

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15年度～平成17年度 総合研究報告書

主任研究者

鈴木 和 男

平成18（2006）年3月

目 次

I. 総合研究報告

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. 難治性血管炎に伴う MPO-ANCA 陽性急速進行性糸球体腎炎に対するIVIg 療法の 臨床的効果のエビデンスと免疫学的効果判定指標の確立に向けて 武曾恵理	13
2. 膠原病における抗体製剤による治療法についての研究 橋本博史	23
3. 心筋炎の治療法に関する研究 相澤義房	29
4. 超大量ガンマグロブリン単回投与が急性期川崎病の酸化ストレスマーカー (尿中 8-isoprostane および ROS : Reactive Oxygen Species) に与える効果 佐地 勉	41
5. CAWS 血管炎モデルを用いた血管炎分子機構の解明と治療薬開発への展開 大野尚人	47
6. マウス血管炎誘発モデルにおけるヒト免疫グロブリンおよび人工免疫グロブリンの 血管炎抑制効果の検討 高橋 啓	55
7. MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究 新井孝夫	61
8. 炎症疾患治療評価を行うためのモデル動物の解析と MPO 抗体作製のデザイン 荒谷康昭	67
9. 量子ドットの多臓器不全診断治療への応用 山本健二	75
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 大川原明子	81
11. MPO-ANCA 産生のメカニズム 鈴木章一	91

III. 公開シンポジウムプログラム	95
--------------------	----

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	101
--------------------	-----

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

武曾 恵理：（財）田附興風会医学研究所北野病院 副所長
橋本 博史：順天堂大学 名誉教授
相澤 義房：新潟大学大学院 教授、副病院長
佐地 勉：東邦大学医学部 教授
大野 尚仁：東京薬科大学薬学部 教授
高橋 啓：東邦大学医学部病院 助教授
新井 孝夫：東京理科大学理工学部 教授
荒谷 康昭：横浜市立大学木原生物学研究所 助教授
山本 健二：国立国際医療センター研究所 副所長
大川原明子：国立感染症研究所 主任研究官
鈴木 章一：長崎大学 熱帯病医学研究所 助手

研究協力者

- 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・院医・病態情報内科、助教授）、湯村和子（東京女子医科大・第四内科、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 合成、治療評価、安全性評価：佐々木次雄（国立感染研・血液安全性部、室長）、古谷昌弘（積水化学・水無瀬研、主任研究員）、宇野賀津子（レイ・パストゥール医研センター、室長）
- 3) アドバイザー：仁保喜之（千早病院、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、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）
- 4) 協力：猪原登志子（田附興風会医学研究所北野病院、京都大学院医）、古宮俊幸（田附興風会医学研究所北野病院）、小林茂人（順天堂大）、小玉誠（新潟大院医）、堀晴雄（新潟大院医）、山縣邦弘（筑波大学附属病院）、赤松明（愛媛県立新居浜病院）、高月晋一（東邦大学医学部）、三浦典子（東京薬大）、大原関利章（東邦大学医）、山田仁美（東邦大学医）、村山研（感染研）、太刀川仁（感染研）、野津朋子（感染研）、松村実美子（感染研）、星野昭芳（国立国際医療センター研）、真鍋義則（国立国際医療センター研）、藤岡宏樹（国立国際医療センター研）、塩原あまね（国立国際医療センター研）、大内 敬（東京理科大）、黒岩憲二（東京理科大学）

研究要旨

ガンマグロブリン製剤は、重症感染症、川崎病や一部の難治性疾患などの治療に使用されている。また、欧米よりわが国に多い難治性疾患に分類される MPO-ANCA 関連血管炎において、当プロジェクト臨床班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。このようにガンマグロブリン製剤の用途拡大が見込まれ、需要が増える傾向にある。しかし、その原材料供給、感染症リスク、医療経済の点からガンマグロブリン人工化が今日的急務となっている。そこで、本研究では、これらを克服するため、ガンマグロブリンの人工化をめざした。この3年間で、血管炎モデルマウスを確立するとともに、マウス型人工グロブリンの合成に成功し、その有効性を認め、安全性の確保についてもあわせて検討した。一方、天然型ヒト免疫グロブリン製剤による IVIg 治療の血管炎への探索試験も開始された。以上から、ヒト型人工グロブリンの製剤化への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、一般からの本研究へ関心が高まっている。

