

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

分担研究者: 佐地 勉、東邦大学医学部 教授

協力研究者: 高月晋一、監物 靖、岡松千都子、嶋田博文、中山智孝、松裏裕行

研究要旨: 近年リン脂質の過酸化が酸化ストレス (OS) によるものであり、また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きた。また、尿中 8-isoprostane はリン脂質の過酸化に特異的なかつ有用な指標であり、この測定が各疾患における OS の評価になることが注目されている。今回は特に全身性血管炎である急性期川崎病における超大量ガンマグロブリン (IVIG) 投与が OS (尿中 8-Isoprostane と 血中 Reactive Oxygen Species (ROS)) に及ぼす影響を明らかにした。

その結果、IVIG は血管炎症候群である急性期川崎病において、血管内皮障害によって活性化された酸化ストレスを有意に抑制する作用を有することが判明した。つまり IVIG は抗酸化ストレス作用を持つことが示唆された。

A. 研究目的

IVIG の有効性を検証する一手段として、OS に及ぼす影響に着目し、急性期川崎病患者における OS マーカーの尿中 8-Isoprostane と血中 Reactive Oxygen Species (ROS) を測定し、IVIG による改善度と病態との関与について検討した。

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。

今回、血液中で安定した ROS も測定し得たので報告する。

B. 研究方法

1) 尿中 8-Isoprostane 測定

対象は 2001 年 4 月から 2004 年 12 月までの間に IVIG の治療を受けた、急性期川崎病典型例 62 例。対照は健常児 20 例。急性期 IVIG 治療前、7 日後、14 日後、30 日後に採取した尿検体を用いて、EIA 法により 8-Isoprostane を測定した。検討項目として、川崎病患者と健常児群との比較、IVIG 治療前後の変動の検討を行った本研究は当院の倫理委員会により承認され、患者家族へ尿の採取について IC を取得し検査を行った。

2) 血中 ROS 測定

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 3 ヶ月~3 歳; 平均 1.5 歳 (男女比 8:11) としました。

入院時の急性期川崎病の病日は中央値第 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

急性期川崎病では正常児に対し有意に OS が高値を示した。

1) 8-Isoprostane は IVIg 投与により 7 日目に有意に低下した。IVIg 投与方法別では、1g/kg 単回投与や 400mg/kg 分割投与に比べ 2g/kg 単回投与 (24 時間) 投与による低下が最大であった。IVIg の追加投与を要する不完全治療症例では初回投与後も 8-Isoprostane の低下を認めず、追加投与により低下が得られた。

急性期川崎病では OS が高値をとっており、IVIg は増加した OS を dose-dependent に、速やかに低下させることが判明した。

対照群と治療前の急性期川崎病患者群における 8-Isoprostane の比較を示します。健常群・急性熱性疾患患者群と比べ川崎病患者群では優位に高値を示しました。

また、健常群ではおおむね 8-Isoprostane 値は 500 以下であり、これを正常域と考えた。

2) 急性期川崎病 IVIg 前値 284±57(unit): 健常対照: 190±53(unit)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。

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。しかし、急性期川崎病では 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. 考察

近年、リン脂質の過酸化が酸化ストレスによるものであることが明らかになり、これが心血管障害と関与していることが報告されている。特に糖尿病や動脈硬化などの血管障害のある症例で、OS マーカーが高値をとることがいわれている。

8-Isoprostane がリン脂質の過酸化に特異的な指標であり、この測定が疾患における OS の評価になる。しかし、小児領域での OS の正常域や疾患との関与、特に川崎病などの血管炎に伴う変動は未だ知られていない。

8-Isoprostane、8-Iso-PGF2 α は細胞膜または LDL のリン脂質上でつくられる。リン脂質上のアラキドン酸が、phospholipase A2 によって過酸化、peroxidation をうけると細胞障害が起こり、8-isoprostane が血中に入り尿中に分泌される。この尿中 8-Isoprostane が酸化ストレスの指標とし

て測定される。

急性期川崎病では他にお疾患より OS が高値をとっており、その病態に酸化ストレスが関与していることが考えられた。

8-Isoprostane は IVIG 投与により低下したが、一部の症例で回復期にも高値を示した。IVIG 投与方法別では、2g/kg 超大量投与により OS の低下が最大であった。IVIG 追加投与を要する症例では初回投与後も 8-Isoprostane の低下を認めず、追加投与により低下が得られた。尿中の 8-Isoprostane は小児科領域において非侵襲的で簡便な方法で測定できることから、今後酸化ストレスの指標として有用と考えられた。

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考えられる。

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 idiotypic 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。急性期川崎病の合併症である冠動脈障害を来た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-Isoprostane 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。

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、OS の代

謝産物である尿中 8-Isoprostane と血中 ROS が上昇していること、さらに IVIG 投与により正常化する事を報告した。

E. 結語

IVIG は血管炎症候群である急性期川崎病において、血管内皮障害によって活性化された酸化ストレスを有意に抑制する作用を有する。つまり IVIG は炎症性疾患において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.
4. 佐地 勉, 菌部友良, 上村 茂, 赤木 禎治, 鮎澤 衛:川崎病急性期治療のガイドライン. *日小循誌* 2004, 20, 1, 54-62

5. Onouchi Y, Onoue S, Tamari M, et al (19th place): CD40 ligand gene and Kawasaki disease. *Eur J of Human Gene*, 12, 1062-1068,2004
6. 佐地 勉, (ゲスト)川崎富作:川崎病と闘う日々ー川崎富作先生に聞く Part1. *心臓* 2005,37,161-168

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.

