

## 人工ガンマグロブリン開発のための *in vitro* 評価系の検討

研究分担者 大野尚仁 東京薬科大学 教授

**研究要旨：**免疫グロブリン製剤（IVIG）は臨床で重症感染症における抗生物質との併用、特発性血小板減少性紫斑病、ギランバレー症候群、川崎病の急性期などの疾患に使用されている。その作用機序は様々な角度から解析されているがまだ不明な点が多い。また、重合化した IgG の重要性を示唆する報告もある。本研究では、固相化 IVIG を作成してヒト末梢血単核球（Peripheral Blood Mononuclear Cell : PBMC）を刺激しサイトカイン産生について検討した。その結果、IL-8、TNF- $\alpha$  産生は固相化 IVIg の容量依存的に上昇した。さらに、マルチプレックスで 17 種のサイトカインを測定したところ、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、MIP-1 $\beta$  などの産生が観察された。さらに LPS を添加したところ、ほとんどのサイトカインの産生量は上昇し、固相化 IVIg の容量依存的であったが、IL-10、MCP-1 の産生は固相化 IVIg によって抑制された。これらの結果から、固相化 IVIg は PBMC からのサイトカイン産生に変化を与えることが明らかとなった。

### A. 研究目的

近年、免疫グロブリン製剤（IVIg）は臨床でますます需要が高まっており、人工 IVIg の開発に期待が寄せられている。作成した人工 IVIg の活性を評価するために、ヒト PBMC を用いて既存の IVIg による活性化を *in vitro* で測定し、その評価系を検討した。IVIg の作用機序は様々な角度から解析されており、自己抗体の中和、サイトカインの機能修飾、補体の抑制などを介して抗炎症作用を示すのではないかと考えられているが、まだ不明な点が多く残されている。IVIg の活性の一つに、重合化した IgG の重要性を示唆する報告がある。そこで本研究では、固相化 IVIG を作成して PBMC を刺激しサイトカイン産生について検討した。

### B. 研究方法

#### 1. IVIg のプレートへの吸着量測定

IVIG を段階希釈し、マルチウェルプレートに添加し、4°C で overnight し固相化した（固相化 IVIg）。十分に水で洗浄し、液相を完全に除去し、BCA protein assay で吸着量を測定した。

#### 2. ヒト末梢血単核球（PBMC）の固相化 IVIG によるサイトカイン産生測定のための至適条件の検討

IVIg を希釈し、マルチウェルプレートに添加し、4°C で overnight し固相化した。これらの well に  $1 \times 10^6$  cells/mL に調整した PBMC を加え、37°C インキュベーターで培養した。LPS で刺激をするときは、PBMC を添加して 30 分後に行った。上清を回収し、

ELISA で IL-8、TNF- $\alpha$  を測定した。

### 3. Bio-Plex を用いたサイトカイン・ケモカインの網羅的解析

固相化IVIgによるPBMCからのサイトカイン・ケモカイン産生をBio-Plexにより定量した。

## C. 研究結果

### 1. IVIgのプレートへの吸着量測定

#### 1) 種々のプレートへの吸着量の測定

IVIgのプレートへの吸着量を比較するため、5種類のプレートにIVIgを段階希釈して添加し、検討した。その結果、BM社以外のプレートは、IVIgの吸着量はほとんど同程度であった(図1)。そこで以降の実験にはSUMILON Fを使用することとした。

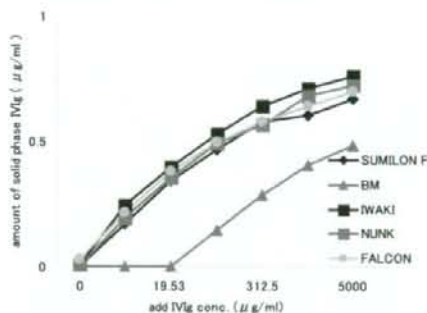


図1 各種プレートへのIVIg吸着量の比較

#### 2) IVIg希釈溶媒の検討

IVIgをプレートに効率よく吸着させるために希釈する溶媒のpHについて検討した。その結果、pH6、7、8では吸着量に差はなかった(図2)。次に、リン酸緩衝液とアルギニン水溶液、PBSでIVIgを希釈して比較したところ、リン酸緩衝液で希釈したものの吸着量が著しく高かった(図3)。

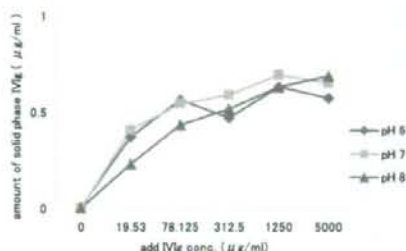


図2 IVIgを希釈する溶媒のpHの違いによるプレートへの吸着量の比較

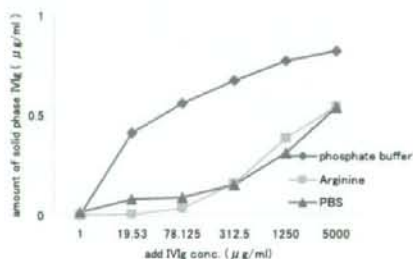


図3 IVIgを希釈する溶媒の違いによるプレートへの吸着量の変化

### 2. ヒト末梢血単核球(PBMC)の固相化IVIgによるサイトカイン産生測定のための至適条件の検討

#### 1) IVIgによる全血培養上清へのIL-8、TNF- $\alpha$ 産生の経時変化

全血培養にIVIgを添加(final 0, 5, 500  $\mu$ g/ml)し、さらに final 1ng/ml のLPSで刺激し上清中へのIL-8、TNF- $\alpha$ の産生量を経時的に観察した。その結果、IL-8産生量はLPSの有無に関わらず48時間まで経時的に増加したが、TNF- $\alpha$ 産生量は8~12時間をピークに減少した(図4)。これらの結果より、今後の培養時間を8時間に固定することとした。

