

## 多発性筋炎/皮膚筋炎に対するIVIg療法に関する研究

分担研究者 橋本博史 順天堂大学 名誉教授

**研究要旨：**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、ガンマグロブリン大量静注（high-dose intravenous immunoglobulin: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。

### A. 研究目的

PM/DMは、横紋筋に慢性炎症を認める膠原病である。病態は、PMでは筋細胞に対する細胞性の傷害によるのに対し、DMは液性因子による筋組織の血管傷害に起因する。症例により経過、予後、治療に対する反応は様々であり、現在、治療の第一選択は副腎皮質ステロイド薬であるが、治療抵抗性の場合には免疫抑制薬が併用される。しかし、一部はなお治療抵抗性であり、重症な身体障害に至ったり、免疫抑制療法の副作用により治療が継続できない場合がある。近年、難治性のDM/DMに対するIVIg療法の有用性が報告されている。今回、ステロイド抵抗性のDM/DMの2症例に対しIVIg療法を施行し、その効果および副作用について検討を行った。

### B. 研究方法

Bohanの診断基準を満たしPM/DMと診断

された症例のうち、1 mg/kg/day以上のステロイド投与を4週間以上受けているにもかかわらず、徒手筋力検査での合計スコアが80点以下で筋力の改善が認められない場合、ステロイド抵抗性と判断しIVIg療法の適応とした。IVIg療法は、ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン0.4 g/kg/dayを5日間投与した。主要評価項目は徒手筋力テスト（MMT）スコアの改善で、その他、筋力改善率、日常生活動作（ADL）スコアおよび血中クレアチンキナーゼ（CK）、副作用発現を観察した。

### C. 研究結果

症例1は64歳でステロイド抵抗性であったDMの女性で、IVIg療法前のMMTスコアは48点、血清CK4562(<100)IU/Lで立ち上がり困難であったが、IVIg療法後速やかにCKは正常化し、経過中に腰椎圧迫骨折を認めたものの、IVIg施行3ヵ月後にはMMT

スコアが76点に上昇、ADLスコアも18点から32点と改善を認めた(図1)。症例2は、筋力低下が著明であったDMの59歳男性で、ステロイド抵抗性であったためIVIgを施行。3ヵ月後にはMMTスコアは50点から74点まで改善、またCKは800台であったが正常化した。ADLスコアも7点から35点まで改善を認めた(図2)。両者ともステロイド薬の減量が可能となった。また、明らかな副作用は認められなかった。

#### D. 考案

ステロイド抵抗性DMの2症例に対してIVIg療法を施行したところ、いずれの症例においても有効で副作用を認めなかった。本症例を含めたPM8例、DM8例の検討では平均改善率はMMTスコア93.9%、ADLスコア80.0%、CK値100%となっている。また重篤な有害事象はなく、有用な治療法であると考えられる。本剤は現在保険適用を申請中であるが、高価であり、血清蛋白製剤であるため、今後の課題として、使用基準の検討、不応例や再燃例への対策、寛解維持のための投与期間・投与回数の検討、さらに作用機序の解明があげられる。

#### E. 結論

IVIg療法はステロイド抵抗性のPM/DMに対して有効な治療法であり、今後は使用適応基準の検討が必要と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1)Maeda N, Yamaji K, Kimura K, Kim Y, Tsuda H, Hirose S, Hashimoto H. Analysis of clinical questionnaire of Tokyo Metropolitan Government for Sjogren's syndrome Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 28:398-406, 2005.

2)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. Angiology 56:601-9, 2005.

3)Hashimoto H. Microscopic polyangiitis. Nippon Rinsho 63 Suppl 5:330-6, 2005.

4)Kumagai S, Kawano S, Atsumi T, Inokuma S, Okada Y, Kanai Y, Kaburaki J, Kameda H, Suwa A, Hagiwara H, Hirohata S, Makino H, Hashimoto H. Vertebral fracture and bone mineral density in women receiving high dose glucocorticoids for treatment of autoimmune diseases. Rheumatol 32:1414, 2005.

5)Ogasawara M, Imanishi T, Moriwaki K, Gaudieri S, Tsuda H, Hashimoto H, Shiroishi T, Gojobori T, Koide T. Length variation of CAG/CAA triplet repeats in 50 genes among 16 inbred mouse strains. Gene 349:107-19, 2005.

6)Matsumoto T, Morizane T, Aoki Y, Yamasaki S, Nakajima M, Enomoto N, Kobayashi S, Hashimoto H. Autoimmune hepatitis in primary Sjogren's syndrome: pathological study of the livers and labial salivary glands in 17 patients with primary Sjogren's syndrome. Pathol Int 55:70-6, 2005.

##### 2. 学会発表

1)天野浩文, 天野恵理, 仲野総一郎, 森本真司, 戸叶嘉明, 高崎芳成, 橋本博史. 全身性

エリテマトーデスにおける末梢血の単球サブセットの解析。日本臨床免疫学会 2005. 11月。横浜。

2)片桐彰, 今井環, 仲野総一郎, 渡邊崇, 名切裕, 天野浩文, 森本真司, 戸叶嘉明, 高崎芳成, 橋本博史。間質性肺炎を合併した膠原病患者の予後の検討。日本リウマチ学会総会・学術集会。2005, 4月。横浜。

3)瀬田範行, 小林茂人, 橋本博史, 桑名正隆。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。日本リウマチ学会総会・学術集会。2005, 4月。横浜。

4)吉留嘉人, 縄田益之, 梁広石, 田村直人, 深沢徹, 小林茂人, 津田裕士, 高崎芳成, 橋本博史。肥厚性硬膜炎を伴った血管炎症候群の5例。日本リウマチ学会総会・学術集会。2005, 4月。横浜。

5)森本真司, 仲野総一郎, 今井環, 満尾晶子, 金子礼志, 戸叶嘉明, 関川巖, 津田裕士, 高崎芳成, 橋本博史。ループス腎炎 WHO IV型における Th1 細胞の動態。日本リウマチ学会総会・学術集会。2005, 4月。横浜。

6)田嶋美智子, 田村直人, 池田真, 多田久里須, 小林茂人, 橋本博史。MAP kinase 阻害剤のラット破骨細胞分化誘導におよぼす影響についての検討。日本リウマチ学会総会・学術集会。2005, 4月。横浜。

7)名切裕, 今井環, 仲野総一郎, 片桐彰, 渡邊崇, 玉山容碩, 天野浩文, 野沢和久, 満尾晶子, 森本真司, 戸叶嘉明, 小林茂人, 橋本博史。悪性関節リウマチまたは ANCA 陽

性関節リウマチにおける腎障害の検討。日本リウマチ学会総会・学術集会。2005, 4月。横浜。

8)池田真, 田嶋美智子, 田村直人, 多田久里守, 小林茂人, 橋本博史。顕微鏡的多発血管炎(MPA)患者の治療前後の好中球, リンパ球の遺伝子発現状態の検討。日本リウマチ学会総会・学術集会。2005, 4月。横浜。

9)山田秀裕, 小池隆夫, 橋本博史, 宮坂信之, 針谷正祥, 池田康夫, 原まさ子, 斉藤栄造, 吉田正, 市川陽一。ステロイド治療抵抗性の多発性筋炎/皮膚筋炎に対するガンマグロブリン大量療法の有用性に関する研究(GB-0998 第 III 相臨床試験)。日本リウマチ学会総会・学術集会。2005, 4月。横浜。