A. 研究目的

ガンマグロブリン製剤は、重症感染症をはじめ、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ことは、高度高齢社会に入ったわが国における特長でもある。特に、難病の治療には、その大量療法 (IVIg) が有効である。また、高齢者にとって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おり、その使用が微増ながら増え続けている (図1)。

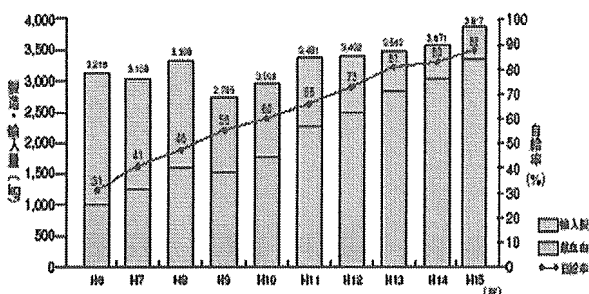


図1. 静注用免疫グロブリン製剤の製造・輸入量の推移。

この数年、微増傾向で、献血由来製剤の製造量は3,355kgで、前年と比べ300kgの増加。(血液製剤調整機構)。

しかし、その適応を拡大したくとも供給源の確保の問題、感染症リスクなどの安全性確保や高額治療のため、その用途が限界状態にきている。医療サイドから、その利用が望まれている治療法との矛盾や問題を解決するに

は、人工化によって供給を増加すること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、川崎病と 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 治療のプロトタイプとしてマウス型を完成させ、次いで、ヒト免疫グロブリン製剤の安全性をカバーする治療法としてヒト型人工ガンマグロブリンを開発することを目的にした。同時並行して、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ことを計画した。

まず、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製剤として完成させる。

一方、臨床での免疫グロブリンの有効性を検討する必要がある、すでに治療法として定着している川崎病と同じプロトコルを血管炎・腎炎に応用することを検討した。われわれの研究グループでは、IVIg 治療による臨床好成績を得ており、また、探索試験も開始した。

基礎班と臨床側とのタイトな共同研究を構築し、人工ガンマグロブリン開発とその応用に向けた安全性の向上について、十分討議することとし、臨床サイドからの基礎班の人工

グロブリン開発のための動物実験治療のバックアップもすることも行った。

B. 研究方法

1. 基礎分科会

人工ガンマグロブリン作製、治療効果判定班および安全性向上評価

(1) 人工ガンマグロブリン作製

MPO で免疫された MPO-KO マウスの脾臓 RNA より γ 、 μ 、および κ 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。

(2) 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

(3) 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

(4) 治療効果判定

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。CAWS 接種後にヒトガンマグロブリン製剤(h-IG)を尾静脈から持続点滴した。h-IG 投与量は川崎病治療に準じ、400mg/Kg x 5 日間連続投与と 2000mg/Kg x 1 回投与を設定した。マウス型人工型 SyIG を CAWS 接種後に尾静脈から持続点滴した。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、血管炎の詳細について観察した。

(5) CAWS 接種による生体反応の解析

CAWS(4mg/mouse)を腹腔内投与し、経時的にマウスの脛骨を摘出して骨髓細胞を調製した。同時に末梢白血球も調整し、両細胞を抗 CD11b-FITC 抗体と抗 Gr-1-PE 抗体で処理しフローサイトメトリーにより解析した。マウス心臓より EDTA 採血し、血球分画解析を行った。マウス心臓よりヘパリン採血し、比重法によって末梢好中球画分を単離し、好中球の機能(MPO 放出活性、活性酸素産生)を解析した。また、血漿中炎症性サイトカイン・

ケモカイン産生を検討した。

(6) その他の方法

詳細は、各分担報告を参照。

2. 臨床分科会

(1) 治療方針

初期治療として乾燥スルホ化ヒト免疫グロブリン 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- α , 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。他施設の症例は、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。

(2) 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。サイトカイン定量：Bioplex 法によるサイトカイン定量も検討した。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) により、IL-1 β , 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, MIP-1 β , TNF- α の 17 種類のサイトカイン類を測定した。QD-MPO 抗体結合：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 で刺激、4% PFA で固定し、抗 1% BSA で blocking を行ったのち、QD 結合マウス MPO 抗体との結合を蛍光顕微鏡で観察した。

2) 免疫グロブリンによる Reactive oxygen species (ROS)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。

3) その他の方法の詳細は、各分担報告を参照。

(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

この3年間事業計画を綿密に討議し、以下の結果が得られた。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