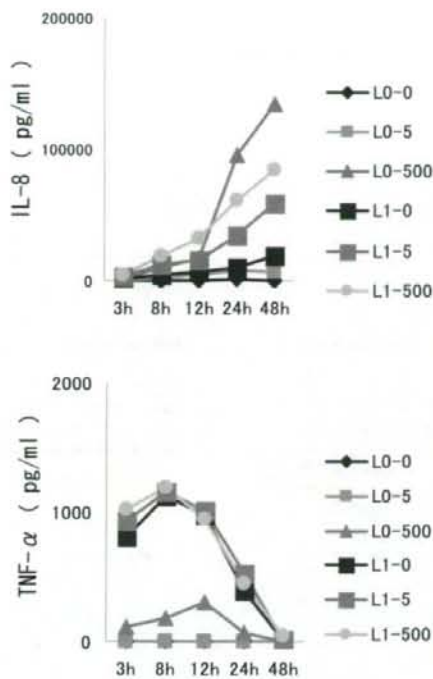


図4 全血細胞培養におけるIVIg刺激でのIL-8、TNF- $\alpha$ 産生の経時変化

## 2) 固相化IVIgによるPBMCからのIL-8、TNF- $\alpha$ 産生の検討

ヒトPBMCを固相化IVIg (Solid phase)あるいはIVIgの添加(Liquid phase)で刺激し、IL-8、TNF- $\alpha$ 産生を観察した。その結果、LPSの刺激の有無に関わらずIVIgの添加でのIL-8の産生誘導はほとんど観察されなかった。TNF- $\alpha$ 産生も、IVIgの添加ではLPS刺激の高濃度添加でのみ観察された。一方で、固相化したIVIgはIL-8、TNF- $\alpha$ ともにIVIgの容量依存的に著しく産生量が上昇した。LPSを添加するとそれらの産生量はさらに増加した(図5)。

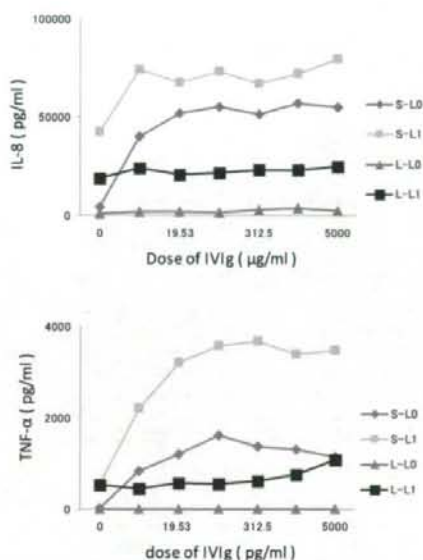


図5 IVIg添加あるいは固相化IVIgのヒトPBMC刺激によるIL-8、TNF- $\alpha$ 産生の検討

## 3) 固相化AlbuminによるPBMCからのIL-8、TNF- $\alpha$ 産生

固相化IVIgのIL-8、TNF- $\alpha$ 産生誘導がIVIgによるものであることを確認するため、albuminをIVIgと同様にプレートに吸着させて固相化albuminを作成し、PBMCからのIL-8、TNF- $\alpha$ 産生誘導を検討した。その結果、albuminもIVIgと同様にプレートに吸着したが、PBMCを添加してもIL-8、TNF- $\alpha$ の産生は観察されなかった(図6)。

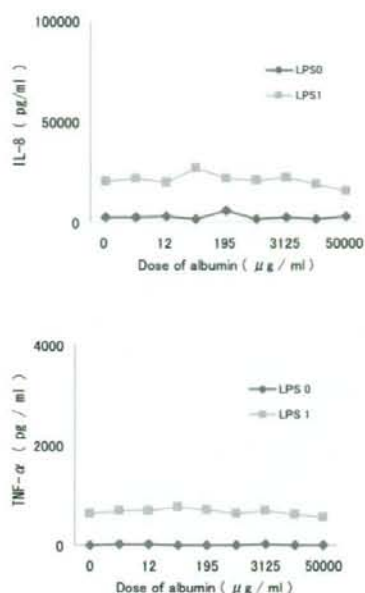


図6 固相化アルブミンのヒトPBMC刺激によるIL-8、TNF- $\alpha$ 産生の検討

### 3. Bio-Plexを用いたPBMCからのサイトカイン・ケモカインの網羅的解析

前述の結果より、固相化IVIgによるPBMCからのIL-8、TNF- $\alpha$ 産生誘導が観察できる培養条件を用いて、Bio-Plexで17種のサイトカインを網羅的に測定したところ、固相化IVIgにより産生が誘導されないもの(IL-2、IL-4など)、固相化IVIgの容量依存的に産生が観察されるもの(IL-1 $\beta$ 、IL-6など)、検出限度を超えるほど著しい産生が観察されるもの(IL-8、MIP-1 $\beta$ など)の3群に分けることができた。さらにLPSを添加したところ、ほとんどのサイトカインの産生量は上昇し、固相化IVIg容量依存的であったが、IL-10、MCP-1の産生は固相化IVIgによって抑制された。これらの結果から、固相化IVIgはPBMCからのサイトカ

イン産生に変化を与えることが明らかとなった(Fig. 7)。

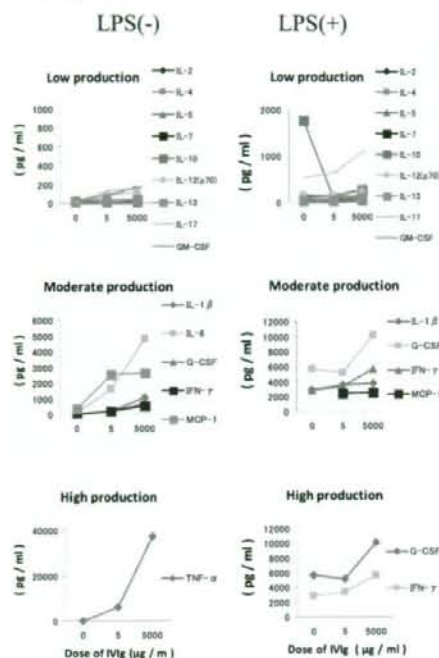


図7 Bio-Plexを用いたPBMCからのサイトカイン・ケモカイン産生の網羅的解析

### D. 考案

IVIgは、重症感染症や、川崎病などの治療に使用され、効果を挙げている。現在のIVIgはヒト血液由来であり、その供給量や感染性に問題を残している。これらのことから、IVIgの人工化には大きな期待が寄せられている。一方で、現在使用されているIVIgの作用機序は様々な角度から解析されており、自己抗体の中和、サイトカインの機能修飾などのほか、樹状細胞の成熟や機能を修飾、Fc $\gamma$ Rsの活性化を抑制、などを介して抗炎症作用を示すのではないかと考えられているが、まだ不明な点が多く残されている。