## 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

## 劇症型心筋炎に対する IVIg 治療と Ig 融合蛋白治療の検討

分担研究者 相澤義房 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：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。

### A. 研究目的

劇症型心筋炎は、健康人が突然発症し心原性ショックを呈し、集中治療を行っても約半数が死亡する難治性の疾患である。そのため、より積極的に炎症を沈静化する治療法の確立が望まれる。現在、IVIg 療法は、炎症を沈静化し副作用が少ないとされる唯一の臨床的に使われている治療であるが、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 部分をコードする遺伝子断片にフレームを合わせて作成した人工免疫グロブリン (Ig) 融合蛋白

は、近年、様々な炎症性疾患の治療に試みられるようになっている。しかし、その劇症型心筋炎に対する効果は不明である。

今回我々は、新潟県において発症した劇症型心筋炎の症例を検討し、IVIg の効果を検討すると共に、我々が開発した劇症型心筋炎モデルであるラット自己免疫性心筋炎モデル(EAM)を用いて、いくつかの人工免疫グロブリン (Ig) 融合蛋白の治療効果を検討した。

## B. 研究方法

### a. 劇症型心筋炎における IVIg 療法の臨床的検討

新潟県において発症した劇症型心筋炎症例 24 例について、IVIg 治療群と非治療群において、その予後を検討した。またその中で効果のみられたと考えられた 1 例についてその経過を検討した。

### b. EAM における Ig 融合蛋白の治療効果の検討

#### 1) EAM の作成

8 週齢の Lewis ラットにブタ心筋ミオシンを完全フロイントアジュバントと混和した後、第 0 日目に足底に注射し、ラット自己免疫性心筋炎を作成した。

#### 2) プラスミドの作成

以前の検討から、目的蛋白と Ig との融合蛋白は高い血中濃度を保てることから、以下のように Ig との融合蛋白を発現するプラスミドを作成した。まず PCR にて *SwaI* と *NotI* の制限酵素部位を含む pCAGGS-Ig-glucagon (Glu)-標識のプラスミドを以下のように作成した。つまり、はじめにラットの脾細胞から得た cDNA から *SwaI* と *NotI* の制限酵素部位を含む 5'-gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGCcgtgccagaaactgtg-3' と 5'-tcaaccactgcacaaaatcttgggctttaccggagagtgggagagact-3' にて KOD Plus DNA polymerase (TOYOBO, 大阪)を用いて PCR を行った後、その希釈したものを鋳型として、同様に

5'-gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGCcgtgccagaaactgtg-3' と

5'-gagagagaGAATTCcaggtattcatcaaccactgcacaaaatcttgggc-3' にて PCR を行い、その PCR 産物を pCAGGS の *EcoRI* に挿入した。次にコントロールプラスミドである pCAGGS-signal peptide (SP)-Ig-Glu は分泌型白血球セリンプロテアーゼの signal peptide を EAM の心臓の cDNA から *SwaI* の制限酵素部位を含む

5'-gaGAATTCATTTAAATgaagtccagcggcctctccc-3' と *NotI* の制限酵素部位を含む 5'-gcagcatcGCGGCCGCtccctccacactccagggtgcag-3' で同様に PCR を行い、その産物を pCAGGS-Ig-Glu のプラスミドに挿入し、同様にプラスミドを精製した。治療に用いた pCAGGS-目的蛋白-Ig-Glu は、それが発現している細胞から cDNA を合成し、*SwaI* の制限酵素部位を含む目的蛋白の sense primer と *NotI* の制限酵素部位を含む antisense primer で同様に PCR を行い、その産物を pCAGGS-Ig-Glu のプラスミドに挿入し、同様にプラスミドを精製した。

5'-gaGAATTCATTTAAATgaagtccagcggcctctccc-3' と *NotI* の制限酵素部位を含む 5'-gcagcatcGCGGCCGCtccctccacactccagggtgcag-3' で同様に PCR を行い、その産物を pCAGGS-Ig-Glu のプラスミドに挿入し、同様にプラスミドを精製した。治療に用いた pCAGGS-目的蛋白-Ig-Glu は、それが発現している細胞から cDNA を合成し、*SwaI* の制限酵素部位を含む目的蛋白の sense primer と *NotI* の制限酵素部位を含む antisense primer で同様に PCR を行い、その産物を pCAGGS-Ig-Glu のプラスミドに挿入し、同様にプラスミドを精製した。

5'-gcagcatcGCGGCCGCtccctccacactccagggtgcag-3' で同様に PCR を行い、その産物を pCAGGS-Ig-Glu のプラスミドに挿入し、同様にプラスミドを精製した。治療に用いた pCAGGS-目的蛋白-Ig-Glu は、それが発現している細胞から cDNA を合成し、*SwaI* の制限酵素部位を含む目的蛋白の sense primer と *NotI* の制限酵素部位を含む antisense primer で同様に PCR を行い、その産物を pCAGGS-Ig-Glu のプラスミドに挿入し、同様にプラスミドを精製した。

#### 3) プラスミド DNA 遺伝子導入

第 1 日目に、ハイドロダイナミック法にてプラスミド DNA 遺伝子導入を行った。つまり、800  $\mu$ g の pCAGGS-目的蛋白-Ig-Glu (目的蛋白-Ig 群)あるいは 800  $\mu$ g の pCAGGS-SP-Ig-Glu (SP-Ig 群)をそれぞれ 80 ml/kg あたりのリンゲル液で希釈し、尾静脈から約 15 秒で急速静注し、遺伝子導入した (図 1)。

#### 4) 心臓の組織病変の評価

第 17 日目の心臓を取り出し、心重量と体重を測定し、心体重比 (g/g) を計算した。心臓のパラフィン包埋組織から心室中部で横断切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジンとアザン・マロリー染色をした。心筋炎面積率はアザン・マロリー染色した組織からカラーイメージ分析装置 (Mac SCOPE ver. 2.6, MITANI Corporation) で解析した。

#### 5) 標的細胞の検討

効果のみられたいくつかの Ig 融合蛋白に関しては、その標的細胞を調べるため、ランゲンドルフ還流装置を用いてコラゲナーゼ処理を 20 分間行った後、心筋炎の構成細胞を分離精製し、それらの分画の受容体を定量的 RT-PCR にて測定した。

#### 6) 培養細胞による Ig 融合蛋白の効果

EAM における Ig 融合蛋白に対する作用を検討するため、第 18 日目の EAM の心臓あるいはリンパ節から、非心筋細胞あるいはリンパ球を培養し、Ig 融合蛋白の添加によるいくつかの免疫関連遺伝子の発現の変化を定量的 RT-PCR により検討した。

### C. 研究結果

#### a. IVIg 療法の臨床的検討

劇症型心筋炎症例 24 例について、IVIg 治療群は 8 症例で IVIg 非治療群は 16 例であった。治療群の 8 症例のうち 4 症例が軽快、4 症例が死亡し、非治療群において、6

症例が軽快、10 症例が死亡した (図 2)。その中で効果のみられたと考えられた 1 例を図 3 に示す。入院第一病期病日の心エコー検査では EF が 2% で著明なびまん性の左室壁運動低下がみられ、第 1-3 日まで IVIg 治療 (1 日 5g 3 日間) を行った。補助循環をしながら集中治療室にて経過を見ていたが、次第に壁運動が回復し、第 9 病日には EF が 69% まで回復し、第 29 病日軽快退院した。これらの結果は、自然経過の可能性も否定出来ず評価は難しいが、IVIg が効果的である可能性が考えられた。