9. 高月晋一, 曾根尚子, 監物靖, 嶋田博光, 星田宏, 中山智孝, 松裏裕行, 佐地 勉: 一過性の心収縮機能低下を呈した急性期川崎病の1例. 第14回東京川崎病研究会, 東京, 2004.6

10. 佐地 勉: IVIG 不応例への対処と川崎病治療ガイドライン. 群馬大学小児科川崎病学術講演会, 群馬, 2004.6

11. 星田宏, 嶋田博光, 高月晋一, 中山智孝, 石北隆, 松裏裕行, 佐地 勉, 古谷美知子, 松裏瑠美子: 川崎病患者における IVIG 治療前の *Helicobacter Pylori* 抗体価. 第40回日本小児循環器学会総会・学術集会, 東京, 2004.7

12. 佐地 勉: ー急性期川崎病ーIVIG 不応例への治療 option を考える. 第2回信州川崎病フォーラム, 松本, 2004.9

13. 竹内大二, 佐地 勉, 高月晋一, 藤原摩耶: 急性期川崎病における組織ドップラー異常と尿中酸化ストレスの検討. 第52回日本心臓病学会学術集会, 京都, 2004.9

14. 佐地 勉: なぜ冠動脈流ができたのか 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

15. 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,澤井清: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 24 回日本川崎病研究会,京都,2004.11
16. 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:川崎病における Oxidative Stress Marker の急性期以後の推移.第 24 回日本川崎病研究会,京都,2004.11
17. 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,関口恭子,石黒精: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 24 回日本川崎病研究会,京都,2004.11
18. 藤原摩耶,竹内大二,佐地 勉:発熱以外の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 24 回日本川崎病研究会,京都,2004.11
19. Y1asushi Kemmotsu, Shinichi Takatsuki, Tomotaka Nakayama, Hiroyuki Matsuura, Ichiro Tsukimoto, Tsutomu Saji: Clinical Characteristics of Aseptic Meningitis After Intravenous Immunoglobulin Infusion in Patients With Kawasaki Disease. Eighth International Kawasaki Disease Symposium, San Diego, U.S.A, 2004.11
20. Shinichi Takatsuki, Yuka Ito, Daiji Takeuchi, Hiroshi Hoshida, Tomotaka Nakayama, Hhiroyuki Matsuura, Ichiro Tsukimoto, Tsutomu Saji: Intravenous Immunoglobulin Significantly Reduced Vascular Oxidative Stress in Patients in the Acute Stage ofKawasaki Disease. Eighth International Kawasaki Disease Symposium, San Diego, U.S.A, 2004.11
- 21 . Daiji Takeuchi, Tsutomu Saji, Maya Fujiwara, Shinichi Takatsuki: Abnormal Tissue Doppler Image Is Significantly Correlated With Increased Systemic Oxidative Stress in Acute Kawasaki Disease. Eighth International Kawasaki Disease Symposium, San Diego, U.S.A, 2004.11
- 22 . Daiji Takeuchi, Tsutomu Saji, Maya Fujiwara: Abnormal Tissue Doppler Image Is Significantly Correlated With Increased Plasma Brain Natriuretic Peptide Level in Acute Kawasaki Disease. Eighth International Kawasaki Disease Symposium, San Diego, U.S.A, 2004.11
23. 高月晋一,竹内大二,佐地 勉:医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究「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」人工グロブリン班(鈴木班):急性期川崎病における IVIG による Oxidant Stress 抑制効果.日本小児循環器学会平成 16 年度第 2 回学術委員会 working group 委員会,東京,2005.1

Ⅱ, 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
- 3、その他 なし

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

分担研究者 大野 尚仁 東京薬科大学 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。本研究では、I. DBA/2 において惹起される致死性血管炎の発症機構、II. 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、ならびに、III. CAWS の致死性発症機構について解析した。これらの結果をもとに血管炎形成における血管病変の形成過程を推定するとともに、治療薬開発のターゲットを明確にした。

