -第 2 回香川ガレクチンカンファレンス共催 6 月 9 日-10 日(高松)
  6. 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 関連急速糸球体腎炎の血中サイトカインの動態 第 48 回日本腎臓学会学術総会 6 月 24 日(横浜)
  7. 星野昭芳, 長尾朋和, 村山研, 大川原明子, 猪原登志子, 武曾恵理, 宇野賀津子, 三浦典子, 大野尚仁, 直江史郎, 徳中一寛, 安原真人, 山本健二, 鈴木和男 血管炎発症初期の好中球活性化に関与する血中サイトカインの変動と QD 標識 MPO 抗体の *in vivo* トレース 第 70 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 7 月 20-21 日(京都)
  8. 長尾朋和, 村山研, 大川原明子, 大原関利章, 高橋啓, 長谷川明洋, 三浦典子, 大野尚仁, 渡邊直英, 半田誠, 南谷晴之, 野津朋子, 永井厚志, 新井孝夫, 中山俊憲, 鈴木和男 CD69 関与の血管炎発症に連動する 8 種サイトカインの挙動第 70 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 7 月 20-21 日(京都)

#### 国内会議

1. 荒谷康昭, 倉 文明, 渡辺治雄, 高野幸枝, 鈴木和男, 小山秀機 真菌感染と好中球機能第 78 回 日本細菌学会総会シンポジウム 4 月 4 日-5 日(東京)
2. 多田 壘, 三浦典子, 安達禎之, 鈴木和男, 大野尚仁 Candida albicans 菌体由来多糖画分と LPS (E. coli O9) の免疫化学・生物活性の交差反応性の解析 第 78 回日本細菌学会総会 4 月 4 日-6 日(東京)
3. 鈴木和男 安全なガンマグロブリン製剤一血管炎治療をめざして一 第 12 回代替血液学会 6 月 6-7 日(東京)
9. 猪原登志子, 宇野賀津子, 古宮俊幸, 辻井知美, 塚本達雄, 岸田綱太郎, 小野孝彦, 鈴木和男, 深津敦司, 北徹, 武曾恵理 ANCA 関連血管炎症候群における IL-12 と IL-18 の動態 第 70 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 7 月 20-21 日(京都)
10. 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 シンポジウム 1 『生体防御異常が誘発する難治性疾患』難治性血管炎の発症機序と治療戦略第 16 回日本生体防御学会学術総会 8 月

- 4日～8月6日(東京)
11. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、高野幸枝、赤川久義、鈴木和男、小山秀機好中球の機能異常が誘発する真菌感染 第16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
  12. 亀岡洋祐、伊東玲子、笠間毅、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回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
  13. 倉文明、小林静史、前川純子、常彬、荒谷康昭、鈴木和男、渡辺治雄 シンポジウム3『生体防御の役割をになう新ファミリー-NOX: 植物-動物』*Legionella pneumophila* に対する感染防御機構、NOX2など 第16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
  14. 鈴木和男 パネルディスカッション『感染症防御-歴史と新しい研究アプローチに向けて』 第16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
  15. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、柏村信一郎、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16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
  16. 長尾朋和、村山研、野津朋子、大川原明子、大原関利章、高橋啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田誠、南谷晴之、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 CD69分子と活性化好中球による血管炎発症 第16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
  17. 星野昭芳、長尾朋和、村山研、大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、宇野加津子、三浦典子、大野尚仁、直江史郎、徳中一寛、安原真人、山本健二、鈴木和男量子ドット(QD)標識抗マウス MPO 抗体を用いた血管炎発症に関わる活性化好中球 MPO分子の蛍光による検出 第16回日本生体防御学会学術総会 8月4日～8月6日(東京)
  18. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのクリプトコッカス感染防御能の低下 第11回 MPO 研究会 10月15～16日(福岡)
  19. 大野尚仁、篠原弘靖、三浦典子、石橋健一、安達禎之、大川原明子、鈴木和男、大原関利章、高橋啓、直江史郎 真菌由来の PAMPs, *Candida albicans* Water-soluble fraction (CAWS) の血管炎惹起能における  $\beta$  マンノース残基の影響」第11回 MPO 研究会 10月15～16日(福岡)
  20. 亀岡洋祐、Persad A、鈴木和男 「ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチドに対する抗体の性状 第11回 MPO 研究会 10月15～16日(福岡)
  21. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒト MPO 分子にける MPO-ANCA エピトープ解析 第11回 MPO 研究会 10月15～16日(福岡)
  22. 武曾恵理、鈴木進子、岩崎由加子、辻井知美、古宮俊幸、米本智美、塚本達雄、猪原登志子、宇野賀津子、鈴木和男 MPO-ANCA 関連腎炎血管炎に合併する悪性疾患症例の解析と考察 第11回 MPO 研究会 10月15～16日(福岡)
  23. 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理 ANCA 関連血管炎症候群における IL-12, IL-23 と IL-18 の動態 ANCA 関第11回 MPO 研究会 10月15～16日(福岡)
  24. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、柏村信一郎、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11回 MPO 研究会 10月15～16日(福岡)
  25. 鈴木和男、長尾朋和、村山研、大川原明子、大原関利章、高橋啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田誠、南谷晴之、野津朋子、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲 好中球血管炎発症にかかわる CD69 分子と活性化好中球 第11回 MPO 研究会 10月15～16日(福岡)
  26. 松村実美子、長尾朋和、三川浩輝、村山研、大川原明子、南谷晴之、鈴木和男血管炎発症機構の解析:MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用 第11回 MPO 研究会 10月15～16日(福岡)
  27. 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理 ANCA 関連血管炎症候群における IL-12, IL-23 と IL-18 の動態 第11回 MPO 研究会 10月15～16日(福岡)