#### b. EAM における Ig 融合蛋白の治療効果の検討

いくつかの人工免疫グロブリン (Ig) 融合蛋白の治療効果を、第 17 病日に屠殺したラットの心体重比および病理学的に心筋炎の面積率で評価したところ、いくつかの融合蛋白において効果が認められた (表 1)。特に、CTLA-4-Ig および IL-13-Ig は著明に効果がみられ、場合によってはほとんど発症していないラットも存在した (図 4)。EAM 心臓中の IL-13 関連遺伝子発現細胞および心臓から培養した細胞に対する IL-13-Ig 融合蛋白の効果を図 5、6 に示す。IL-13 受容体を持つ細胞は、EAM 心臓中の CD11b 陽性細胞および線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞を含むと考えられる非心筋非炎症性細胞と考えられた。それらの細胞集団からなる EAM 心臓から培養された細胞に対して、IL-13-Ig 融合蛋白の効果を検討したところ、いくつかの免疫関連遺伝子発

現において、著明な変化がみられた。

#### D. 考察

劇症型心筋炎における IVIg 治療は、自然経過による回復との区別は困難であるものの、大きな副作用はなく、非治療群に比し軽快する傾向がみられ、効果が期待出来る可能性があった。また劇症型心筋炎のモデルである EAM において、いくつかの Ig 融合蛋白は明らかに効果が認められ、これらは EAM 心臓からえられた培養細胞においても、免疫関連遺伝子発現変化に著明な影響を及ぼすことが認められた。

#### E. 結論

集中治療にもかかわらず、予後の悪い劇症型心筋炎においては、副作用が少なく、炎症を直接沈静化させる治療法が望まれ、IVIg 治療あるいは Ig 融合蛋白治療は有用な治療法になる可能性が考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表 (17 年度の本研究に関するのみ)

##### 1. 論文発表

1. Yoshida T, Hanawa H, Toba K, Watanabe H, Watanabe R, Yoshida K, Abe S, Kato K, Kodama M, Aizawa Y. Expression of immunological molecules by cardiomyocytes and inflammatory and interstitial cells in rat autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res.* 2005;68:278-88. 2005 Jul 12.

2. Elnaggar R, Hanawa H, Liu H, Yoshida T, Hayashi M, Watanabe R, Abe S, Toba K, Yoshida K, Chang H, Minagawa S, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Aizawa Y. The effect of hydrodynamics-based delivery of an IL-13-Ig fusion gene for experimental autoimmune myocarditis in rats and its possible mechanism. *Eur J Immunol.* 2005;35:1995-2005.
3. Liu H, Hanawa H, Yoshida T, Elnaggar R, Hayashi M, Watanabe R, Toba K, Yoshida K, Chang H, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Nakazawa M, Aizawa Y. Effect of hydrodynamics-based gene delivery of plasmid DNA encoding interleukin-1 receptor antagonist-Ig for treatment of rat autoimmune myocarditis: possible mechanism for lymphocytes and noncardiac cells. *Circulation.* 2005;111:1593-600. 2005 Mar 28.
4. Shirai K, Watanabe K, Ma M, Wahed MI, Inoue M, Saito Y, Suresh PS, Kashimura T, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y. Effects of angiotensin-II receptor blocker candesartan cilexetil in rats with dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 2005;269:137-42.
5. Tachikawa H, Kodama M, Watanabe K, Takahashi T, Ma M, Kashimura T, Ito M, Hirono S, Okura Y, Kato K, Hanawa H, Aizawa Y. Amiodarone improves cardiac sympathetic nerve function to hold norepinephrine in the heart, prevents left ventricular remodeling, and improves cardiac function in rat dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2005;111:894-9. 2005 Feb 14.
6. Fuse K, Kodama M, Okura Y, Ito M, Kato K, Hanawa H, Aizawa Y. Short-term prognostic value of initial serum levels of interleukin-10 in patients with acute myocarditis. *Eur J Heart Fail.* 2005;7:109-12.

7. Abe S, Hanawa H, Hayashi M, Yoshida T, Komura S, Watanabe R, Liu H, Chang H, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Nakazawa M, Miyazaki J, Aizawa Y. Prevention of experimental autoimmune myocarditis by hydrodynamics-based naked plasmid DNA encoding CTLA4-Ig gene delivery. *J Card Fail.* 2005;11:557-564.

月 20-22 日 (下関)

## Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

研究協力者; 小玉 誠 新潟大学大学院医歯学総合研究科 助教授

埴 晴雄 新潟大学大学院医歯学総合研究科 講師

## 2. 学会発表

1. Hydrodynamics-Based Delivery of an Interleukin-1 receptor antagonist-Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats  
第 69 回日本循環器学会 平成 17 年 3 月 19-21 日 (横浜)
2. The effect of IL-22-Ig fusion protein for rat experimental autoimmune myocarditis  
第 9 回日本心不全学会 平成 17 年 10