今回検討した IVIg の固相化によるヒト PBMC への作用は、IVIg を添加で加えた場合と比較すると、IL-8、TNF- $\alpha$  産生量に大きな変化が観察された。さらに、網羅的に検討することで、IL-1 $\beta$  や IL-6 などの炎症性サイトカインもまた固相化 IVIg によって誘導されることが明らかとなった。さらに、LPS の添加時に IVIg により産生量が低下するサイトカイン・ケモカインも観察された。このような活性も IVIg の活性のひとつとして重要なものであると考えられ、今後、人工 IVIg との比較を行っていきたい。

## E. 結論

IVIg を固相化することにより、ヒト PBMC における *in vitro* での活性を感度良く評価することができた。人工 IVIg の活性も同様にして観察することで、その評価ができるものと期待する。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Tada R, Nagi-Miura N, Adachi Y, Ohno N., The influence of culture conditions on vasculitis and anaphylactoid shock induced by fungal pathogen *Candida albicans* cell wall extract in mice, *Microb Pathog.*, 44(5): 379-88 (2008).

2) Nagi-Miura N, Adachi Y, Ohno N., Coronary arteritis induced by CAWS (*Candida albicans* water-soluble fraction) in various strains of mice, *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.*, 49(4):

287-92 (2008).

3) Harada T, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N., Highly expressed dectin-1 on bone marrow-derived dendritic cells regulates the sensitivity to beta-glucan in DBA/2 mice, *J Interferon Cytokine Res.*, 28(8): 477-86 (2008).

## 2. 学会発表

### 国際会議

(1) Ohno N., influence of culture conditions on vasculitis and anaphylactoid shock induced by cell wall extracts of *Candida albicans* in mice, International Conference Regulation of Inflammatory Diseases -Vasculitis and Asthema- 2008 in Chiba, Chiba, 2008

(2) Ohno N., Miura N., Nagao T., Uno K., Suzuki K., Analysis of synthetic immunoglobulin by *in vivo* and *in vitro* cell culture, International Conference Regulation of Inflammatory Diseases -Vasculitis and Asthema- 2008 in Chiba, Chiba, 2008

### 国内会議

(1) 高野雄介, 河内美穂, 三浦典子, 安達禎之, 塙晴雄, 相澤義房, 鈴木和男, 大野尚仁, IL-10 遺伝子導入による CAWS 血管炎の治療, 第 14 回 MPO 研究会, 東京, 2008

(2) 石橋健一, 三浦典子, 安達禎之, 大野尚仁, *Candida* 細胞壁多糖活性化ヒト白血球における遺伝子発現解析, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 2008

(3) 高野雄介, 三浦典子, 安達禎之, 塙晴雄, 相澤義房, 鈴木和男, 大野尚仁, CAWS 血管炎に対する IL-10 の影響, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学大会合同大会, 神戸, 2008

- (4) 山本 歩, 三浦維子, 三浦典子, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁, 免疫グロブリン製剤による PBMC からのサイトカイン産生の解析, 第 80 回東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会, 東京, 2008
- (5) 山本 歩, 三浦 維子, 三浦 典子, 石橋健一, 安達禎之, 長尾朋和, 別府正敏, 鈴木和男, 大野尚仁, 固相化免疫グロブリン製剤による PBMC からのサイトカイン産生の解析, 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009
- (6) 三浦典子, 駒井元彦, 高野雄介, 三川浩輝, 安達禎之, 亀岡洋祐, 鈴木和男, 大野尚仁, CAWS 血管炎発症制御因子の検討, 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009

#### 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

## 免疫グロブリンの *in vitro* での評価法の検討

### —活性化血管内皮細胞への作用—

研究分担者：長尾朋和 千葉大学大学院医学研究院 特任講師  
研究代表者：鈴木和男 千葉大学大学院医学研究院 特任教授  
研究分担者：山本健二 国立国際医療センター 国際臨床研究センター長  
研究分担者：河内正治 国立国際医療センター 部長

#### 協力：

流動研究員：常賀 千葉大学大学院医学研究院 流動研究員

研究分担者：大野尚仁 東京薬科大学 教授

研究分担者：宇野賀津子 ルイ・パストゥール医学研究センター 室長

**研究要旨：**マウス型に加え、ヒト型人工ガンマグロブリンのプロトタイプの実験に成功した。ヒト型人工ガンマグロブリンの臨床応用に向け、そのプロトタイプおよび免疫グロブリン療法(IVIg)に使われている免疫グロブリンを用いて、体外評価法開発のための *in vitro* での評価法を検討した。本分担では、血管炎での IVIg 治療の有効性が活性化した血管内皮細胞の抑制にあると推定し、培養血管内皮細胞への IgG 添加による傷害抑制作用を *in vitro* で解析した。anti-MPO 抗体、TNF- $\alpha$  あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で血管内皮細胞を刺激・活性化・傷害し、その adhesion molecules、炎症性 cytokines/chemokines の発現と IgG によるその抑制作用を解析した。TNF- $\alpha$  あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって誘導される adhesion molecules(ICAM-1,VCAM-1,E-selectin)、IL-6、IFN- $\beta$ 、chemokines KC、MIP-2 の mRNA 発現は、IgG によって有意に抑制された。これらの結果から、IgG が活性化状態の血管内皮細胞の adhesion molecules、炎症 cytokines/chemokines の産生の抑制は、IVIg による血管炎治療効果の評価指標となり、また、作用機序の一つと考えられる。本法により、*in vitro* でのガンマグロブリンの評価法と作用機序の解析への応用が可能となった。

#### A. 研究目的

血管炎、リウマチなどの難治性疾患への初期治療として免疫グロブリン製剤治療の必要性が増しており、免疫グロブリンの人工化が望まれている。そこで、本研究では、今後の人工化免疫グロブリンの臨床応用に向け、川崎病、血管炎や腎炎における IVIg 治療による臨床結果の成績を基に、*in vitro* での体外評価法を開発し、臨床での治療効果判定・評価に利用できることを目的とした。