I. DBA/2 において惹起される致死性血管炎の発症機構

DBA/2 マウスは致死性血管炎を惹起する特徴的な系統として見出された。この系統の脾臓細胞の真菌多糖に対する反応性を詳細に解析したところ、この系統は GM-CSF 産生能が著しく高く、これに付随して、他のサイトカインの産生が著しく向上していることが明らかとなった。さらに、各サイトカインの産生に関わる細胞要求性は TNF ならびに IL-12 は GM-CSF 存在下には付着細胞群のみで十分であった。一方、IFN γ ならびに GM-CSF 産生は付着細胞ならびに非付着細胞の細胞間相互作用が必須であることがわかった。また、これらの反応の律速段階は、細胞間相互作用に基づく GM-CSF 産生であり、この反応を惹起できることが本系統の最も特徴的なことであった。これらのことから、DBA/2 マウスにおけるサイトカイン産生は図 1 のように調節されていることが強く示唆された。

これらの反応は、真菌多糖であるベータグルカン (BG) ならびに CAWS で共に認められた。BG 受容体には Dectin-1, CR3, lactosylceramide な

どが知られる。一方で CAWS の受容体は mannan 認識受容体である血清中の補体のレクチン経路、ならびに細胞上に発現する DC-SIGNR などが考えられる。上記のサイトカイン産生はこれらの受容体を介したものと推定されるが、急性致死ならびに血管炎惹起については、BG と CAWS は異なる特徴を示す。これらのことから、サイトカイン産生パターンと血管炎惹起は部分的にメカニズムを共有している可能性が高い。CAWS 血管炎の誘発と進展には遺伝的ならびに環境上の様々な要素が関与している。今後更に詳細な解析が期待される。

II. 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、活性に関わると思わ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, pH 2, 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。

III. CAWS の致死活性発症機構

CAWS をマウスに静脈内投与すると急性の致死毒性を示す。この致死毒性は 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。また、系統差を示し、C5 欠損の DBA/2 や AKR では致死活性を示さない。この毒性発現に関わる因子について解析したところ、エピネフリンの後投与によって阻害された。また、ヒスタミン、セロトニン、PAF からのシグナルを同時にブロックすることで抑制された。しかし、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致死は抑制できなかつた。また、CAWS を少量前投与あるいは腹腔内投与を受けたマウスでは致死は認められなくなった。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。

E. CAWS 血管炎発症機構と応用

深在性真菌症は超高齢化社会において徐々に脅威が増している。深在性真菌症の病原因子は顕著なものとは言えず、原因菌から特定の毒素を見出すことは非常に困難である。カンジダは代表的な

真菌症の原因菌であり、ヒトの常在微生物叢を構成している。正常な状態では病原性を発揮するとは言えないが、種々の患者背景により、血中や臓器中に移行すると真菌症となる。カンジダ細胞壁を構築するペータグルカンやマンナンは何れも免疫系を刺激する。これらの物質が免疫系を刺激することは二面性を有し、健常状態においては、免疫の機能強化に働く。一方で、条件が整えば、疾病を誘引することになる。本研究で見出した菌体外多糖画分 CAWS の血管炎惹起ならびに急性致死活性は、何れも病態に関わる重要な性質である。可溶性の多糖画分は深在性真菌症の患者血中から見出されており、これらの成分の毒性の一部とも考えることができる。ヒトの疾病における血管炎や急性の致死に CAWS が直接関与するか否かは今のところ明確ではない。今後、患者材料を評価することで明確にしなければならない点である。

CAWS の致死活性は頻回投与では認められないことから、トレランスを惹起することがわかつた。ヒトの重症感染症においては、菌は持続的に免疫系を刺激するので、トレランス状態が引き起こされる可能性は高い。一方で、DBA/2 マウスは補体 C5 欠損であり、急性致死は起きないが最も重篤な血管炎を惹起する。C5a アナフィラトキシンは G タンパク質共役の受容体を有し、ヒスタミン、セロトニン、PAF などの受容体と交差耐性を示すことが知られている。また、C5a はアナフィラトキシンとして作用する一方、トレランスに関連して、フィードバック機構も示すことが知られている。DBA/2 では C5a 経路の欠損が重篤な血管炎の発症に関わっている可能性がある。このように *in vivo* での発症機構は多重かつ複雑に制御されているので、ヒトにおける CAWS の影響については今後更に解析が必要である。

DBA/2 で認められた致死的な血管炎では、

局所の増殖性の変化は最終投与後約1週間で認められ、その後1ヶ月に渡って重篤化し、その影響は心臓にまで及び、心不全を起こした可能性が高い(図2)。血管病変では、著しい細胞浸潤とそれに伴う弾性板の断絶が認められている。血管の強度を保持するための最重要構築物である弾性板の障害は平滑筋細胞に対するシェアストレスを増大し、結果的に細胞浸潤をより強く起こす引き金になっていると思われる。一方で、CBA/JマウスではIL-10産生が亢進することを見出しているが、免疫抑制的、抗炎症的に働くことから、弾性板の破壊に始まる一連の反応が弱められた可能性がある。