図 1. Ig 融合蛋白プラスミド DNA のハイドロダイナミクス法による遺伝子導入。主に肝細胞に遺伝子導入後合成され、血中に分泌される。

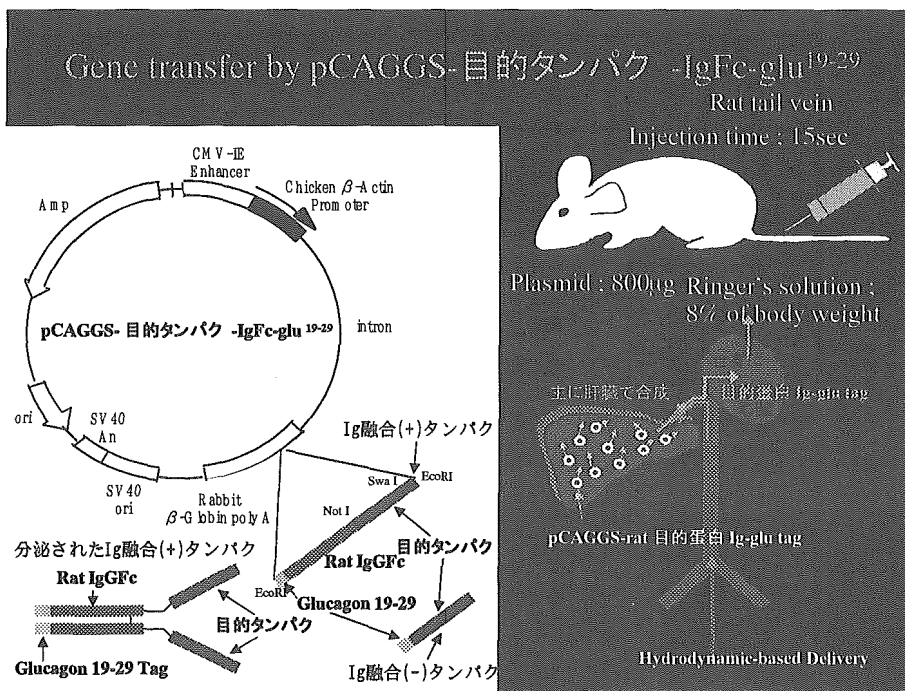




図2. 劇症型心筋炎の予後

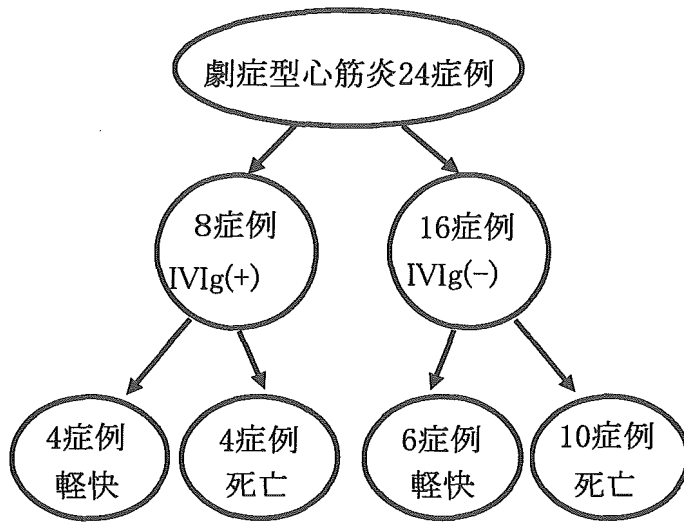


図3. 症例1の臨床経過

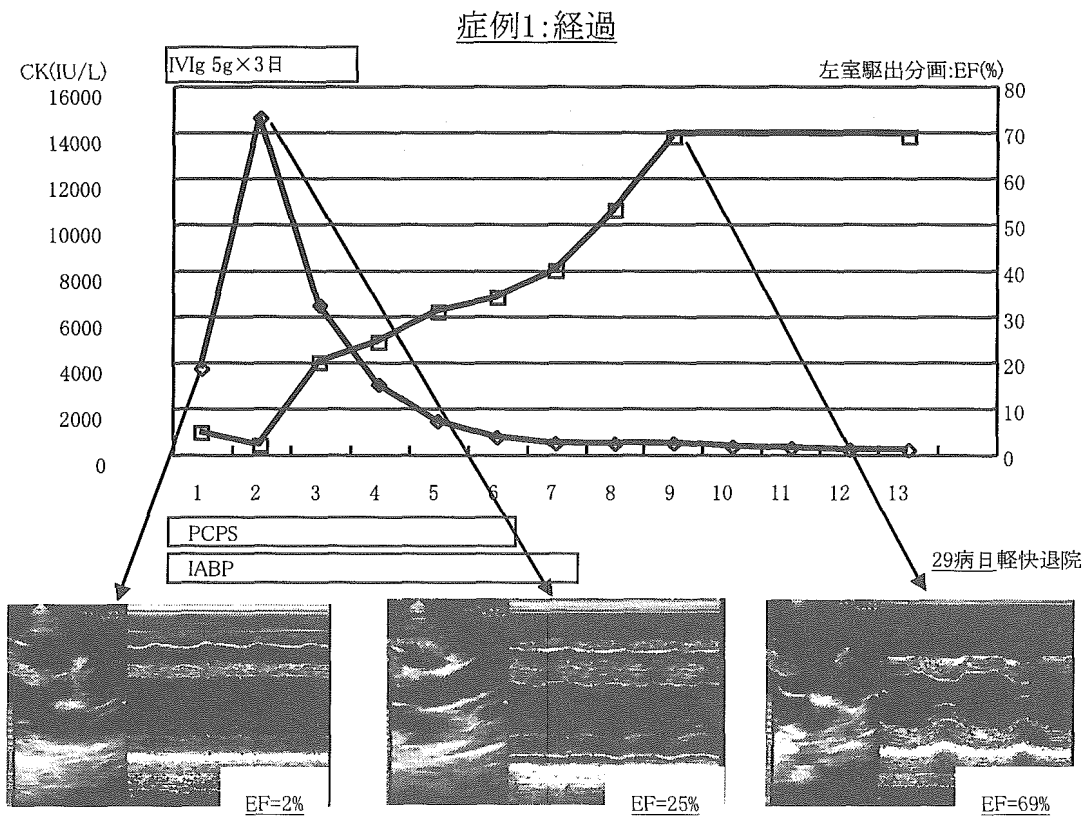
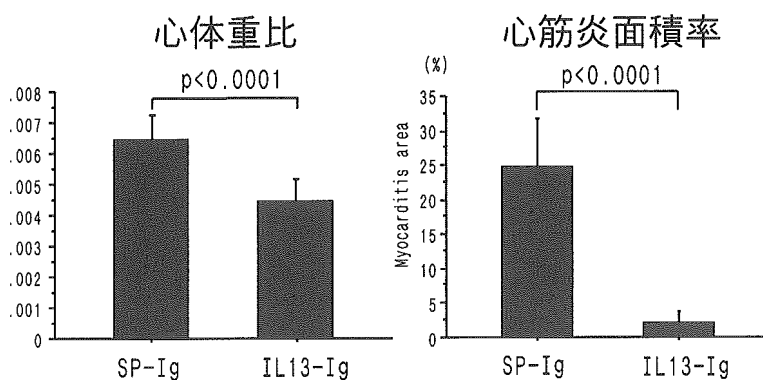


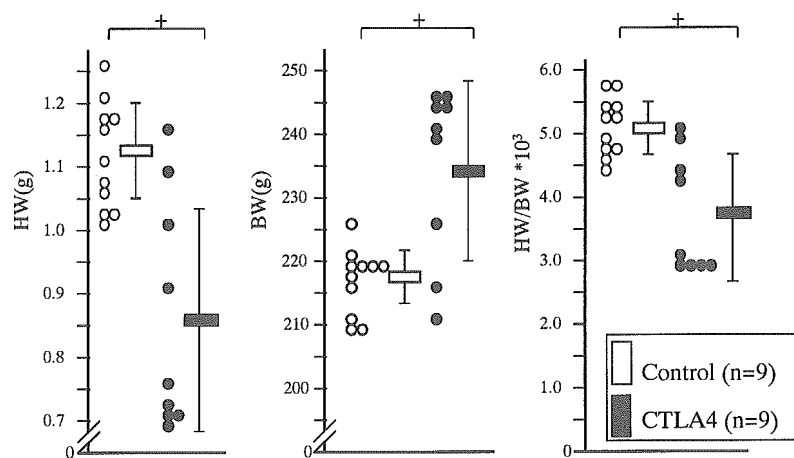
表 1. 我々が検討したラット自己免疫性心筋炎における免疫グロブリン融合蛋白治療

gene	method	effect
secretory leukocyte protease inhibitor-Ig	hydrodynamics	+
CTLA-4-Ig	hydrodynamics	+++ <i>J Card Fail. 2005 11:557</i>
IFN $\gamma$ receptor-Ig	hydrodynamics	$\pm?$
soluble TNF- $\alpha$ receptor-Ig	hydrodynamics	-
IL-13-Ig	hydrodynamics	+++ <i>Eur J Immunol. 2005 35:1995</i>
IL-1receptor antagonist-Ig	hydrodynamics	++ <i>Circulation. 2005 111:1593</i>
IL-4-Ig	hydrodynamics	-
IL-18BP-Ig	hydrodynamics	-
IL-23 receptor-Ig	hydrodynamics	-
IL-22-Ig	hydrodynamics	++