28. 鈴木和男、星野昭芳、長尾朋和、猪原登志子、宇野賀津子、徳中一寛、大川原明子、三浦典子、大野尚仁 Qドットによる進行性糸球体腎炎の評価 第11回MPO研究会 10月15~16日(福岡)
29. 松村実美子、長尾朋和、三川浩輝、村山 研、大川原明子、南谷晴之、鈴木和男血管炎発症機構の解析:MPO-ANCAと好中球の糸球体内皮細胞への作用 第14回日本バイオイメージング学会 10月26-28日(東京)
30. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒトMPO分子におけるMPO-ANCAエピトープ解析 第14回日本バイオイメージング学会 10月26-28日(東京)
31. 鈴木和男 好中球自己抗体MPO-ANCAの抗原性と病態 第33回臨床免疫学会 10月28-30日(京都)
32. 鈴木和男 血管炎発症機構におけるCD69分子を介する好中球・血小板相互反応第28回日本血栓止血学会 11月23-25日(福岡)
33. 飛田俊介、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、中山俊憲、大野尚仁  $\beta$ グルカンをを用いたコラーゲン誘発関節炎モデルにおけるCD69の発現解析第28回分子生物学会 12月8-10日(福岡)
34. 亀岡洋祐、笠間 毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男 ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチドの細胞内局在 第28回分子生物学会 12月8-10日(福岡)
35. 松村 実美子、長尾 朋和、三川 浩輝、村山 研、大川原 明子、南谷 晴之、鈴木 和男血管炎発症機構の解析:MPO-ANCAと好中球の糸球体内皮細胞への作用 第28回分子生物学会 12月8-10日(福岡)
36. 野津朋子、松村実美子、大川原明子、長谷川明洋、中山俊憲、永井厚志、鈴木和男 活性化好中球関与の肺血管内皮細胞の機能解析第28回分子生物学会 12月8-10日(福岡)
37. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒトMPO分子上のMPO-ANCA結合部位エピトープ解析 第28回分子生物学会 12月8-10日(福岡)
38. 長尾朋和、大原関利章、長谷川明洋、大川原明子、三浦典子、野津朋子、高橋啓、大野尚仁、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 CD69 contributes to the development of vasculitis 第35回免疫学会 12月13-15日(横浜)
39. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、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 第35回免疫学会 12月13-15日(横浜)
40. 鈴木和男、星野昭芳、長尾朋和、猪原登志子、宇野賀津子、徳中一寛、大川原明子、三浦典子、大野尚仁 血管炎発症初期の好中球活性化に関与する血中サイトカインの変動とQD標識MPO抗体のin vivoトレース 第35回免疫学会 12月13-15日(横浜)
41. 大野尚仁、三浦典子、石橋健一、安達禎之、高橋啓、大原関利章、直江史郎、大川原明子、鈴木和男 Candida albicans由来の血管炎惹起物質CAWSの活性部位の解析 第35回免疫学会 12月13-15日(横浜)

#### Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他

なし

## MPO-ANCA 陽性急速進行性糸球体腎炎に対するIVIg療法前後の免疫学的指標の検討

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

協力研究者：猪原登志子<sup>1, 2, 3</sup>、古宮俊幸<sup>1</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>5</sup>

<sup>1</sup>田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科、<sup>2</sup>京都大学大学院医学研究科循環器病態学<sup>3</sup>京都ルー・パスツール医学研究センター、<sup>4</sup>国立国際医療センター研究所<sup>5</sup>国立感染症研究所・生物活性部、<sup>6</sup>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。これらの効果の評価法の探索として、Th1誘導性サイトカインであるIL12をはじめとして、様々な炎症性サイトカインの変動を検討してきたが、今年度はこれら多彩なサイトカインを少量の検体を短時間で処理できる、Bioplexの各分画の血中濃度の変異につき14症例のIVIg前後での変化を検討した。一方、活性化した好中球の指標であるMPO発現については、昨年より検討していた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によりIVIgによる活性化好中球の抑制が観察され今後の病変活動性の変動を検討する手段の確立がなされつつある。

### A. 研究目的

IVIgによるMPO-ANCA関連急速進行性糸球体腎炎に対する免疫修飾効果を1) サイトカイン-BioPlexによる多彩なサイトカイン発現と2) 活性化好中球のカンタムドット(QD)ラベルした抗MPO抗体を用いたMPO発現の強度で検証する。

### B. 研究方法

1) Bioplex法：2000年1月から2004年12

月までにIVIg 400mg/kg/dayを導入期治療として行った14例のMicroscopic polyangiitisにおいて導入期治療としてIVIgを行い、IVIg療法直前と、IVIg療法後でかつステロイドなどの免疫抑制療法開始前の値を求めた。Bio-Plex™ Cytokine Assays Human cytokine 17-plex panel (Bio-RAD, USA)を用い、IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, MCP-1(MCAF), MIP-1β, TNF-αの17種類のサイトカイン類について測定した。



2) QD-MPO 法：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 × 10<sup>6</sup> 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<sup>-6</sup>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。

### C 研究結果

1) Bioplex 法：14 例の患者は平均年齢 73 ± 11 SD (57-88)であり、そのうち女性 8 人 (F 平均年齢 78±10 SD)、男性 6 人(M 平均年齢 67 ±10 SD)であった。全例が MPO-ANCA 陽性であり、腎生検所見より組織学的に Microscopic polyangiitis と診断された。IVIg 前に比べ TNF-α と IL-6 の IVIg 後の有意に低下を認めた。TNF-α (Before IVIg 40.5±15.5 SEM pg/ml vs After IVIg 27.4±6.3 SEM pg/ml, p=0.0043 with Wilcoxon single-rank test). IL-6 (Before IVIg 73.9±23.1 SEM pg/ml vs After IVIg 30.7±10.1 SEM pg/ml, p=0.0019 with Wilcoxon single-rank test). IL-8 についても IVIg 後に低下の傾向がみられた。(Before IVIg 89.7±59.9 SEM pg/ml vs After IVIg 18.7±2.3 SEM pg/ml, p=0.0413 with Wilcoxon single-rank test)。

表. Cytokine profile before and after IVIg.

Cytokines	n	Before IVIg (pg/ml)	After IVIg (pg/ml)	p-value Wilcoxon signed rank sum test
TNF-α	14	40.5 ± 15.5	27.4 ± 6.3	0.004
MCP-1	14	166.6 ± 53.0	129.8 ± 34.6	0.272
MIP-1β	14	156.9 ± 29.1	140.6 ± 18.1	0.424
IFN-γ	14	383.7 ± 281.8	236.7 ± 142.1	0.730
GM-CSF	14	20.2 ± 12.9	11.5 ± 5.3	0.224
G-CSF	14	372 ± 281	251 ± 151	0.379
IL-1β	14	18.2 ± 13.7	8.5 ± 4.6	0.829
IL-2	14	77.9 ± 37.6	54.3 ± 23.7	0.900
IL-4	14	OOB<	OOB<	
IL-5	14	17.8 ± 14.5	12.7 ± 9.7	0.041
IL-6	14	73.9 ± 23.1	30.7 ± 10.2	0.002
IL-7	14	111.2 ± 102.2	65.0 ± 55.4	0.730
IL-8	14	89.7 ± 59.9	18.7 ± 2.3	0.041
IL-10	14	14.4 ± 8.8	6.3 ± 2.4	0.064
IL-12p70	14	945 ± 938	348 ± 337	0.090
IL-13	14	101.7 ± 68.7	101.8 ± 75.3	0.180
IL-17	14	14.0 ± 0.7	13.5 ± 0.6	0.576