これまで、anti-MPO 抗体が糸球体血管内皮

細胞への作用、Bio-Plex 法による多項目のサイトカイン・ケモカインの評価系およびヒト末梢血リンパ球の増殖能、単球の安定化、好中球脱顆粒、活性酸素産生をはじめとする評価系を検討してきた。

本年度は、血管炎での IVIg 治療の有効性が、活性化した血管内皮細胞の抑制にあると推定し、培養血管内皮細胞への IgG 添加による傷害抑制作用を *in vitro* で解析することとした。具体的には、anti-MPO 抗体、TNF- $\alpha$  あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で血管内皮細胞を刺激・活性化・傷害し、

その adhesion molecules、炎症性 cytokines/chemokines の発現と IgG によるその抑制作用を解析した。これにより、IgG による活性化状態の血管内皮細胞の adhesion molecules、炎症 cytokines/chemokines の産生の抑制が、人工 IgG および IVIg による血管炎治療効果の評価指標となることを検討する。

## B. 研究方法

### 1) TNF- $\alpha$ によって誘導される adhesion molecules の発現の解析:

血管内皮細胞を TNF- $\alpha$  で 10 分間処理後、2 時間培養し、細胞の活性化状態を、細胞内の adhesion molecules: E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA の発現を PCR、リアルタイム RT-PCR、解析した。

### 2) IgG 作用: TNF- $\alpha$ により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現への IgG の作用の解析:

血管内皮細胞を TNF- $\alpha$  で 10 分間処理後、2 時間培養し、細胞の活性化状態を IgG を 10 分間前処理し、E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA の発現を PCR、リアルタイム RT-PCR、解析した。

### 3) IgG 作用: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への IgG の作用:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加して血管内皮細胞を刺激し、細胞の VCAM-1, E-selectin, ICAM-1 の発現および IgG によるその発現への作用を解析した。

### 4) IgG 作用: TNF- $\alpha$ によって誘導・産生される培養上清中のサイトカイン、ケモカインの IgG による抑制

TNF- $\alpha$  で血管内皮細胞を 8-24 時間刺激し、そのときの接着分子、サイトカイン、ケモカインの蛋白質の発現、産生を Cell-ELISA、ELISA、BioPlex を用いて解析した。また、TNF- $\alpha$  で血管内皮細胞を刺激したときの接着分子、サイトカイン、ケモカインの蛋白質の発現、産生を IgG によるその発現への作用を解析した。

(倫理面での配慮)

動物実験に関しては、千葉大学動物実験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

### 1) TNF- $\alpha$ によって誘導される adhesion molecules の発現の解析

血管内皮細胞を TNF- $\alpha$  で刺激し、Adhesion molecules である E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA の発現を解析した。その結果、TNF- $\alpha$  により、これら Adhesion Molecules の発現は、いずれも上昇した。また、TNF- $\alpha$  の処理のタイミングによる E-selectin, VCAM, ICAM-1 の上昇の差はほとんど認められなかった(図1)。

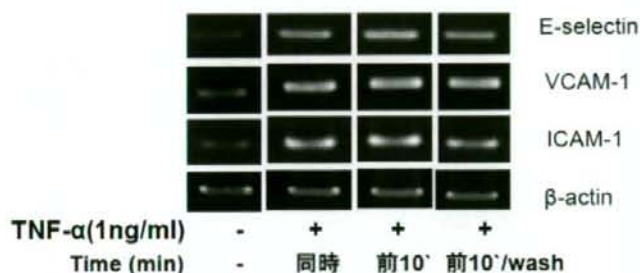


図1. TNF- $\alpha$  誘導の E-selectin, VCAM-1, ICAM-1 の発現

### 2) IgG 作用: TNF- $\alpha$ により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現への IgG の作用の解析

TNF- $\alpha$  で血管内皮細胞を刺激したときの接着分子、サイトカイン、ケモカインの発現をリアルタイム PCR で解析した結果、GM-CSF、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、KC、MCP-1、IFN  $\beta$ 、IL-6 の発現が上昇した。また、IgG 処理により、発現が抑制されたサイトカイン・ケモカインは、とりわけ、GM-CSF、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、KC、IFN  $\beta$ 、IL-6 は、IgG 濃度依存的に強く抑制された。



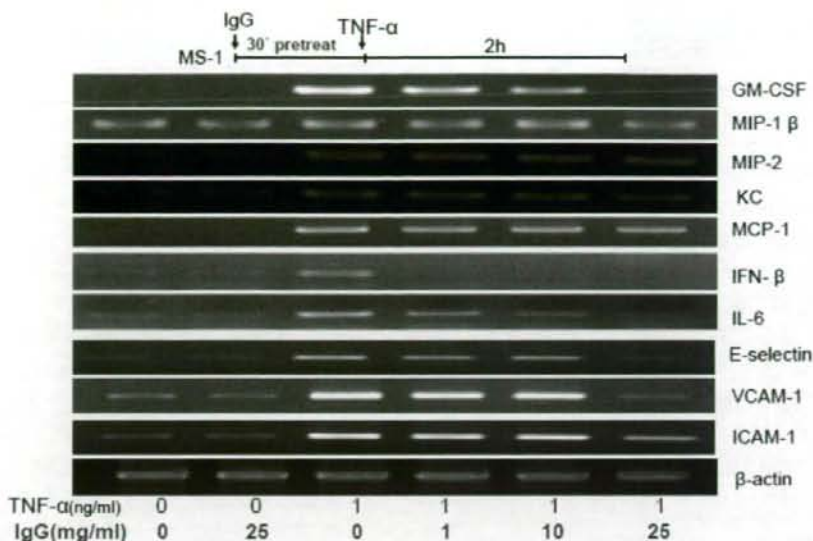


図2. IgGによるTNF-αによって誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現の抑制

3) IgG 作用 : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現へのIgGの作用:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加して血管内皮細胞を刺激し、細胞の VCAM-1, E-selectin, ICAM-1 の発現および IgG によるその発現への作用を解析した。その結果、いずれの adhesion molecules も IgG により抑制された。また、MIP-1β、MIP-2、KC、