図 4. (a) EAM に対する IL-13-Ig 融合蛋白治療の効果



(b) EAM に対する CTLA4-Ig 融合蛋白治療の効果



+;  $p < 0.01$

図 5. EAM 心臓中の IL-13 関連遺伝子発現細胞

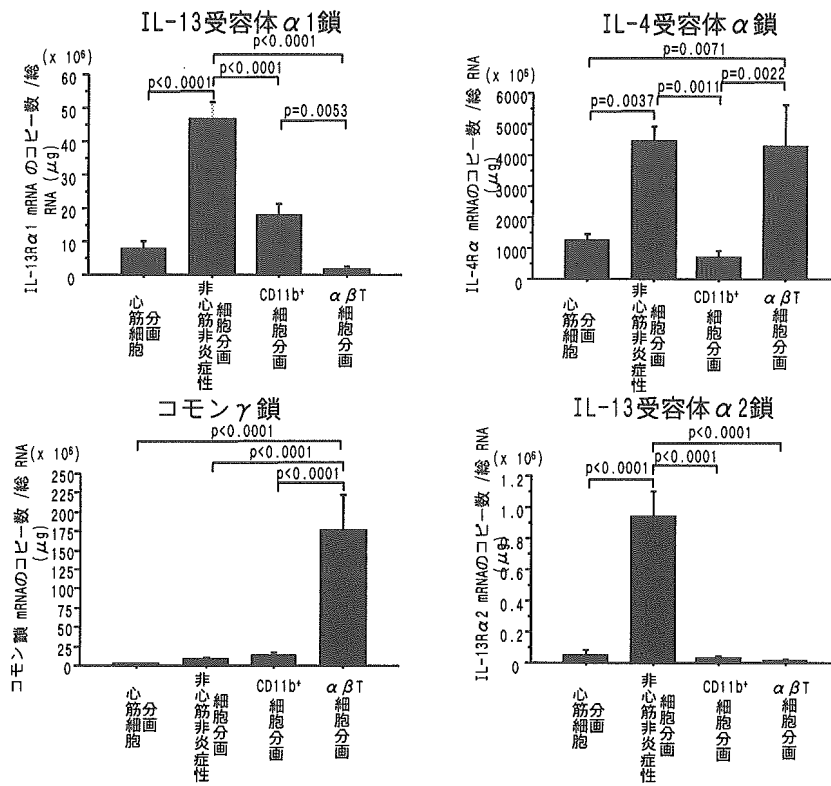
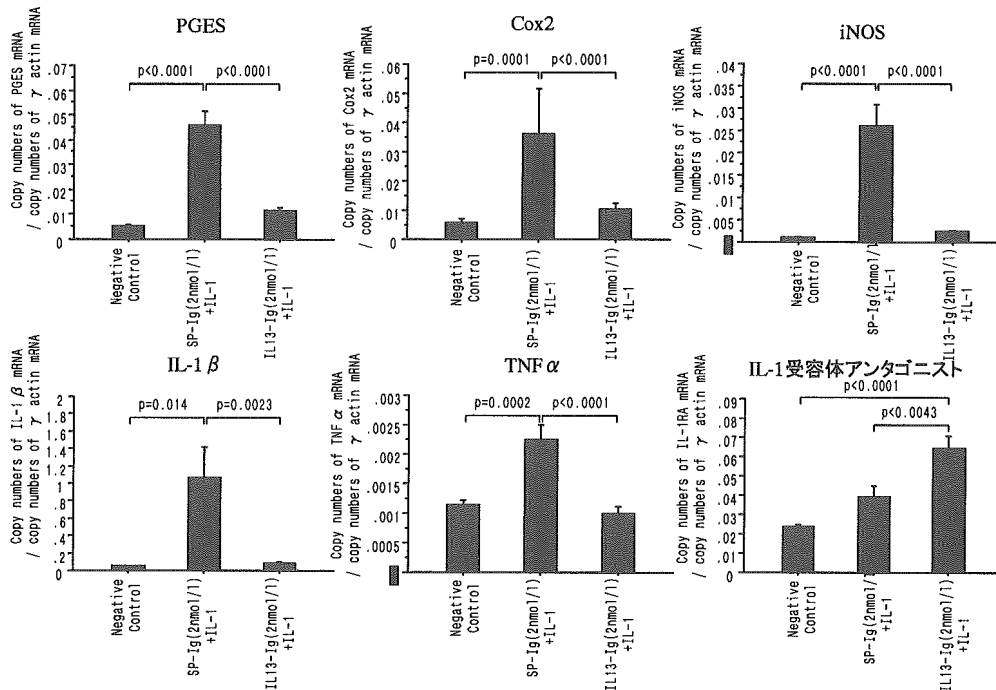


図 6. IL-13-Ig 融合蛋白の EAM 心臓中の非心筋細胞に対する免疫関連遺伝子に対する効果



「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—

分担研究者：佐地 勉（東邦大学医療センター大森病院小児科 教授）

協力者：高月晋一、岡松千都子、嶋田博文、中山智孝、松裏裕行

研究要旨：近年、OS の原因物質として reactive oxygen species (ROS)が報告されている。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 を測定し得たので IVIG の効果について報告する。方法：血清 ROS 測定：再現性・安定性に優れている Total ROS assay system。【対象・方法】aKD10 名、年齢:3m-3y、男 6 女 4、対象 19 名、男 8 女 11。使用 IVIG 1g/kg・日：2 例、2g/kg・日：8 例。【結果】aKD—IVIG 前値  $284 \pm 57(\text{unit})$ ：健常対照： $190 \pm 53$  で有意に ROS 値は上昇していた。IVIG 投与前と投与 3 日後 ( $240 \pm 49$ )、投与 7 日後 ( $226 \pm 66$ ) 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。

#### A. 研究目的

我々は冠動脈瘤を特徴とする血管炎症候群である、急性期川崎病症例において酸化ストレス (OS) の代謝産物である尿中 8-イプアノスタが上昇していること、さらに免疫グロブリン (IVIG) 投与により正常化する事を報告してきた。これによって急性期川崎病と酸化ストレスとの関連が明らかとなった。

近年、OS の原因物質として reactive oxygen species (ROS)の存在が報告されている。ROS には、super anion radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical が含まれ、がん・冠動脈再灌流傷害、糖尿病、低酸素血症等の臨床病態で上昇するとされている。これまでの結果を踏まえ

酸化ストレスと急性期川崎病の関連性を血清 ROS 値から評価することを目的とした。

#### B. 研究方法

対象は 2005 年 6 月から 11 月までに当院に入院した急性期川崎病症例 10 例で、年齢は 3 ヶ月から 3 歳 (男女比 6:4) を対象とした。IVIG 投与前、投与 3 日後、7 日後の血清 ROS 値を (Total ROS assay system) を用いて測定した。対照は健常小児 19 例、年齢は 3m-3y (男女比 8:11) としました。

入院時の aKD 病日は中央値第 6 病日 (3~9 日)、原田スコアは 4 点 (1~5) で

した。IVIg 1g/kg 使用例 ; 2 例、2g/kg ; 8 例。CRP4.5mg · kg ( 1.4 ~ 24.3 )、WBC:18300 (9800~24800),Plt:47.8 万 ( 26.7 ~ 55.7 )、hANP:68pg /ml (29~130),BNP:36.7(2.9~109)、冠動脈病変を来した症例は無かった。

### C. 研究結果

aKD の入院時治療前 ROS は有意に対照群の ROS 値に比し上昇が認められた。また対照の ROS 値は  $190 \pm 53$  unit であり、健常成人の値よりも高い傾向を示した。次に、IVIg 投与前と投与 3 日後、および投与前と投与 7 日後に分けて比較したが、両群ともに ROS 値の有意な低下を認めた。しかし、川崎病では IVIg 投与 7 日後においても、対照群の平均よりも高い値を示していた。