鈴木和男(主任研究者、国立感染症研究所)
分担研究者: 大野尚仁(東京薬科大学)、新井孝夫(東京理科大学)、荒谷康昭(横浜市立大学)、研究協力者: 古谷昌弘(積水化学・水無瀬研)

(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、問題であった可溶化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 γ 、 μ 、および κ 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T4DNAリガーゼによって導入した。反応液よりDNAを精製し、 $3 \times 10^7/\mu\text{g}$ 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6L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2に示す。

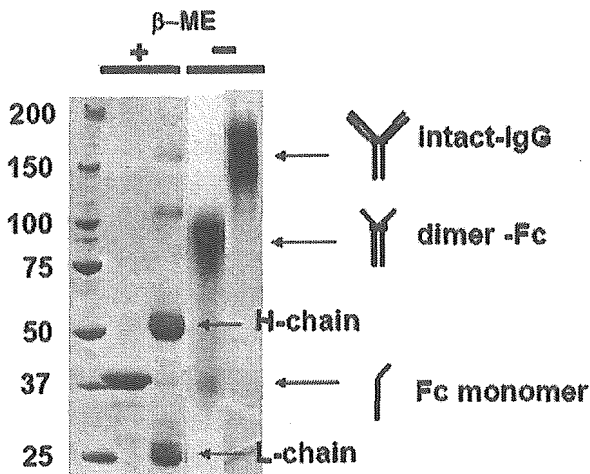


図2. マウス型 IgG の SDS-PAGE

(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

病態エピトープを有するモノクローナル MPO 抗体を作製した。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た。各ペプチドを免疫したマウスの中からそれぞれ 1 匹を選び、ハイブリドーマを作製した。表 1 は、KLH-ペプチドをもちいた ELISA でスクリーニングした結果、陽性と判断されたハイブリドーマを示したものである。ペプチド A (4-11)、ペプチド A (14-37)、ペプチド B (1-47)、ペプチド B (48-69) に対して、それぞれ反応性の高い 3、5、3、4 種のハイブリドーマクローンを選択した。次に、これらの MPO-ANCA を測定した結果が表 2 である。Ha 領域に対する 8 種のクローンのうち高い値を示すものはなかった。それに対し、Hb 領域に対する 7 つのクローンのうち 1 つが極めて高い値を、2 つが中程度の値を、2 つが低い値を示した。

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

鈴木和男 (主任研究者、国立感染症研究所)
 分担研究者：大野尚仁 (東京薬科大学)、高橋啓 (東邦大学)、大川原明子 (国立感染症研究所)、相澤義房 (新潟大学大学院)
 協力：大原関利章 (東邦大学医)、山田仁美

(東邦大学医)、三浦典子 (東京薬大学薬)、村山研 (感染研)、太刀川仁 (感染研)、野津朋子 (感染研)、松村実美子 (感染研)、小玉誠 (新潟大院医)、埴晴雄 (新潟大院医)

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。

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。

(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。

1) 天然型ヒトガンマグロブリン製剤による治療

対照における汎血管炎の発生頻度は 86% であった。ガンマグロブリン製剤 (h-IG) の 400mg x 5 日間連続投与では h-IG 群、high MPO-ANCA (含 MPO 抗体) 群、low

MPO-ANCA(不含 MPO 抗体)群すべて汎血管炎発生頻度は減少した。h-Ig 2000mg/Kg 単回投与では汎血管炎を抑制することは出来なかった。

2) 合成マウス型ガンマグロブリン (SyIG) 治療

汎血管炎発生頻度は SyIG 投与群と対照群との間で有意差を認めなかったが、汎血管炎の広がりやを定量化し、心基部を無・左・右冠尖および左・右冠状動脈の 5 つの区域に分け、侵襲されている領域について検討した。その結果、対照群では検索した全区域の 44% の領域で汎血管炎が発生していたのに対し、Fv-SyIG 4mg/ml、2mg/ml 投与群で侵襲区域は有意に減少し、病変範囲は限局化した (図 3)。