MCP-1、IFN β、IL-6 の発現が上昇した。また、IgG 処理により、発現が抑制されたサイトカイン・ケモカインは、MIP-1β、MIP-2、KC、MCP-1、IFN β、IL-6 に見られたが条件によりその作用は弱い場合があった。しかし、MIP-2、IFN β、IL-6 の発現の抑制は、顕著であった。

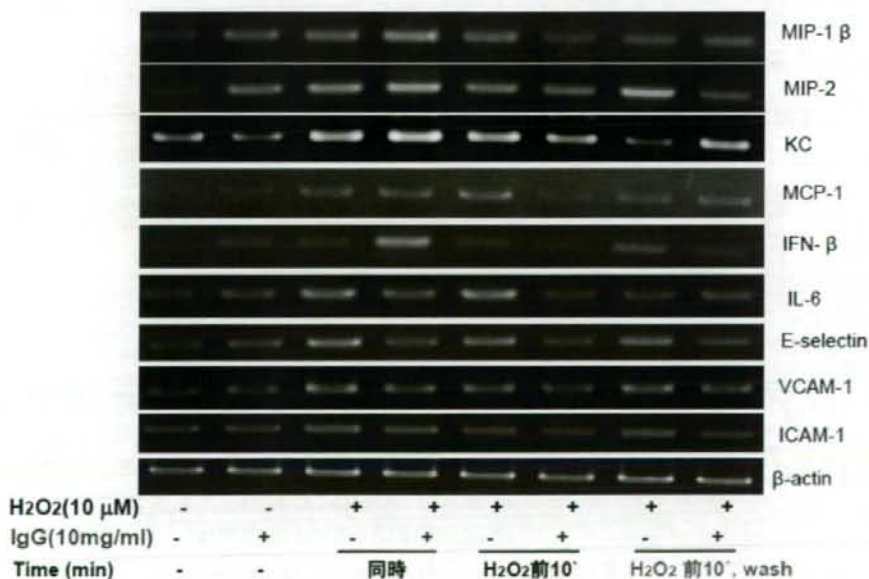


図3. IgGによるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>誘導の adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への作用

#### 4) TNF- $\alpha$ により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への IgG の作用の解析

TNF- $\alpha$ で血管内皮細胞を刺激、そのときの接着分子、サイトカイン、ケモカインの産生を ELISA、Bioplex を用いて解析した。その結果、Bio-Plex で顕著に影響が見られたサイトカイン・ケモカインのうち、KC、MCP-1、TNF $\alpha$  を ELISA にて確認した。MCP-1 は、高濃度の IgG では上昇したものの、これらのサイトカイン・ケモカインは、IgG 処理により培養上清中の濃度は、減少した (図 4)。これらの効果は、IgG 中に含まれる特異抗体によることがわかった (data not shown)。

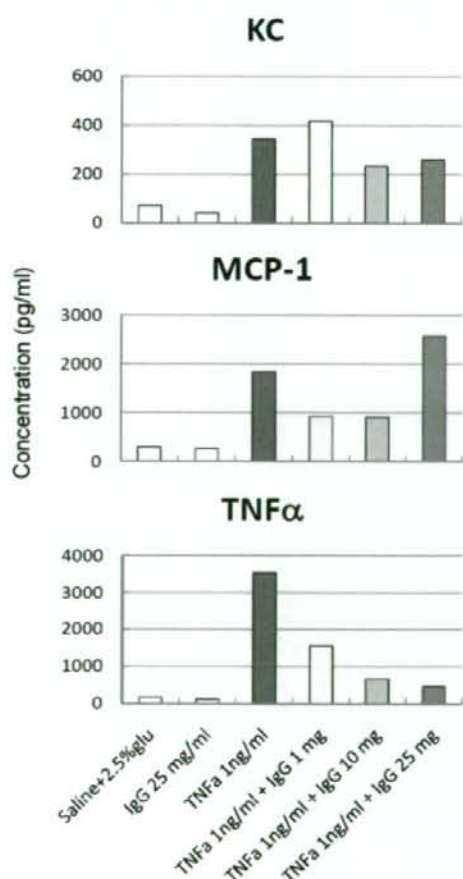


図4. IgG 処理による TNF- $\alpha$ 誘導血管内皮細胞培養上清中のサイトカイン、ケモカイン濃度の減少

以上の結果から、TNF- $\alpha$ あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって活性化される血管内皮細胞を抑制する IgG の作用が認められた。

#### D. 考察

これまで作製してきたマウス型人工グロブリンの有効性の予備成績を基に、ヒト型の作製しプロトタイプは出来た。今後の臨床応用に向け、*in vitro*での体外評価法を臨床評価に利用できる方法を検討した。1) TNF- $\alpha$ によって誘導される adhesion molecules の発現を解析し、adhesion molecules の E-selectin, VCAM, ICAM-1 の mRNA の発現を解析できた。2) TNF- $\alpha$ により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への IgG の作用を検討し、接着分子、サイトカイン、ケモカインの発現をリアルタイム RT-PCR、ELISA、Bioplex を用いて解析できた。また、3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への IgG の作用については、VCAM-1, E-selectin, ICAM-1 やサイトカイン、ケモカインの発現をしらべ、IgG の作用の解析法としても利用できる可能性を示した。さらに、4) TNF- $\alpha$ によって誘導・産生される培養上清中のサイトカイン、ケモカインも IgG によって抑制を解析できることがわかった。

以上から、免疫グロブリンの血管内皮細胞への活性化抑制作用の分子解析により、*in vitro*での評価系を確立する方向が示された。特に、炎症の指標として、TNF- $\alpha$ や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって血管内皮細胞を活性化し、ICAM-1, VCAM, E-selectin やサイトカイン、ケモカインの発現・産生を人工ガンマグロブリンや IgG によって抑制されるかを調べることが可能となった。これらの評価法は、血管炎治療効果の判定に向けた開発につながる事が期待できる。