### D. 考案

aKD では、マクロファージ、好中球、が Super 抗原などにより強力に Upregulate されている。また血中で著しく増加したサイトカインにより血管内皮細胞により活性酸素が多量に産生されていると思われる。また IVIg は抗サイトカイン作用、単核球、マクロファージの Fc Receptor block 作用、抗 idiotype 抗体、抗自己抗体を含む中和作用により、活性化した免疫応答が抑制され内皮細胞の活性化が沈静化されるものと考えられる。aKD の合併症である冠動脈障害を来す重症例でどのような動態を示し、また臨床的、生化学的な parameter とどのような関連、相互作用を示すのかの検討が今後の課題である。また尿中の 8-Isoprostan も現

在測定できる指標では最も臨床データと相関が高いとされている。ROS との関連性も今後の課題と思われた。

### まとめ

対照群に比較し有意な ROS 値の上昇が認められた。

IVIg 治療により、ROS 値は有意に低下した。

治療 7 日後においても対照群よりも高い値を示した。

### E. 結語

IVIg は小児期血管炎である急性川崎病において血清 ROS 値の上昇を有意に低下させ、抗酸化ストレス作用を持つことが示唆された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Saji T, Nakazawa M, et al: Safety and efficacy of palivizumab prophylaxis in children with congenital heart disease. *Pediatric International*. 47: 397-403, 2005.
2. Katano H, Saji T, et al: Lack of human herpesvirus 8 infection in lungs of Japanese patients with primary pulmonary hypertension. *J Infect Dis*. 191: 743-745, 2005.
3. 佐地勉, 監物靖, 高月晋一, 嶋田博光, 中山智孝, 松裏裕行, 高橋啓:川崎病の血管

病変.リウマチ科.34 (1) .64-73, 2005.

## 2. 学会発表

1. 監物靖, 藤井悠一郎, 直井和之, 嶋田博光, 高月晋一, 直井和之, 佐地勉: Infliximabにより解熱した IVIG2g/kg・ステロイドパルス療法無効の川崎病. 第25回日本小児科学会, 東京, 2005.10.
2. 竹内大二, 藤原摩耶, 高月晋一, 直井和之, 佐地勉: 免疫グロブリン不応急性期川崎病における酸化ストレスの変動. 第41回日本小児循環器学会, 東京, 2005.7.
3. 佐地勉: 重症冠動脈後遺症の医療と今後なぜ冠動脈瘤ができたのか 急性期薬物療法の限界は?. 第24回日本川崎病研究会, 京都, 2004.11.
4. 直井和之, 監物靖, 高月晋一, 星田宏, 中山智孝, 松裏裕行, 佐地勉: 川崎病に対するメチルプレドニゾロンパルス療法の治療効果. 第40回日本小児循環器学会, 京都, 2004.10.
5. 高月晋一, 中島香織, 嶋田博光, 星田宏, 中山智孝, 松裏裕行, 佐地勉: 川崎病患者における Oxidative Stress marker の急性期以後の推移. 第40回日本小児循環器学会, 京都, 2004.10.
6. 藤原摩耶, 竹内大二, 佐地勉: 発熱以外に主要症状を認めない時点で冠動脈病変を認めた生後51日の川崎病の1例. 第40回日本小児循環器学会, 京都, 2004.10.
7. 監物靖, 中島香織, 池原聡, 高月晋一, 中山智孝, 松裏裕行, 佐地勉: ガンマグロブリン療法後に無菌性髄膜炎を発症した川崎病4例. 第41回日本小児循環器学会, 東京, 2005.7.
8. 尾内善弘, 羽田明, 濱本邦洋, 岸文雄, 三

浦大, 佐地勉, 寺井勝, 中村好一, 柳川洋, 川崎富作, 中村祐輔: CD40L 遺伝子多型と川崎病冠動脈病変発生リスクとの相関. 第24回日本川崎病研究会, 京都, 2004.11.

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

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

分担研究者 大野尚仁 東京薬科大学 薬学部 教授

研究要旨：我々は、*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。

### A. 研究目的

病原性真菌 *Candida albicans* 菌体外多糖画分（CAWS）は、投与後 1 時間以内に起こる急性の致死活性と、投与後約 1 ヶ月で徐々に進行する血管炎誘発活性を有している。本研究では、急性の致死活性発現に関わる因子を解析するため、生理活性物質の拮抗薬を用いて検討した。

### B. 研究方法

1. *C. albicans* IFO 1385 株を 4 L の C-limiting medium を用いて 27 °C で通気攪拌培養し、その培養上清より CAWS を作成した。

2. 作成した CAWS の致死活性をマウスに静脈内投与し、投与後 1 時間以内に死亡するマウスを観察した。Epinephrine の投与は CAWS 投与 5 分後に、H1 レセプター拮抗薬（pyrilamine）、H2 レセプター拮抗薬（cimetidine）、PAF レセプター拮抗薬（CV6209）、5-HT<sub>1c/2a</sub> レ

セプター拮抗薬（katanserin）の投与は CAWS 投与の 20～30 分前に行った。血管透過性亢進作用は、CAWS 20 μg と Evans blue を混合したものを静脈内投与し、投与 30 分後に屠殺し、腹腔内に滲出してきた Evans blue を生理食塩水で回収し、吸光度を測定することで観察した。

### C. 研究結果

1. *C. albicans* IFO 1385 株以外の *C. albicans* や *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae* 由来の可溶性画分もマウスに静脈内投与することによって致死を誘導できたが、*C. albicans* IFO 1385 株由来の可溶性画分（CAWS）は高い急性致死活性を示した（Table 1）。この急性致死活性にはマウスの系統差が存在し、C3H/He, C3H/HeJ, C3H/HeN, KSN nu/nu, WBB6F1-W/Wv は CAWS の致死活性に対して感受性が高く、一方、AKR/N, BALB/c, CBA/N, C57BL/6, DBA/2,

BDF1, CDF1 は抵抗性であった (Table 2).

2. CAWS の急性致死活性と血管透過性亢進作用は、アナフィラキシーショックの治療薬である epinephrine の投与により抑制された (Table 3, Fig. 1). CAWS による急性致死活性はアナフィラキシーショック様であると考えられた.

3. CAWS の急性致死活性は静脈内投与でおこり、腹腔内投与では観察されない. そこで、CAWS をあらかじめ腹腔内投与したマウスに、CAWS を静脈内投与し、致死活性を検討した. その結果、CAWS を前投与すると致死活性が抑制されることが明らかとなった (Table 4).

1mg/mouse を前投与したマウスでは、投与後、2 週間後においても致死活性の抑制効果が観察された.

4. CAWS の急性致死活性は、前述のように 2 度目の投与においては不応期が存在することが明らかとなった. 生理活性物質の一つである Platelet Activating Factor (PAF) もまた、その致死活性には同様の不応期が存在することが明らかとなっている. そこで PAF の CAWS の致死活性を PAF の致死活性と比較した. その結果、PAF(C16)においては強い致死活性が観察され、1 $\mu$ g の投与で全例が死亡した (Table 5). PAF アンタゴニストは PAF による致死を完全に抑制することが出来たが、CAWS による急性致死活性は一部しか抑制できなかった (Table 6). さらに、CAWS で前処置すると PAF による致死活性を抑制することが出来たが、PAF 前処置では、CAWS による急性致死活性を一部しか抑制することが出来なかった (Table 7).