補体の活性化に始まる初期の反応から致死にいたる課程は約2ヶ月に及ぶが、ヒトにおける血管病変を短期間に良く反映しているので、血管に関わる様々な病態の治療薬の評価に用いることができる。メカニズム解析は始まったばかりであるが、今後分子レベルの種々の解析を行うことによって応用範囲は更に広がるものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大野尚仁, 血管炎を誘導する真菌糖蛋白質の免疫活性化, 医学のあゆみ, 206(2), 150-152, 2003
- 2) Naohito Ohno, Chemistry and Biology of Angiitis Inducer, *Candida albicans* Water-Soluble Mannoprotein- β -Glucan Complex (CAWS), *Microbiol. Immunol.*, 47(7), 479-490, 2003
- 3) Kiyoshi Kurihara, Yuko Shingo, Noriko N. Miura, Shuichi Horie, Yukio Usui, Yoshiyuki Adachi, Toshiro Yadomae, and Naohito Ohno, Effect of CAWS, a Mannoprotein- β -glucan Complex of *Candida albicans*, on Leukocyte, Endothelial Cell, and Platelet Functions *in Vitro*, *Biol. Pharm. Bull.*, 26(2), 233-240(2003)
- 4) Toshie Harada, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, Mitsuhiko Nakajima, Toshiro Yadomae, and Naohito Ohno, Antibody to Soluble 1,3/1,6- β -D-Glucan, SCG in Sera of Naive DBA/2 Mice, *Biol Pharm Bull.*, 26(8), 1225-1228 (2003)
- 5) Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, Toshiro Yadomae, Hiroshi Tamura, Shigenori Tanaka, and Naohito Ohno, Structure and Biological Activities of β -Glucans from Yeast and Mycelial Forms of *Candida albicans*, *Microbiol. Immunol.*, 47(3), 173-182 (2003)
- 6) Naohito Ohno, Murine Model of Kawasaki Disease Induced by Mannoprotein- β -Glucan Complex, CAWS, Obtained from *Candida albicans*, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57, 9-10 (2004)
- 7) Noriko N. Miura, Yuko Shingo, Yoshiyuki Adachi, Akiko I. Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki, and Naohito Ohno, Induction of Coronary Arteritis with Administration of CAWS (*Candida albicans* Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains, *Immunopharm. and Immunotoxic.*, 26, 527-543 (2004)
- 8) Ken-ichi Ishibashi, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, Norihiko Ogura, Hiroshi Tamura, Shigenori Tanaka, and Naohito Ohno, DNA Array Analysis of Altered Gene Expression in Human Leukocytes Stimulated with Soluble and Particulate Forms of *Candida* Cell Wall β -Glucan, *Int. Immunopharmacol.*, 4, 387-401 (2004)
- 9) Toshie Harada, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, Mitsuhiko Nakajima, Toshiro Yadomae, and Naohito Ohno, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Regulates Cytokine Induction by

1,3- β -D-Glucan SCG in DBA/2 Mice In Vitro, *J. Interferon Cytokine Res.*, **24**, 478-489

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

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

12) 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 (発表誌名巻号・頁・発行年)

1) 原田 敏江, 三浦 典子, 安達 禎之, 鈴木 和男, 大野 尚仁: 真菌多糖の in vitro における IFN- γ 産生増強作用の検討. 第5回オステオポンチン研究会 生体防御異常ワークショップ 2003 第6回肝臓生物学研究会 合同年会, 札幌, 2003

2) 三浦 典子, 新郷 裕子, 大原関 利章, 高橋 啓, 直江 史郎, 大川原 明子, 鈴木 和男, 大野 尚仁: *Candida albicans* 由来可溶性菌体外多糖 CAWS の血管炎誘発活性. 第68回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 東京, 2003

2) Noriko N. Miura, Hiroki Sankawa, Yoshiyuki Adachi, Akiko Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki, and Naohito Ohno: Immunological Analysis in Coronary Arteritis Induced with

Mannoprotein-Beta-Glucan Complex Released by *Candida albicans*, CAWS, in DBA/2 Mice. 第9回MPO研究会・サテライトシンポジウム, 八王子, 2003

4) Naohito Ohno: Murine Model of Kawasaki Disease Induced by Fungal Polysaccharide. 第9回MPO研究会・サテライトシンポジウム, 八王子, 2003

5) 三川 浩輝, 三浦 典子, 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, 大野 尚仁: *Candida albicans* 由来菌体外多糖 CAWS による致死的血管炎誘発メカニズムの解析. 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 福岡, 2003

6) 大野 尚仁: モデル動物の開発, CAWS 誘発血管炎. ナノとバイオイメージングの融合と医用への展開, 東京, 2003

7) 大野 尚仁, *Candida* 菌体外多糖画分 CAWS の物性と活性, 生体防御機能異常ワークショップ 2004 第7回肝臓生物学研究会 合同年会, 沖縄, 2004

8) 大野 尚仁, 真菌 β グルカンをめぐる最近の話題, 第48回日本医真菌学会総会, 横浜, 2004

9) N. Ohno, Murine model of Kawasaki disease induced by mannoprotein- β -glucan complex, CAWS, obtained from *Candida albicans*, The 4th International Peroxidase Meeting Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting, Kyoto, Japan, 2004