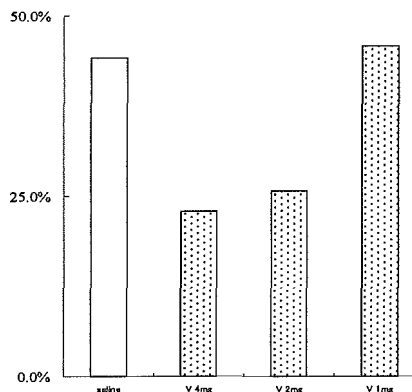


図 3. マウス型人工 IgG による抑制効果領域数からみた汎血管炎発生頻度

(3) 心筋炎モデル動物マウスでの検証

実験的自己免疫性心筋炎ラット (EAM) における Ig 融合蛋白の治療効果の検討: 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、Ig 融合蛋白にすることによって、高い血中濃度を維持出来ることが示された。次に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。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。EAM 心臓中の IL-1、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-1 受容体アンタゴニスト-Ig 融合蛋白、IL-13-Ig 融合蛋白の効果を示した。IL-1 受容体を持つ細胞は、EAM 心臓中の $\alpha\beta$ T 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であり、IL-13 受容体を持つ細胞は、CD11b 陽性細胞および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-1 受容体アンタゴニスト-Ig 融合蛋白、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。また IL-1 受容体アンタゴニスト-Ig 融合蛋白治療によって、血行動態の改善が認められた。

3. 臨床班

分担研究者: 武曾恵理 ((財) 田附興風会医学研究所北野病院)、橋本博史 (順天堂大学)、相澤義房 (新潟大学大学院)、佐地 勉 (東邦大学)、鈴木和男 (主任研究者、国立感染症研究所)

研究協力者: 小野孝彦 (静岡県立大・薬)、深津敦司 (京大・附属病院・腎臓内科)、今井圓裕 (大阪大・院・病態情報内科)、湯村和子 (東京女子医科大・第四内科)、山崎 力 (東京大・院医)、有村義宏 (杏林大・医)、胡麻田学 (長門総合病院)、山西裕司 (広島市民病院)
協力: 猪原登志子 (田附興風会医学研究所北野病院、京都大学院医)、古宮俊幸 (田附興風会医学研究所北野病院)、山縣邦弘 (筑波大学附属病院)、赤松 明 (愛媛県立新居浜病院)、小玉誠 (新潟大院医)、塙晴雄 (新潟大院医)

(1) IVIg 療法の臨床的検討

1) RPGN における IVIg 治療

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(表 1, 2、図 4)

表 1. Characteristics of the 12 patients (M/F=7/5)

Patient	Age	Sex	Data before treatment								
			WBC/ μ l	CRP mg/l	Cre μ mol/l	MPO-ANCA, EU	Active crescents, %	BVAS	extrarenal manifestations	pulmonary involvement	latent and antibiotics resistant infections
1	82	F	7,000	80	283	239	81	19	S, F, E		HBV carrier
2	75	M	9,600	178	106	435	0	23	S, F, A, C, N		MAC, <i>K. pneumoniae</i>
3	61	F	8,100	43	126	244	71	15	S, F		
4	82	M	9,400	104	417	159	71	14	S, A		
5	64	F	12,100	154	737	276	81	19	S, F, L	infiltrate	
6	59	M	10,200	139	389	140	90	15	S, F		<i>Aspergillus</i>
7	83	F	4,700	1	258	617	60	20	S, F, Ab		
8	82	F	14,700	113	210	306	38	21	S, F, N		
9	57	M	10,700	99	357	980	64	19	S, A, N		
10	62	M	10,100	101	732	370	80	25	S, L, N	nodules	
11	75	M	9,300	60	1,012	82	33	27	S, E, L	infiltrate	HBV carrier, MRSA, <i>P. aeruginosa</i>
12	67	M	11,900	68	401	1,740	78	19	S, L	hemoptysis	MRSA
Mean	71		9,820	95	419	466	62	20			
Reference range			3,500–9,100	<3	<106	<20		0			

WBC = White blood cell count; CRP = C-reactive protein; Cre = serum creatinine; MPO-ANCA = myeloperoxidase antineutrophil antibody; BVAS = Birmingham Vasculitis Activity Score; S = systemic symptom (malaise, myalgia, weight loss); F = fever; A = arthralgia; C = cutaneous; E = ear-nose-throat; L = lung; Ab = abdomen; K = kidney; N = neuropathy; HBV = hepatitis B virus; MAC = *Mycobacterium avium* complex; *K. pneumoniae* = *Klebsiella pneumoniae*; MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*.