5. H1 レセプター拮抗薬、H2 レセプター拮抗薬、PAF レセプター拮抗薬、5-HT<sub>1c/2a</sub> レセプター拮抗薬を用いて CAWS の急性致死毒性を抑制できるか検討した. その結果、単剤では抑制効果は低かったが、全ての薬剤の併用投与によって急性致死活性は強く抑制された (Table 8). さらに、同様の薬剤を用いて血管透過性を

検討したところ、ヒスタミン、PAF、セロトニン各々の薬剤も CAWS による血管透過性亢進作用を抑制したが、全ての薬剤の併用投与によってさらに抑制された (Fig. 2).

#### D. 考察

CAWS は菌の増殖に伴い可溶化してくる成分であり、その生物活性は真菌感染症との関連からも重要である. 本研究では CAWS の生物活性の一つである急性致死活性の発現に関わる因子について解明した.

#### E. 結論

CAWS のマウスへの投与によって誘導される急性致死活性はアナフィラキシー様であると考えられたことから、数種の生理活性物質の拮抗薬を用いてその影響を検討した. その結果、ヒスタミン、PAF、セロトニンに対するレセプター拮抗薬を併用することで、CAWS による急性致死活性は抑制できたが、単剤では十分な抑制効果は見られなかった. これらのことから、CAWS の急性致死活性は複数の因子により発現している可能性が考えられた.

#### F. 健康危険情報

特になし.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Rui Tada, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, and Naohito Ohno, *Candida albicans* Derived Fungal PAMPS, CAWS, Water Soluble Mannoprotein- $\beta$ -Glucan Complex Shows Similar Immunotoxicological Activity with Bacterial Endotoxin from *Escherichia coli* O9, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 240-246 (2006)

2) Ken-ichi Ishibashi, Chikaku Dogasaki, Tsunenori Iriki, Masuro Motoi, Yu-ichiro Kurone, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, and Naohito Ohno, Anti- $\beta$ -Glucan Antibody in Bovine Sera, *Int.*



*J. of Medicinal Mushrooms*, 7, 533-545 (2005)

3) Ken-ichi Ishibashi, Masaharu Yoshida, Iwao Nakabayashi, Hiroyasu Shinohara, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, and Naohito Ohno, Role of Anti- $\beta$ -Glucan Antibody in Host Defense against Fungi, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 44, 99-109 (2005)

4) Shunsuke Hida, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, and Naohito Ohno, Effect of *Candida albicans* Cell Wall Glucan as Adjuvant for Induction of Autoimmune Arthritis in Mice, *J. Autoimmun.*, 25, 93-101 (2005)

## 2. 学会発表

(1) 大野 尚仁, 真菌多糖と血管炎, 第 78 回日本細菌学会総会, 東京, 2005

(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, 東京, 2005

(3) 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, 生体防御機能異常ワークショップ 2005, 香川, 2005

(4) N. Ohno, N. N. Miura, H. Shihonara, H. Sankawa, Y. Adachi, A. I. Okawara, and K. Suzuki, Strain dependency of CAWS-induced coronary arteritis in mice, The 12th International Vasculitis-and ANCA Workshop, Heidelberg, Germany, 2005

(5) 大野 尚仁, *Candida* 菌体外多糖 CAWS によって惹起される冠状動脈炎, 第 16 回日本生体防御学会, 東京, 2005

(6) 原田 敏江, 川南 裕美, 三浦 典子, 安達 禎之, 大野 尚仁, 真菌多糖  $\beta$ -glucan の GM-CSF を介したサイトカイン産生誘導, 第 16 回日本生体防御学会, 東京, 2005

(7) 平田 尚人, 太田 伸, 羽田 悟, 石橋 健一, 篠原 弘靖, 三浦 典子, 大野 尚仁, 血管病変解析と治療薬創生のための CAWS 誘発血管炎の応用, 第 15 回日本医療薬学会, 岡山, 2005

(8) 三浦 典子, 安達 禎之, 大野 尚仁, *Candida albicans* 由来可溶性菌体外多糖 CAWS

の致死毒性に関する検討, 第 49 回日本医真菌学会総会, 幕張, 2005

(9) 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, 福岡, 2005

(10) N. N. Miura, M. Komai, Y. Shingo, Y. Adachi, A. I. Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S. Naoe, K. Suzuki, and N. Ohno, Cytokine synthesis of splenic lymphocytes in murine coronary arteritis model induced by CAWS (*Candida albicans* water-soluble fraction) administration, Seoul, Korea, 2005

(11) 大野 尚仁, カンジダ由来糖蛋白質成分 CAWS によって惹起される心疾患モデルマウスの食品機能性評価への応用, 日本食品免疫学会 第 1 回学術大会, 東京, 2005

(12) 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 回日本免疫学会総会 学術集会, 横浜, 2005

(13) 大野 尚仁, 三浦 典子, 石橋 健一, 篠原 弘靖, 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* 培養条件と CAWS の血管炎, 急性致死活性の関連性について, インターナショナルシンポジウム 安全なガンマグロブリン製剤開発 人工ガンマグロブリン, 東京, 2006

(14) 多田 壘, 三浦 典子, 安達 禎之, 大野 尚仁, *Candida albicans* 菌体外多糖画分と lipopolysaccharide (*Escherichia coli* O9) の免疫学的並びに機器分析を用いた解析, 日本薬学会第 126 年会, 仙台, 2006

(15) 駒井 元彦, 三浦 典子, 安達 禎之, 大野 尚仁, CAWS 誘発血管炎の CBA/N、CBA/J マウスを用いた比較, 第 79 回日本細菌学会総会, 金沢, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 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

分担研究者 高橋 啓 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座 助教授

共同研究者 大原関利章、山田仁美 東邦大学医学部

三浦典子、大野尚仁 東京薬科大学薬学部

新井孝夫、村山 研 東京理科大学理工学部

荒谷康昭 横浜市立大学木原生物研究所

野津朋子、松村実美子、太刀川仁、大川原明子、鈴木和男 国立感染症研究所

研究要旨：*Candida albicans* Water Soluble fractions (CAWS)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。

### A. 研究目的

病理組織学的に川崎病との類似点が多い *Candida albicans* 由来の菌体成分(CAWS)によるマウス系統的血管炎誘発モデルについて、合成免疫グロブリン(SyIG)を投与した際の血管炎誘発抑制効果を検討した。

### B. 研究方法

C57BL/6N マウス(4 週齢、雄)に対し、PBS に懸濁した CAWS 4mg を連続 5 日間腹腔内接種した。実験 3 日目から 5 日間、CAWS 接種後に人工ポリクローナルグロブリン(SyIG)を尾静脈から点滴投与した(図 1、表)。



図 1：実験スケジュール

### 表. 投与濃度

1	Saline-Glucose
2	SyIG; Fv
	a. 4 mg/ml
	b. 2 mg/ml
	c. 1 mg/ml
3	SyIG; Fv+Fc
	a. 4 mg/ml
	b. 2 mg/ml
	c. 1 mg/ml

実験 28 日目に炭酸ガス下に安楽死させ、直ちに剖検。冠状動脈分岐部を含む心基部大動脈水平断のステップ標本を作製した。各マウスの心基部を左冠尖、右冠尖、無冠尖、左・右冠状動脈の 5 つの区画に分割し、それぞれの領域における汎血管炎、つまり動脈全層性炎症の有無、組織像を光顕的に検討した。