10) H. Shinohara, K. Ishibashi, T. Harada, N. N. Miura, Y. Adachi, and N. Ohno, Antibody response in mice to fungal angiitis inducer CAWS, *Candida albicans* water-soluble mannoprotein- β -glucan complex, The 4th International Peroxidase Meeting Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting, Kyoto, Japan, 2004

11) R. Tada, N. N. Miura, Y. Adachi, and N. Ohno, Comparison of fungal vasculitis inducer CAWS from

Candida albicans with bacterial lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O9, The 4th International Peroxidase Meeting Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting, Kyoto, Japan, 2004

12) N. N. Miura, Y. Shingo, Y. Adachi, and N. Ohno, Lethal toxicity of fungal vasculitis inducer CAWS, water soluble mannoprotein- β -glucan complex of *Candida albicans*, in mice, The 4th International Peroxidase Meeting Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting, Kyoto, Japan, 2004

13) H. Sankawa, Y. Kameoka, N. Miura, N. Ohno, and K. Suzuki, Gene expression in splenocyte response to CAWS injection of two murine strains, The 4th International Peroxidase Meeting Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting, Kyoto, Japan, 2004

14) 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男, cDNA マイクロアレイによる血管炎惹起物質 *C. albicans* 由来菌体外多糖, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 北海道, 2004

15) 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男, cDNA マイクロアレイ解析による血管炎に關与する炎症性分子の遺伝子発現, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004

16) N. Ohno, Strain specificity of CAWS-induced coronary arteritis, International Symposium on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research, Tokyo, Japan, 2004

17) 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

18) 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

19) 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
20) 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

21) 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

22) 原田 敏江, 川南 裕美, 三浦 典子, 安達 禎之, 大野 尚仁, 真菌多糖 β -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

23) 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

24) 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 の致死毒性に關する検討, 第 49 回日本医真菌学会総会, 幕張, 2005

25) 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 β マンノース残基の影響, 第 11 回 MPO 研究会, 福岡, 2005

26) 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

27) 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

28) 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

29) 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

30) 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

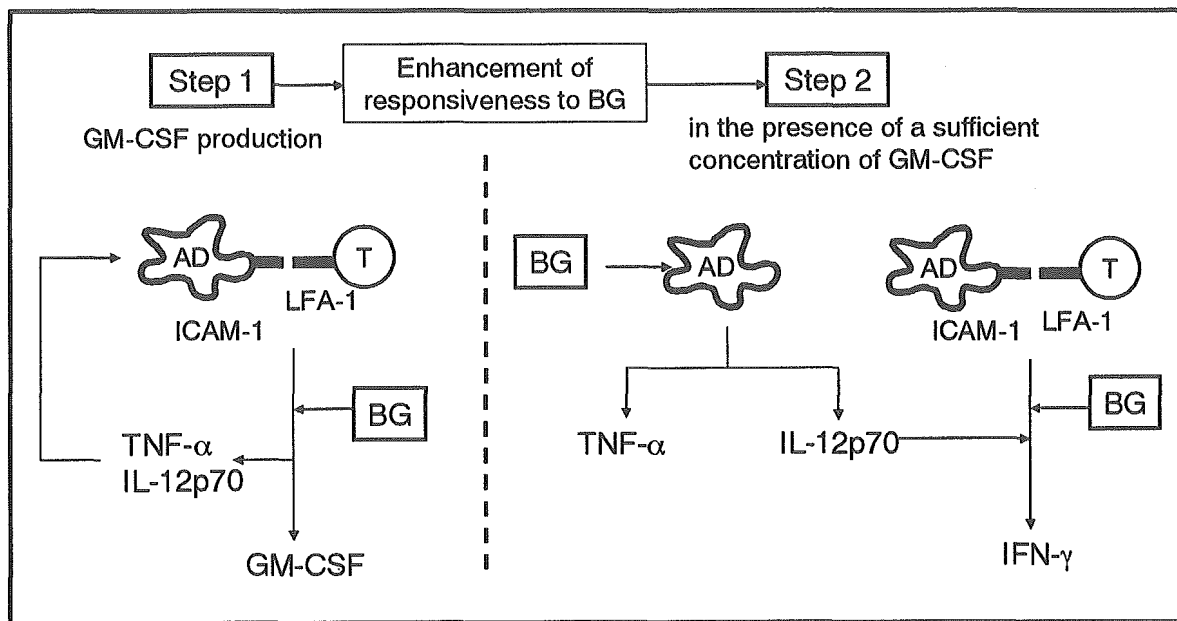
31) 駒井 元彦，三浦 典子，安達 禎之，大野
尚仁，CAWS 誘発血管炎の CBA/N、CBA/J マウス
を用いた比較，第79回日本細菌学会総会，金沢，
2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

(図1) DBA/2 脾臓細胞における真菌多糖によるサイトカイン産生誘導の細胞間相互作用の推定図
 DBA/2の脾細胞を *in vitro* で真菌多糖で刺激したときに惹起されるサイトカイン産生に関わる細胞間応答性の概略を示した。