#### E. 結論

体外評価法開発のための *in vitro*での評価法を検討した。培養血管内皮細胞の傷害に対する IgG による抑制 (修復) 作用を *in vitro*で解析する方法を検討した。anti-MPO 抗体、TNF- $\alpha$  あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で血管内皮細胞を刺激・活性化・傷害し、その adhesion molecules、炎症性 cytokines/chemokines の発現と IgG によるその抑制作用を解析した。TNF- $\alpha$ あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって誘導される adhesion molecules(ICAM-1,VCAM-1,E-selectin)、IL-6, IFN- $\beta$ , chemokines KC, MIP-2 の mRNA 発現

は、IgG によって有意に抑制された。1) TNF- $\alpha$  によって誘導される adhesion molecules の発現を解析し、adhesion molecules の E-selectin, VCAM, ICAM-1 の mRNA の発現を解析できた。2) TNF- $\alpha$  により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への IgG の作用を検討し、接着分子、サイトカイン、ケモカインの発現をリアルタイム RT-PCR、ELISA、Bioplex を用いて解析できた。また、3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により誘導される adhesion molecules、サイトカイン、ケモカインの発現への IgG の作用については、VCAM-1, E-selectin, ICAM-1 やサイトカイン、ケモカインの発現をしらべ、IgG の作用の解析法としても利用できる可能性を示した。さらに、4) TNF- $\alpha$  によって誘導・産生される培養上清中のサイトカイン、ケモカインも IgG によって抑制を解析できることがわかった。

これらの結果から、IgG が活性化状態の血管内皮細胞の adhesion molecules、炎症 cytokines/chemokines の産生の抑制は、IVIg による血管炎治療効果の評価指標となり、また、作用機序の一つと考えられる。本法により、*in vitro* でのガンマグロブリンの評価法と作用機序の解析への応用が可能となった。

#### 協力研究者

新井孝夫 (東京理科大学・教授)  
 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)  
 三浦典子 (東京薬科大学・講師)  
 鈴木章一 (オタゴ大学・客員研究員)

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Y. Yasuda, T. Shimoda, K. Unoa, N. Tateishi, S. Furuya, K. Yagi, **K. Suzuki**, S. Fujita. The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes and cytokine/chemokine levels in different mice strains. *J. Neuroimmunology*. in press.
2. T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Kobayashi, K. Uno, N. Tamura, Y. Yamanishi, A. Fukatsu, R. A. Watts, D.G.I. Scott, D. R.W. Jayne, **K. Suzuki**, H. Hashimoto. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm

antibodies available in Japan and Europe. *Clin. Exp. Rheumatol.* in press.

3. R. A. Watts, D.G.I. Scott, D.R.W. Jayne, T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Fujimoto, Y. Harabuchi, S. Kobayashi, **K. Suzuki**, H. Hashimoto. Renal Vasculitis in Japan and UK - are there differences in epidemiology? *Nephrol. Dialysis Transplant*. 23(12):3928-3931, 2008.
4. S. Kobayashi, A. Ito, D. Okuzaki, H. Onda, N. Yabuta, I. Nagamori, **K. Suzuki**, H. Hashimoto and H. Nojima. Expression profiling of PBMC-based diagnostic gene markers isolated from vasculitis patients. *DNA Research* 15(4):253-265, 2008(Aug).
5. A. Mabuchi, T. Nagao, O. Koshio, T. Ishiwata, A. Yano, **K. Suzuki**, K. Yokomuro, A.M. Wheatley. Role of F4/80+Mac-1<sup>high</sup> adherent non-parenchymal liver cells in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology Res.* 38:1040-1049, 2008(Oct).
6. A. Hoshino, T. Nagao, N. Nagi-Miura, N. Ohno, M. Yasuhara, K. Yamamoto, T. Nakayama, **K. Suzuki**. MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils *in vitro* via classical complement pathway-dependent manner. *J. Autoimmunity* 31:79-89, 2008.
7. Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Matsumoto M, Kawachi S, Oshima M, Yamamoto K, **Suzuki K**. Preparedness for the spread of influenza: prohibition of traffic, school closure, and vaccination of children in the commuter towns of Tokyo. *J Urban Health* 85(4):619-635, 2008.
8. Nguyen T. L., N. Nakajima, Phuc P., Y. Sato, Hoang N. T., Pham V.H., Luong T.S., H. Katano, T. Kumasaka, T. Oka, S. Kawachi, T. Matsushita, T. Sata, K. Kudo, **K. Suzuki**. H5N1-infected cells in lung with diffuse alveolar damage in exudative phase from a fatal case in Vietnam. *Jpn. J. of Infectious Dis.* 61: 157-160, 2008.
9. Y. Ogasawara, H. Kaya, G. Hiraoka, F. Yumoto, S. Kimura, Y. Kadota, H. Hishinuma, E. Senzaki, S. Yamagoe, K. Nagata, M. Nara, **K. Suzuki**, M. Tanokura, K. Kuchitsu. Synergistic Activation of Arabidopsis NADPH Oxidase AtrbohD by

Ca<sup>2+</sup> and Phosphorylation, J. Biol. Chem. 283:8885-8891, 2008.

10. Xiao G, Miyazato A, Inden K, Nakamura K, Shiratori K, Nakagawa K, Miyazawa T, **Suzuki K**, Kaku M, Kawakami K. *Cryptococcus neoformans* inhibits nitric oxide synthesis caused by CpG-oligodeoxynucleotide-stimulated macrophages in a fashion independent of capsular polysaccharides. Microbiol Immunol. 52:171-179, 2008.
11. Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, Hatta M, Inden K, Aoyagi T, Shiratori K, Takeda K, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, **Suzuki K**, Fujita J, Kaku M, Kawakami K. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. J Immunol. 15:4067-1074, 2008..

## 書籍

1. **鈴木和男** 人工ガンマグロブリン製剤の開発の現状 ファルマシア 45: 17-22, 2009年1月
2. **鈴木和男** 特集—感染症防御・慢性疾患の初期機構—総論「好中球の機能」『細胞』41: 48-50, 2009年2月
3. 長尾朋和、**鈴木和男** 特集—感染症防御・慢性疾患の初期機構—「好中球機能異常による血管炎・腎炎」『細胞』41: 60-63, 2009年2月
4. **鈴木和男** 感染症を抑え込め：大規模予測モデル「感染症の脅威：パンデミックへの備えは万全か」日経サイエンス別冊 163, pp38-46, 2008年11月
5. **鈴木和男** シミュレーションによる感染症の対策支援「感染症の脅威：パンデミックへの備えは万全か」日経サイエンス別冊 163, pp38-46, 2008年11月
6. 長尾朋和、**鈴木和男** ANCA をめぐる基礎的研究の進歩 呼吸器科 14 巻 pp348-354, 2008Oct.