OOB<, Out of range below; data ± SEM

2) QD-MPO 法：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。

### D.E. 考察と結語：

IVIg 療法の効果発現の一部にはサイトカインの修飾機序が考えられた。Bio-Plex は少量の検体量で各種サイトカインが測定でき、治療効

果判定の手段として有用であると考えられた。また、QDを用いた鋭敏な感知系によりIVIg療法で活性化した好中球のMPO発現が抑制されることが観察しうる事が検証された。

## F. 健康危険情報 特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 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.* 2006;102(1):c35-42.

2) 猪原登志子, 武曾恵理. ANCA 関連血管炎に対する大量γグロブリン療法. *Annual Review 腎臓.* 2006;231-240.

3) 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

4) 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

5) 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 先端医学社 (印刷中)

### 2. 学会発表

1) Toshiko Ito-Ihara, Kazuko Uno, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto,

Toshiyuki Komiya, Akiko Ishida-Okawara, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Kazuo

Suzuki, and Eri Muso. Sensitive detection of myeloperoxidase expression on

neutrophil of patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. 12th International ANCA workshop.

15-18, June, 2005. Heidelberg, Germany.

2) 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 マウスにおける好中球活性化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, 平成17年6月23日. 横浜。

3) 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 関連急速糸球体腎炎の血中サイトカインの動態. 第48回日本腎臓学会学術総会, 平成17年6月24日. 横浜。

4) Toshiko Ito-Ihara, Kazuko Uno, Takahiko Ono, Atsushi Fukatsu, Toru Kita,

Kazuo Suzuki, and Eri Muso. Circulating myeloperoxidase and cytokine profiles

in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated

glomerulonephritis. 3rd World Congress of Nephrology. 26-30, June, 2005.

Singapore.

5) 猪原登志子, 宇野賀津子, 古宮俊幸, 辻井知美, 塚本達雄, 岸田綱太郎, 小野孝彦, 鈴木和男, 深津敦司, 北徹, 武曾恵理. ANCA 関連血管炎症候群におけるIL-12とIL-18の動態. 第70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17年7月20-21日, 京都。

- 6) 猪原登志子、大川原明子、劉寧、日浅俊介、雜賀寛、根本久一、武曾恵理、鈴木和男、北徹、小野孝彦。SCG/Kj マウスにおける好中球活性化と糸球体内凝固の進行。第 17 回腎とフリーラジカル研究会。平成 17 年 9 月 17 日、岡山。
- 7) 猪原登志子、大川原明子、劉寧、日浅俊介、雜賀寛、根本久一、北徹、武曾恵理、鈴木和男、小野孝彦。ANCA 関連半月体形成性糸球体腎炎モデル SCG/Kj マウスにおける好中球 MPO 放出と凝固系活性化を介した半月体形成機序。第 11 回 MPO 研究会。平成 17 年 10 月 15 日。福岡。
- 8) 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理。ANCA 関連血管炎症候群における IL-12, IL-23 と IL-18 の動態。第 11 回 MPO 研究会。平成 17 年 10 月 16 日。福岡。
- 9) Toshiko Ito-Ihara, Kazuko Uno, Toshiyuki Komiyama, Tomomi Tsujii, Tatsuo Tsukamoto, Tsunataro Kishida, Takahiko Ono, Kazuo Suzuki, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Eri Muso, Circulating levels of IL-12, 23 and IL-18 in patients with MPO-ANCA-associated vasculitis. International Symposium on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. 7th, Feb. 2006. Tokyo, Japan.
- 10) 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)
- 11) 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 誘導糸球体修飾に対する Angiotensin II receptor blocker の影響 第 48 回日本腎臓学会学術総会 2005.6.23-25 (横浜)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)

17) 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)

18) 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, 2005 (Philadelphia)

#### 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