表 2. Treatment and outcomes after IVIg treatment

Patient	Initial immunosuppressive treatment just after IVIg				Treatment after 3 months			
	mPSL pulse	PSL dosage mg/kg/day	CYC dosage mg/kg/day	dialysis	PSL dosage mg/kg/day	CYC dosage mg/kg/day	dialysis	Cre μ mol/l
1	–	0.3	0.7	–	0.3	0	–	124
2	–	0.7	0.4	–	0.3	0.4	–	88
3	–	1.0	1.0	–	0.5	1.1	–	92
4	–	0.5	–	HD	0.7	–	¹	308
5	–	1.0	1.0	–	0.6	1.1	–	204
6	1 g, 3 days	0.7	0.8	–	0.3	0	–	177
7	–	0.5	1.3	–	0.3	0	–	203
8	–	0.6	–	–	0.4	–	–	87
9	1 g, 3 days	0.7	0.7	–	0.2	1.7	–	141
10	–	0.8	0.8	–	0.4	0.8	–	353
11	–	0	–	HD	0.5	–	HD	723 ²
12	0.5 g, 3 days	0.5	–	–	0.5	–	–	131
Mean		0.6	0.8 ³		0.4	0.6 ³		173 ⁴

mPSL pulse = Methylprednisolone pulse therapy; PSL = prednisolone; CYC = cyclophosphamide; Cre = serum creatinine; HD = hemodialysis.

¹ Cessation of HD; ² Cre level before a hemodialysis; ³ mean CYC dose of 8 patients; ⁴ patient 11 was excluded.