## 2. 学会発表

### 【国内学会】

1. **鈴木和男** 感染と血管炎を結ぶ機序 第32回日本腎臓学会東部学術集会 2008年10月11-12日 東京
2. 鄒軍、志賀由佳、**鈴木和男**、ARDS 病態モデルの肺組織傷害に連動するサイトカインストーム開始時の TNF- $\alpha$  の役割 第14回 MPO 研

究会 2008年10月24-25日 東京

3. 常賀、**鈴木和男**、In Vitro におけるIVIg治療の作用機序解析 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
4. 宇野賀津子、**鈴木和男**、MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者、健康人の血漿中サイトカイン・ケモカインと IFN- $\alpha$  産生能の比較 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
5. 亀岡洋祐、**鈴木和男** MPO リーダーペプチドは活性制御に関与するかII 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
6. 長尾朋和、**鈴木和男**、MPO-ANCA による糸球体血管内皮細胞の好中球走化性因子の発現 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
7. 富澤一夫、**鈴木和男**、SCG/Kj マウスにおける MPO-ANCA リスクエピトープと CD24+CD41+の発現について 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
8. 楠怜奈、**鈴木和男**、SCG/Kj mice に対する 15-deoxyspergualin 治療による CD3+B220+CD69+細胞の減少 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
9. **鈴木和男** 好中球 Myeloperoxidase ホモログと川崎病 第14回MPO研究会 2008年10月24-25日 東京
10. 常賀、**鈴木和男** QD 標識 TNF- $\alpha$  を使った免疫グロブリン治療の作用解析 第17回バイオイメージング学会 2008年10月30-11月1日 千葉
11. **鈴木和男** わたしたちの体の中を見るバイオイメージングと新技術—からだの中をみるバイオイメージング 第17回バイオイメージング学会 2008年10月30-11月1日 千葉
12. **鈴木和男** バイオイメージングと「化学工学」の融合学理：2002年から未来への橋渡し—めざしてきたもの 第17回バイオイメージング学会 2008年10月30-11月1日 千葉
13. 常賀、長尾朋和、鄒軍、中山俊憲 **鈴木和男** In vitro におけるIVIg治療の作用機序解析と判定法の確立 第38回日本免疫学会 2008年12月1-3日 京都
14. Tomizawa Kazuo, Nagao Tomokazu, Ohshima Maamichi, Kobayashi Kazuo, Suzuki Kazuo MPO-ANCA specific IgG2b subclass decrease by treatment with 15-Deoxyspergualin in SCG/Kj mice 第38回日本免疫学会 2008年12月1-3日 京都
15. 楠怜奈、長尾朋和、中山俊憲、**鈴木和男** Reduction of CD3+B220+CD69+ cell population by treatment with 15-deoxyspergualin SCG/Kj mice 第38回日

本免疫学会 2008年12月1-3日 京都

16. 長尾朋和、荒谷康昭、中山俊憲、鈴木和男  
Secretioneroxidase antibody of neutrophil  
chemotactic factors from glomerular  
endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody  
第38回日本免疫学会 2008年12月1-3日 京都

【国際学会】

1. K. Suzuki Xiamen University Medical School Xiamen University Medical School Meeting (アモイ大学会議) 2008/11/19-20 Xiamen, China
2. K. Suzuki Imaging of Vasculitis 2nd International Symposium for Bioimaging in Queenstown (第二回国際バイオイメージング学会) 2008/11/26-28 Queenstown, New Zealand
3. K. Suzuki Steering Meeting on EUVAS/EULAR Steering Meeting on EUVAS/EULAR 2008/12/1-2 Zurich, Switzerland
4. K. Suzuki Immunomodulatory therapy for vasculitis with synthetic IVIG International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
5. Chang He, K. Suzuki et al Modulation of endothelial cell functions by intravenous immunoglobulin in vitro International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
6. K. Tomizawa, K. Suzuki et al Decreased of Risk Epitopes of MPO-ANCA with Remission: Preliminary Analysis International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
7. S. Kawachi, K. Suzuki, et al. Treatment of severe ARDS (including H5N1-ARDS) with IVIG -From the Cases of NHP-Hanoi- International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)

ブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo

8. S. Kobayashi, K. Suzuki, et al. New consensus, definition, classification and system for diagnosis of vasculitis from EULAR and ACR meeting held in Zurich International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
9. M. Furutani, K. Suzuki, et al. Synthetic polyclonal immunoglobulin International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
10. K. Uno, K. Suzuki, et al. Comparison of plasma cytokine/chemokine levels and IFN- $\gamma$  production capacity amongst healthy subjects, MPO-ANCA nephritis patients, and IgA nephritis patients International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
11. Y. Aratani, K. Suzuki Phagocyte NADPH-oxidase deficiency promotes zymosan-induced acute lung inflammation International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)
12. J. Hirahashi, K. Suzuki et al. Dietary enrichment with eicosapentanoic acid (EPA) prevents antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis International Forum on inflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo)

G. 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

IVIg 療法の有効性の基礎的検討：  
In vitro 評価系の確立と  
MPO-ANCA 腎炎のサイトカイン・ケモカイン動態の特性

研究分担者 宇野賀津子 ルイ・パストゥール医学研究センター基礎研究部室長  
（研究協力者 武曾恵理、猪原登志子 （財）田附興風会北野病院医学研究所）

**研究要旨：** MPO-ANCA 腎炎血管炎に対してγグロブリン（IVIg）療法が有効であることが示されている。人工γグロブリン開発に当たり、その有効性の in vitro 評価系の開発は、必須である。そこで、健常者の全血を培養液にて4倍希釈し、PHAあるいはLPSで刺激、同時にIVIgを添加、産生されたサイトカイン産生へのIVIgの影響を検討した。高濃度のIVIg添加によりIL-2, IL-12p70, IFN-γ, TNF-αのTh1サイトカインのみならず、IL-4, IL-13, IL-5, IL-10のTh2サイトカインの産生も抑制された。特に、IL-10の産生抑制は顕著であった。また、単球と健常人CD4T細胞、抗CD3抗体を用い、単球のT細胞刺激能に対する、IVIgの影響について検討した。その結果高濃度のIVIg添加により、IFN-γ産生は有意に抑制された。