## C. 研究結果

### 1. 汎血管炎発生頻度の比較

対照群では検索した 24 マウス、計 120 区画の内、53 区画(44%)に汎血管炎が生じていた。これに対し、SyIG, Fv 分画 4mg/ml、2mg/ml 群では、それぞれ 23%、26%と対照群に比して血管炎の発生領域数は有意に減少しており、病変範囲は限局化していた。一方、SyIG-Fv 分画 1mg/ml 群、および SyIG-Fv+Fc 分画の 3 群では汎血管炎発生区域数は減少していなかった(図 2)。

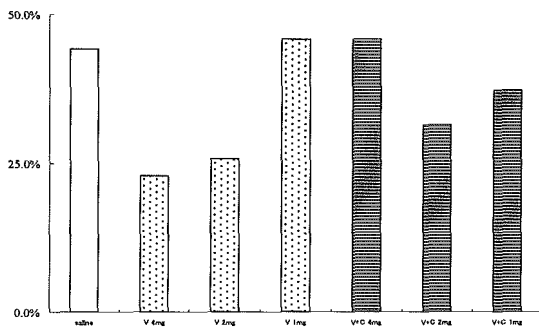


図 2：領域数からみた汎血管炎発生頻度

### 2. 汎血管炎の組織像

大動脈起始部および冠状動脈に汎動脈炎が発生した場合、その組織像はいずれも増殖性肉芽腫性炎症であり、顕微鏡的観察において明らかな組織学的差異は見出せなかった(図 3)。

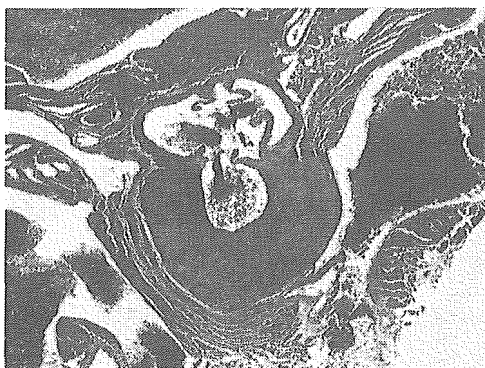
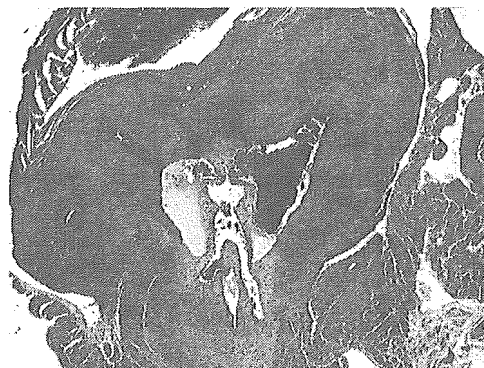


図 3： 大動脈起始部の動脈病変

左：1 区域(無冠尖)のみに汎血管炎あり



右：5 区域すべてに汎血管炎あり

## D. 考察

我々は、川崎病剖検例の病理組織学的検索を続ける一方で、Candida albicans 由来の菌体成分を用いたマウス系統的血管炎誘発モデルの検討を続けている。本モデルは冠状動脈、大動脈起始部や腎動脈などが高頻度に侵襲され、増殖性肉芽腫性炎症を特徴とするなど、川崎病との病理組織学的類似点が多い。

これまでの検討で本実験系にヒトあるいはマウス免疫グロブリンを腹腔内投与すると血管炎発生に抑制傾向がみられること、本実験系の血管炎発生と血清 MPO-ANCA 値とは密接に関連することなどが判明している。今回は、人工ポリクローナル免疫グロブリン (SyIG) を作製し、この CAWS によるマウス血管炎誘発モデルに投与した際の血管炎抑制効果を検討した。

その結果、汎血管炎の発生を完全に抑制することは困難であったが、Fv 分画からなる SyIG を投与することにより汎血管炎の進展が抑制された。本血管炎誘発モデルにおいて SyIG は血管炎発生に抑制的に作用していると推測された。

## E. 結論

免疫グロブリン製剤は川崎病のみならず、他の血管炎症候群の治療としても用いられつつある。安全性、医療経済の向上を図り作製された本人工化免疫グロブリンは血管炎治療に応用できる可能性がある。今後さらに検討を加える。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takahashi K, Oharaseki T, Naoe S, et al. Neutrophilic involvement in the damage to coronary arteries in acute stage of Kawasaki Disease, *Periatr Int*, 47:305-10, 2005
2. 佐地 勉、監物 靖、高月晋一、嶋田博光、中山智孝、松裏裕行、高橋 啓：川崎病の血管病変、*リウマチ科*、34:64-73、2005
3. AH Rowley, SC. Baker, ST Shulman, LM Fox, K. Takahashi. FL Garcia, SE Crawford, P Chou, JM Orenstein: Cytoplasmic inclusion bodies are detected by synthetic antibody in ciliated bronchial epithelium during acute Kawasaki disease. *JID*, 2005: 192, 1757-66
4. Nagi-Miura N, Shingo Y, Adachi Y, Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, Ohno N. : Induction of coronary arteritis with administration of CAWS (Candida albicans water-soluble fraction) depending on mouse strains. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 26 : 527-543, 2004.
5. Yosuke Okada, Atsushi Suzuki, Sachiko Takagi, Hiroaki Hirai, Ryoichi Saitoh, Akiko Adachi, Takeshi Yanagihara, Masaaki Ueki, Toshihiro Fujii, and Takao Arai: Polyglutamylation of Tubulin during Differentiation of Neural Precursor Cells. *Bioimages* 12(2-4): 71-83,2004.
6. Kiyoto Maruyama, Takashi Ohuchi, Kenji Yoshida, Yasushi Shibata, Fumio Sugawara and Takao Arai: Protective Properties of Neochininulin A against SIN-1-Induced

Neuronal Cell Death. *J.Biochem*.136: 81-87,2004.

7. Satoshi Namekawa, Fumika Hamada, Tomoyuki Sawadot, Satoshi Ishii, Takayuki Nata , Takashi Ishizaki, Takashi Ohuchi, Takao Arai and Kengo Sakaguchi: Dissociation of DNA polymerase  $\alpha$  - primase complex during meiosis in *Coprinus cinereus*. *Eur.J.Biochem*270: 2137-2146, 2003.
8. 新井孝夫：イメージングで解き明かす生命機能—第 15 回 モノクローナル抗体を用いたポリグルタミン酸化チューブリンの神経細胞内局在：実験医学 Vol.22 No13(9月号)、2004.

### 2. 学会発表

1. ○高橋 啓、大原関利章、横内 幸、若山 恵、直江史郎：川崎病冠状動脈後遺病変に生じた石灰化について。第 94 回日本病理学会総会、横浜、2005.04
2. ○高橋 啓、大原関利章、横内 幸、若山 恵、直江史郎：遠隔期川崎病冠状動脈病変に生じる石灰化についての病理組織学的検討。第 25 回日本川崎病研究会、東京、2005.10
3. ○大原関利章、高橋 啓、横内 幸、若山 恵、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、直江史郎、鈴木和男：川崎病類似動脈炎モデルにおける免疫グロブリンの治療効果の検討。第 94 回日本病理学会総会、横浜、2005.04
4. ○大原関利章、高橋 啓、直江史郎、山田仁美、横内 幸、三浦典子、大野尚仁、金城義明、金子健二、大川原明子、鈴木和男川崎病類似動脈炎モデルにおけるヒト免疫グロブリン治療効果の検討 (2)-MPO-ANCA 含有ヒト免疫グロブリンによる治療効果-。第 25 回日本川崎病研究会、東京、2005.10

## 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

特記事項なし