BG ; 真菌多糖, AD ; 付着細胞群, T ; 成熟 T 細胞,

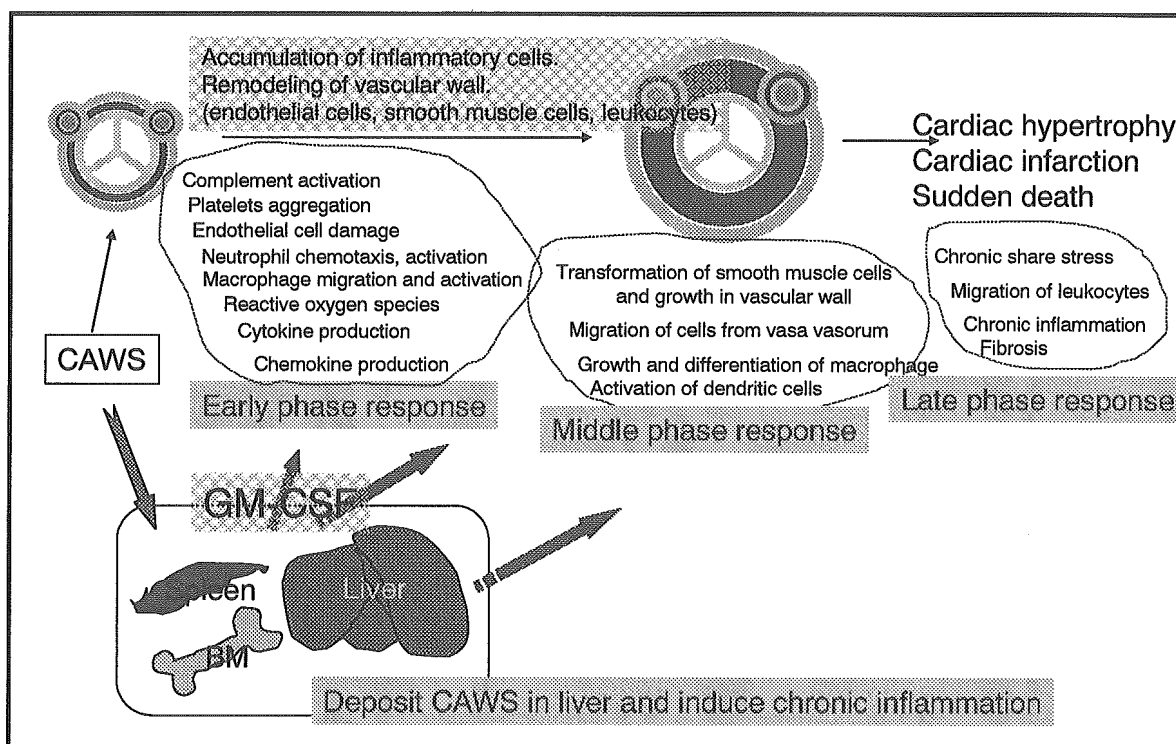


(図2) DBA/2 マウスにおける CAWS 血管炎の進展過程

CAWS によって DBA/2 に惹起される血管炎は初期, 中期, 後期と異なった様々な因子が関わっている。関連性の深いイベントを模式的に示した。

Proposed mechanism:

Important parameters of CAWS-induced coronary arteritis in DBA/2 mice



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

分担研究者 高橋 啓 東邦大学医学部病院病理学講座 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)によるマウス血管炎誘発モデルを用いて、ヒト免疫グロブリン(h-IG)およびマウス型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。h-IG 投与および SyIG 投与で動脈炎の発生を完全には抑制できないものの、SyIG 投与により汎血管炎の発生頻度や炎症の進展が抑制された。

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、ヒト免疫グロブリン(h-IG)、人工免疫グロブリン (SyIG) を投与した際の血管炎誘発抑制効果を検討すること。

B. 研究方法

1. 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。

2a. CAWS 接種後に 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(図 1)。

ヒト免疫 グロブリン製剤	h-IG, high-MPO-ANCA and low MPO-ANCA	↓↓↓↓ CAWS ↑↑↑↑ h-IG, 400mg/Kg	sacrifice
	high dose h-IG, 1st day	↓↓↓↓ CAWS ↑ h-IG, 2000mg/Kg	
	high dose h-IG, 3rd day	↓↓↓↓ CAWS ↑ h-IG, 2000mg/Kg	
マウス型人工 免疫グロブリン	SyIG	↓↓↓↓ CAWS ↑↑↑↑ SyIG (4, 2, 1mg/ml)	

図 1：実験スケジュール

2b. CAWS 接種後に SyIG を尾静脈から持続点滴した。

3. 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。

C. 研究結果

1. 血管炎発生頻度

a. h-IG 投与実験

対照における汎血管炎の発生頻度は 86% であった。h-IG の 400mg x 5 日間連続投与では h-IG 群、high MPO-ANCA 群、low MPO-ANCA 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(図 2)。

	incidence	
non-treatment (control)	86%	
h-IG	40%	*
high dose MPO-ANCA	40%	*
low dose MPO-ANCA	50%	**
single h-IG, 1st day	80%	
single h-IG, 3rd day	70%	