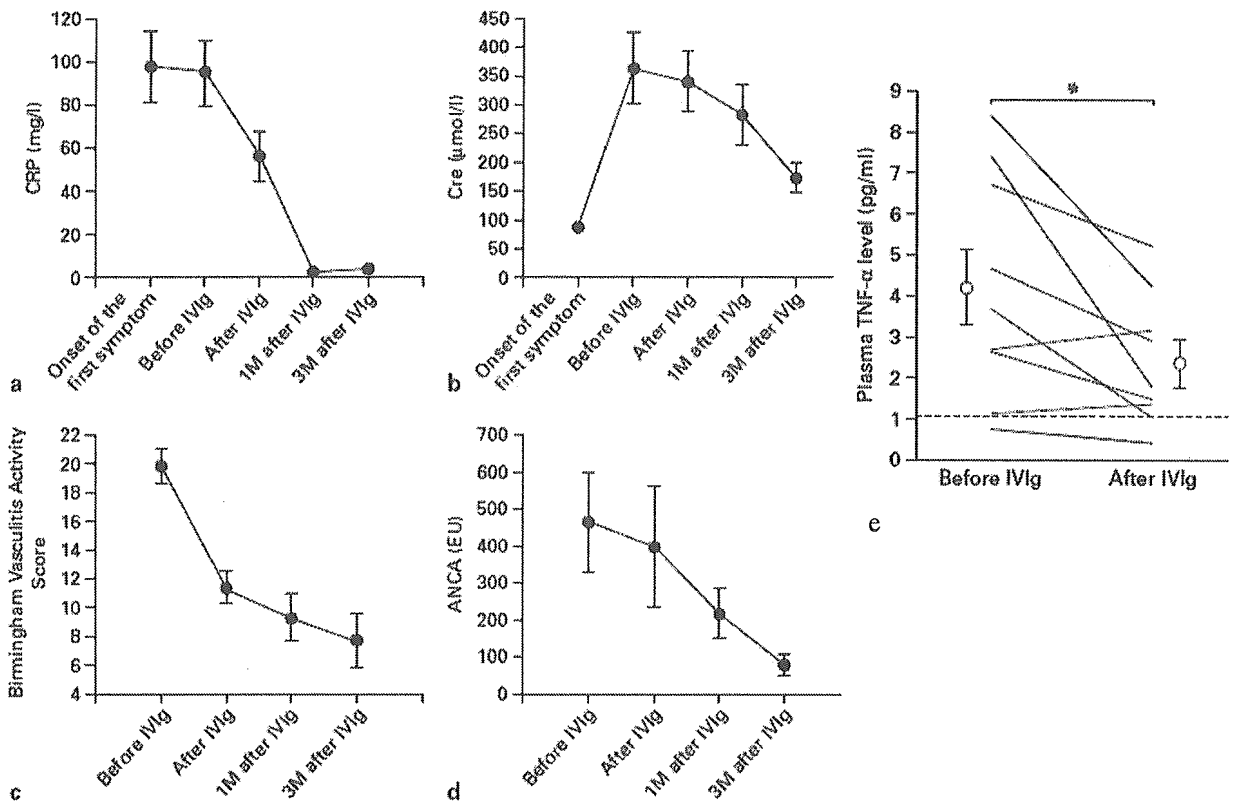


図 4. IVIg 治療による検査項目および評価項目の改善

a: CRP, b: クレアチニン, c: BVAS スコア, d: ANCA 値、e: 血漿中 TNF- α

ヒトガンマグロブリン製剤は、重症感染症をはじめ、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。特に、近年増加の一途をたどっている高齢者に後発する MPO-ANCA 陽性全身血管炎に発症する関連急速進行性糸球体腎炎には、従来の標準的免疫抑制治療では、しばしば重篤な感染症や薬剤の副作用をもたらし、その治療に難渋していたが、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を、この研究班を中心とした臨床的検討で明らかとなり、その成果を公表した。同時のその免疫学的作用機序の解明に向けて、本研究班の臨床部会で、IVIg 治療による患者の抹消血中のサイトカイン動向や、好中球、リンパ球機能の解析をすすめ、病態活動性および、治療反応性の指標を確立しつつある。また、この班のこれらの成果をうけて、当該プロジェクトの臨床班が中心となって、我が国で数カ所の施設が拠点としてさらに治療症例が証明された。一方、客観的な治療効果のエビデンスを確立するため、全国 19 施設において前

期第 II 相の多施設共同研究が進行中である。これら臨床的な IVIg の効果の証拠とその効果判定法の確立により、人工グロブリン完成後の translational research およびその実用化への展望がひらけ、難治性血管炎をふくむ重篤な全身免疫疾患への安全で確実な治療法開発に確実に近づいた。この臨床試験は、人工化の大前提であり、現在人工化 IVIg の治療法へ向けて準備が着々と進んでいる。

2) 多発性筋炎/皮膚筋炎に対する IVIg 療法

疼痛・腫脹関節数および炎症反応はインフリキシマブ投与後 6 週で減少し、22 週では再度上昇する傾向が認められた。医師による効果判定では、インフリキシマブ投与 6 週後で有効 54.5%、著効 27.3%、無効 18.2%で、22 週後ではそれぞれ 50.0%、16.7%、33.3%であった。副作用は感染症が 2 名に認められ、帯状疱疹が 1 名、肺真菌症が 1 名であった。注意すべき副作用である infusion reaction や肺結核は認められなかった。

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。

3) 劇症型心筋炎症の IVIg 治療

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。

一方、ヒト心筋炎において有効性が考えられた症例を以下に示す。

53 歳の男性。心臓の有効収縮と心拍出は完全に消失し、早期自然治癒の展望が得られないため IVIg 療法を行い、7 日間で経皮的心肺補助装置 (PCPS) から離脱できた。

35 歳の女性が分娩後にうっ血性心不全を発症し入院した。左室壁運動はびまん性に低下し、心内膜心筋生検により炎症性細胞浸潤と心筋壊死、線維化をみとめ慢性心筋炎と診断された。多臓器不全への進行が予想されたため、メチルプレドニゾロン短期大量療法と IVIg 療法を行い、低拍出状態から離脱し家庭生活に復帰できた。

20 歳女性。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 治療を行い、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。

(2) IVIg 治療の評価

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 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、平成 16 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。

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。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。

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

鈴木和男 (主任研究者、国立感染症研究所) 大野尚仁 (東京薬科大学)、新井孝夫 (東京理科大学)、高橋 啓 (東邦大学)、荒谷康昭 (横浜市立大学)、山本健二 (国立国際医療センター研究所)、大川原明子 (国立感染症研究所)、鈴木章一 (長崎大学・熱帯病医学研究所) 協力：三浦典子 (東京薬大)、星野昭芳 (国立国際医療センター研)、真鍋義則 (国立国際医療センター研)、藤岡宏樹 (国立国際医療センター研)、塩原あまね (国立国際医療センター研)

(1) CAWS の致死ならびに血管炎惹起活性発現に関わる構造上の特徴

CAWS は mannoprotein-beta-glucan complex であって、活性に関わるとされる種々の部分構造を含有している。活性中心を検索することは血管炎惹起を分子レベルで解析するために必須の情報である。Candida のマンナン抗原の構造は培養条件によって左右されることが知られている。そこで、Candida を 27°C と 37°C、pH2, 5, 7 と種々の条件で培養し、それらの条件で CAWS を作成した。今回作成した中で、27°C—pH5 ならびに 27°C—pH7 で作成した CAWS は急性致死活性ならびに血管炎の何れも著しく弱かった。Mannan 構造について NMR ならびに特異抗体で検討したところ、上記に制御した条件では β 1, 2-結合が著しく増加することが明らかとなった。これらのことから、CAWS 血管炎には α マンナン構造が重要であり、 β マンナン構造は抑制的に作用する可能性のあることが示唆された。

(2) CAWS 誘導血管炎の初期反応の解析

CAWS 腹腔投与直後から、末梢好中球は増加した。その原因は骨髄から末梢への移動と考えられた。また、好中球機能について解析したところ、MPO 放出、活性酸素産生能いずれも CAWS 投与1時間後から活性化する傾向を認めた(図2)。さらに、炎症性サイトカイン産生について解析したところ、CAWS 投与後早期において IL-12/p70、IL-1 β 、IL-10、IL-6 の炎症性サイトカイン産生を認めた。また、MIP-2、G-CSF の産生を認めた。CAWS 投与によって産生が有意に増加した IL-1 β 、IL-6、IL-10 を好中球が産生する可能性を明らかにするため、CAWS 1 mg/ml を腹腔滲出好中球に作用させたところ、IL-6 の産生は CAWS によって亢進したが IL-1 β 、IL-10 は CAWS の存在とは無関係に好中球が産生していることが示された。心大動脈局所の内皮の傷害性について ICAM-1 発現を指標にして検討をしたところ、CAWS 投与 16 時間後には有意な上昇を認めた。また、血中の可溶性 ICAM-1 も CAWS 投与後、時間の経過とともに上昇した。一方、好中球活性化の原因のひとつとして補体の活性化について検討したが、CAWS 投与直後からその活性化が認められた。

(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。

(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。

(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。

5. 安全試験

佐々木次雄(国立感染研・血液安全性部、室長)、鈴木和男(主任研究者、国立感染症研究所)

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

この3年間に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、ヒト型による治療法に向けた準備が整った。

(1) マウス型人工 IVIg によるモデルマウス治療の成果

本研究で推進した人工ガンマグロブリンは、まずマウス型の合成に成功し、血管炎モデルマウス（川崎病、RPGN）への有効性を示すことができた。

(2) ヒト IVIg 血管炎治療の成績

ヒトガンマグロブリン製剤は、重症感染症をはじめ、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、ヒトガンマグロブリン製剤その使用が微増ながら増え続けている。特に近年増加の一途をたどっている近年増加の一途をたどっている高齢者に後発する MPO-ANCA 陽性全身血管炎に発症する関連急速進行性糸球体腎炎には、従来の標準的免疫抑制治療では、しばしば重篤な感染症や薬剤の副作用をもたらし、その治療に難渋していたが、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この研究班を中心とした臨床的検討で明らかとなり、その成果を報告した。

これらの成果をうけて、当該プロジェクトの臨床班が中心となって、我が国で数カ所の施設が拠点としてさらに治療症例が証明され、客観的な治療効果のエビデンスを確立するため、全国 19 施設において前期第 II 相の多施設共同研究が進行中である。これら臨床的な IVIg の効果の証拠とその効果判定法の確立により、人工グロブリン完成後の translational research およびその実用化への展望がひらけ、難治性血管炎をふくむ重篤な全身免疫疾患への安全で確実な治療法開発に確実に近づいた。この臨床試験は、人工化の大前提であり、現在人工化 IVIg の治療法へ向けて準備が着々と進んでいる。また、日経産業新聞への掲載などもあり、一般の関心が高まっている。

(3) 人工ガンマグロブリンの製剤化をめざす

ガンマグロブリン製剤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。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準備

はできたと言える。この3年間の研究において、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、感染症の安全研究ガイドラインを基に安全性が確保され、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(2006年国際シンポジウムプログラム)

E. 結論

ガンマグロブリン製剤は、重症感染症、川崎病や一部の難治性疾患などの治療に使用されている。また、欧米よりわが国に多い難治性疾患に分類される MPO-ANCA 関連血管炎において、われわれのグループでは 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報告した。このようにガンマグロブリン製剤の用途拡大が見込まれ、需要が増える傾向にある。しかし、その原材料供給、感染症リスク、医療経済の点から人工化が今日的急務となっている。そこで、本研究では、これらを克服するため、ガンマグロブリンの人工化をめざした。この3年間で、マウス型人工グロブリンの合成に成功し、血管炎モデルマウスによりその有効性を認め、安全性の確保についてもあわせて検討した。

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。また、平成 17 年からヒトガンマグロブリンの探索試験も開始した。さらに、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、一般にも関心が高まっている。