*p<0.01, **p<0.05

図 2 : h-IG 投与 : 汎血管炎発生頻度

b. SyIG 投与実験

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。そこで、汎血管炎の広がりを定量化するため、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ており、病変範囲は限局化していた(図 3)。

		incidence	
Control		44%	
Fv	4mg	23%	*
	2mg	26%	*
	1mg	46%	
Fv + Fc	4mg	46%	
	2mg	31%	
	1mg	37%	

*p<0.05

図 3 : SyIG 投与 区域別に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血管炎が生じた場合、h-IG 投与、SyIG 投与のいずれの群においても増殖性肉芽腫性炎症が観察され、顕微鏡的観察では明らかな組織学的差異は見出せなかった(図 4)。



図 4 : 大動脈起始部の動脈病変

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* 菌体由来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。このモデルは冠状動脈、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、川崎病と病理組織学的類似点が多い。

これまでの予備的検討で、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。

そこで、治療評価系として改良が加えられた CAWS 誘発マウス血管炎発生モデルに対し、h-IG を投与した際の血管炎抑制効果を検討した。この後、人工ポリクローナル免疫グロブリン SyIG を同様に投与し血管炎発生に及ぼす影響を検討した。その結果、h-IG、SyIG では侵襲区域が有意に減少し、病変範囲は限局化していた。この結果から、初期血管病変から汎血管炎への進展あるいは病変の展開を制御する作用を有する可能性が示された。

E. 結論

川崎病のみならず血管炎症候群の治療として用いられつつある免疫グロブリンは、本血管炎誘発モデルにおいても血管炎抑制効果を示した。安全性、医療経済の向上を図り作製した人工化免疫グロブリンも血管炎抑制に有効であることが示唆され、今後、新たな血管

炎治療法へと展開し得るものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 高橋 啓、直江 史郎：分子誘導型モデル動物—*Candida Albicans* 菌体成分による動脈炎誘発モデル. 医学のあゆみ 206:147-9, 2003
2. 高橋 啓、大原関 利章、直江 史郎：特集川崎病 Q&A カンジダ菌体抽出物によるマウス系統的動脈炎誘発モデルの特徴はなにか。小児内科 35:1500-2, 2003
3. 高橋 啓、大原関利章、村田久雄、直江史郎：カンジダ菌体抽出物によるマウス系統的血管炎誘発モデルと川崎病. 脈管学 43:673-8, 2003
4. K.Takahashi, T. Oharaseki, M.Wakayama, Y.Yokouchi, S. Naoe and H. Murata: Histopathological features of murine systemic vasculitis caused by *Candida albicans* extract – an animal model of Kawasaki Disease. *Inflamm. res.* 53: 72–7, 2004
5. 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: 181-9, 2005
6. 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

7. 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
 8. 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
 9. 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 : 527-43, 2004.
2. 学会発表
1. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、高橋 啓：川崎病類似動脈炎モデルにおける動脈炎形成過程の組織学的検討、第39回日本小児循環器学会総会、2003.7、神戸
 2. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、村田久雄、直江史郎、高橋 啓：カンジダ誘導系統的動脈炎モデルにおける動脈炎形成過程の組織学的検討、第44回日本脈管学会総会、2003.11、福岡
 3. 高橋 啓、三浦典子、大川原明子、金城義明、大原関利章、村山 研、土田和則、大野尚仁、鈴木和男：川崎病類似マウス動脈炎モデルにおけるヒト免疫グロブリンの治療効果、第33回日本免疫学会総会、2003.12、福岡
 4. 高橋 啓、大原関 利章、山田仁美、三浦典子、大野尚仁、土田和徳、金城義明、村山 研、大川原明子、鈴木和男：ヒト免疫グロブリン静脈内投与による血管炎抑制効果の病理組織学的検討。生体防御機能異常ワークショップ2004 第7回肝臓生物学研究会合同年会、沖縄、2004.06
 5. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、村田久雄、直江史郎、高橋 啓：カンジダ誘導マウス動脈炎モデルにおける動脈炎成立過程の組織学的検討。第93回日本病理学会総会、札幌、2004.06.
 6. 大原関 利章、高橋 啓、三浦典子、大川原明子、山田仁美、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：川崎病類似マウス系統動脈炎モデルにおけるヒト免疫グロブリンの治療効果の検討。第40回日本小児循環器学会総会、東京、2004.06
 7. Oharaseki T, Yokouchi Y, Wakayama M, Yamada H, Miura N, Ohno N, Naoe S, Takahashi K: Time-course of changes in histopathology of experimental vasculitis mimicking arteritis in Kawasaki disease. 8th International Kawasaki Disease Symposium. San Diego, U.S.A, 2005.02.