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、アドバイザー、協力者の協力によって推進され、目標の成果を得ることができた。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

多数のため、巻末の「刊行物一覧表」および「15, 16, 17各年度の総括・分担研究報告」を参照

Ⅲ. 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

難治性血管炎に伴う MPO-ANCA 陽性急速進行性糸球体腎炎に対する IVIg 療法の臨床的効果のエビデンスと免疫学的効果判定指標の確立に向けて

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

研究協力者

- 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：財団法人ルイ・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
- 胡麻田学：長門総合病院内科部長
- 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：大量 γ グロブリン療法（IVIg）の感染防御作用や免疫修飾作用は、近年の免疫機能異常をもたらす種々の重篤な全身疾患の治療に有用性が示されてきている。特に近年増加の一途をたどっている高齢者に後発する MPO-ANCA 陽性全身血管炎に発症する関連急速進行性糸球体腎炎には、従来の標準的免疫抑制治療では、しばしば重篤な感染症や薬剤の副作用をもたらし、その治療に難渋していたが、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この研究班を中心とした臨床的検討で明らかとなり、その成果を公表した。同時のその免疫学的作用機序の解明に向けて、本研究班の臨床部会で、IVIg 治療による患者の抹消血中のサイトカイン動向や、好中球、リンパ球機能の解析をすすめ、病態活動性および、治療反応性の指標を確立しつつある。また、この班のこれらの成果をうけて、我が国で数カ所の施設が拠点となりさらに治療症例が証明された。一方、客観的な治療効果のエビデンスを確立するため、全国 19 施設において前期第 II 相の多施設共同研究が計画されて、進行中である。これら臨床的な IVIg の効果の証拠とその効果判定法の確立により、人工グロブリン完成後の translational research およびその実用化への展望がひらけ、難治性血管炎をふくむ重篤な全身免疫疾患への安全で確実な治療法開発に確実に近づいた。

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討され、良好な結果を得た。その概要を検証する。

B. 研究方法

1. 治療前、単独使用例の効果の検討

1) 症例

京都大学付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T 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. 研究結果

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。さらに追跡された症例については、6ヶ月目の経過を観察したが、CRPやCr値の再上昇をみとめる例があった。図1

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。これらの結果を図2に示す。

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。全ての検体について患者名の記号化をおこない、そのデータを院内の一定の場所に保管して、余人によって記号化に関する情報漏洩のない様に管理している。また、検体提出に関しての提供者の同意については、医学研究所北野病院倫理委員会で承認された入院時の同意に基づいて行われている。

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¹⁾、F(ab')₂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²⁾。さらに補体を直接抑制する抗炎症作用³⁾、TNFαなどのサイトカイン抑制作用⁴⁾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⁵⁾、多人数のIgが認識する共通のidiotypic抗体によるANCAの抗原への結合の阻止、さらには、IVIgによるグルココ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⁶⁾。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⁷⁾。

一方、6ヶ月時点でのCr値、CRPの再上昇を認める症例の発現については、IVIg一回の炎症抑制作用としては、3ヶ月を目途として期待できる可能性を示唆し、可能であれば、再燃症例にはその時点で、免疫抑制療法を再開することなく、再度IVIg療法を施行することを検討する余地があると考えられた。

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 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 ahead 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. 結論 (LIII 共通)

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. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. *Nephrology* 10(Suppl): A53, 2005
2. 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. *Kidney & Blood Pressure Research* 28 (3):180, 2005
3. 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. *Kidney & Blood Pressure Research* 28 (3):183, 2005
4. 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. *Kidney & Blood Pressure Research* 28 (3):183, 2005
5. 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. *Kidney & Blood Pressure Research* 28 (3):190, 2005
 6. 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
 7. Suzuki K, Muso E, Nauseef WM: Contribution of peroxidases in host-defense, diseases and cellular functions. *Jpn J Infect Dis* 57(5):S1-2, 2004
 8. Liu N, Makino T, Honda G, Muso E, Kita T, Ono T: Suppressive effects of Sairei-to on mesangial proliferation in a rat model of glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol* 8(3):216-222, 2004
 9. 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):229-238, 2004
 10. 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):1708-1715, 2004.
 11. 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
 12. 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
 13. 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)
 14. 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: 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 *Pasken Journal* 17: 39-43, 2004
 15. 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 *Pharma Medica* 22(5):182-184, 2004
 16. 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
 17. 胡麻田学、赤松明: 重篤な病態に対し