- | | |
|---|--|
| <p>8. Oharaseki T, Kameoka Y, Kura F, Yokouchi Y, Yamada H, Suzuki K, Naoe S, Takahashi K: Chromosomal localization of coronary arteritis-susceptible genes in experimental model of Kawasaki disease. 8th International Kawasaki Disease Symposium. San Diego, U.S.A, 2005.02.</p> <p>9. ○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</p> <p>10. ○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</p> <p>11. ○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</p> <p>12. ○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</p> | <p>む)</p> <p>1. 特許取得
なし</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
特記事項なし</p> |
|---|--|

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究

分担研究者 新井孝夫 東京理科大学理工学部教授

協力研究者 大内 敬 東京理科大学理工学部助手（2003 年度）

黒岩憲二 東京理科大学理工学部助手（2004-5 年度）

研究要旨:MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製を目標に、細胞レベルで治療効果を評価する系の確立のための基礎研究と MPO 上の血管炎発症のリスクエピトープに対するモノクローナル抗体の作製を行った。はじめに、細胞レベルでの評価系のモデル実験として、細胞増殖を阻害するモノクローナル抗体を細胞内に導入して、その効果を調べる系の確立を試みた。その結果、ポリカチオン性脂質をもちいたモノクローナル抗体の細胞内導入により、増殖阻害効果を評価する系が確立できた。次に、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を作製した。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に対する抗体の多くは強い結合活性を示した。

A. 研究目的

前身の「人工ポリクローナル Fv グロブリン製剤の開発に関する研究」の3年間において、抗 MPO マウスモノクローナル抗体を多数作製し、カチオン性リポソームを用いたモノクローナル抗体導入法をスクリーニングに適用するなどの成果をあげた。これらの成果に立って、「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」における3年間は、MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製を目標に、細胞レベルで治療効果を評価する系の確立のための基礎研究と MPO 上の血管炎発症のリスクエピトープに対するモノクローナル抗体の作製を行った。

近年、動物愛護のために動物使用の代替法確立の必要性が言われている。リスクエピトープに対する抗体の血管炎誘導能を細胞レベルで評価する場合、抗体を生きている細胞内に導入する必要がある。そこで、前身のプロジェクトで確立したポリカチオン性脂質をもちいたモノクローナル抗体の細胞内導入法を適用し、抗チューブリン抗体の細胞増殖阻害能を評価する系の開発を試みることにした。

MPO-ANCA 血管炎のリスクエピトープは、MPO 中のそれぞれ 63、69、82 アミノ酸残基からなる Ha、Hb、Hg の3つの領域に存在すると言われている。そこで、これらの領域に相当するペプチドを免疫原として、血管炎の発症を引き起こすモノクロー

ナル抗体の作製を行った。

B. 研究方法

1. リポソーム法による抗体の細胞内導入

はじめに、モノクローナル抗体とカチオン性脂質リポフェクトアミン (1%) を導入溶液 OPTI-MEN 中で室温、1時間混合した。次に、繊維芽細胞株 3Y1 細胞を OPTI-MEN で洗浄後、モノクローナル抗体・リポフェクトアミン混合液を加え、炭酸ガスインキュベーター中 (37°C, 5% CO₂) で1時間反応させた。さらに2日間培養したのち、導入した抗体による増殖阻害を細胞数カウティングキットにより調べた。

2. MPO のリスクエピトープペプチドの合成

Ha 領域については、3つのシステイン残基を除外し、それぞれ、8、24、25 残基からなるペプチド A (4-11)、ペプチド A (14-37)、ペプチド A (39-63) を化学合成した。また、Hb 領域については 47 と 22 残基からなるペプチド B (1-47) とペプチド B (48-69) を、Hg 領域については 39 と 43 残基のペプチド G (1-39) とペプチド G (40-82) を、それぞれ合成した (図 1)。さらに、これら 7 ペプチドは KLH と結合した。

3. モノクローナル抗体の作製とスクリーニング

合成したペプチドをマウスに免疫し、作製されたハイブリドーマの作製培養上清のペプチド結合能を、KLH-ペプチドを固定したプレートをもちいた ELISA により測定した。また、MPO-ANCA 活性は、リコンビナントマウス MPO を固定したプレートをもちいた ELISA 法により測定した。

(倫理面への配慮)

実験動物の動物愛護上の配慮は、本大学実験施設の指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. 抗チューブリン抗体の細胞増殖阻害能を評価する系の確立

抗 α -チューブリン抗体 D2D6 は、ウニ卵にマイクロインジェクション法で導入した場合、その卵割を阻害することが知られている。D2D6 と卵割を阻害しない抗 β -チューブリン抗体 E1 をカチオン性脂質法により 3Y1 細胞に導入し、その増殖阻害効果を調べたのが図 2 である。この図は、D2D6 は増殖阻害するのに対し、E1 は阻害しないことを示している。すなわち、抗体の細胞増殖阻害能を評価する系が確立できた。

2. MPO のリスクエピトープに対するモノクローナル抗体の作製

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。