またIVIgの有効性が示されているMPO-ANCA腎炎のサイトカイン・ケモカイン動態の特性を明らかにするために、健常人、IgA腎症患者の血漿中のサイトカイン・ケモカイン27項目（IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF-α, Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1b, PDGF-bb, RANTES, VEGF）を測定した。治療前のMPO-ANCA腎炎患者では、IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1b, PDGF-bb, VEGFが健常人の値に比較して有意に上昇していた。一方、IgA腎症患者では、IL-9, IL-17, PDGF-bbは健常人に比較して上昇、他のサイトカイン・ケモカインは健常人と同レベル、あるいはむしろ低下していた。即ち、IL-17, IL-9, PDGF-bbは腎炎に共通して上昇していたが、他のサイトカイン・ケモカインは、MPO-ANCA腎炎で特異的に上昇していることが明らかとなった。このように多くのサイトカインが血中で上昇しているMPO-ANCA腎炎にたいし、in vitro実験系にてIVIg添加は多様なサイトカイン産生抑制効果を示すことから、患者へのIVIg療法の有効性の作用機作の一つとして考えられた。

**A. 研究目的**

MPO-ANCA 腎炎の治療に大量γグロブリン療

法が有効である事が報告されている。また、人工γグロブリン製剤の開発に期待がもた

れている。しかしながらγグロブリン製剤は特定の抗原に対する単一の製剤ではなく、多様なクローンの抗体が混合した製剤である。従って、その開発にあたっては、適切なクローンの選択のためにも、in vitro 評価系の確立は急務である。そこで、IVIgの有効性のin vitro 評価系の開発を試みた。またあわせて、人工ガンマグロブリンの適用が期待されている、MPO-ANCA 腎炎患者の血漿中サイトカイン・ケモカイン量を、Bio-Plex、27plex Array を用いて測定し、その病態の特性を明らかにし、IVIg 適用の期待される臨床効果について考察した。

## B. 研究方法

### B-1, in vitro 評価系の開発

#### B-1-1, 全血法によるサイトカイン産生能の検討

健常人および、患者から静脈血をヘパリン採血した。より簡単な評価系で、さらには、IVIgの効果が期待できる人と期待できない人の峻別にも利用できる可能性を考え、全血を用いて、測定する系を作製した。即ち採取した血液をそのままイーグル MEM にて、4倍に希釈した。その後、25 μg/ml の PHA を添加 96 穴皿に移して、更に、0.01-10mg/ml の人工γグロブリンを添加、20時間後上清を回収した。

上清中のサイトカイン濃度は、Bio-plex Th1/Th2 array (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF-α, GM-CSF, IFN-γ) を用いて測定した。

#### B-1-2, 単球の抗原提示能に対する IVIg の影響

私たちはこれまでに、単球の状態は、T細胞の IFN-γ 産生でもって評価される抗原

提示能に影響を及ぼし、免疫反応に影響を与える事を、明らかにしてきた。また、MPO-ANCA 腎炎患者に対する IVIg 治療は、単球のレドックス状態を変化させ、結果として亢進した免疫応答を抑制する可能性を検討してきた。そこで、単球の抗原提示能測定系に IVIg を添加し、IFN-γ 産生への影響を検討した。

単球の抗原提示能は、CD14-MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) にて分離した末梢血単球 ( $10^2$ /well)、健常人同様に CD4-MicroBeads にて分離した CD4<sup>+</sup>T細胞 ( $2 \times 10^5$ /200 μl/well)、抗CD3抗体(10ng/ml)を混合して培養、そこへIVIgを添加し、IFN-γ産生への影響を評価した。

#### B-2, MPO-ANCA 腎炎患者のサイトカイン動態の特性の検討

現在、IVIgの有効性が証明されている疾患である、MPO-ANCA 腎炎について、そのサイトカイン動態を明らかにするために、人間ドックの結果を基に、選択した健常人(糖尿病、感染症、肝炎、腎症、自己免疫疾患は除く、n=48)と、北野病院でMPO-ANCA 腎炎と診断された治療前患者(n=28)、IgA 腎症患者(治療前&治療中n=26)の血漿中サイトカイン・ケモカインレベルを Bioplex 27plex array (IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF-α, Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1b, PDGF-bb, RANTES, VEGF) について測定し比較した。

## C. 研究結果

### C-1, in vitro 評価系の開発



### C-1-1, 全血法によるサイトカイン産生能の検討

PHA 20 時間刺激により多くの場合 GM-CSF の産生は、わずかしこ認められなかったが、IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  の産生が認められた。

Th1 サイトカインの結果を図 1 に示す。Th1 サイトカインである IL-2, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  の産生に対し、0.05, 0.5mg/ml の IVIg 添加では、Th1 サイトカイン産生はむしろ亢進するケースも認められたが、5mg/ml の IVIg の添加では、無添加の場合と比較して、各サイトカインの産生は抑制された。

また Th2 サイトカインの結果を図 2 に示した。IL-4, IL-13, IL-5, IL-10 についても Th1 サイトカインと同様、0.05, 0.5 mg/ml の IVIg 添加では無添加時よりサイトカイン産生が亢進するケースも認められたが、5mg/ml の IVIg では、全員のサイトカイン産生の抑制が認められた。特に、IL-10 の産生抑制は顕著であった。また、0.05mg/ml の IVIg 添加で各サイトカインの産生が抑制される人と、より高濃度でないと抑制されない人があることが明らかになった。この測定系で反応性の個人差が検討できるか否かは、今後更なる検討の余地があろう。また 4 倍に希釈した LPS 2  $\mu$ g/ml 刺激サイトカイン産生についても同様に、IVIg の影響について検討した。LPS 刺激については 5mg/ml の IVIg 添加でも産生抑制の認められないサイトカインも数多くあったが、IL-10 産生については 5mg/ml の IVIg 添加で、IL-10 産生の抑制が認められた。

### C-1-2, 単球の抗原提示能に対する IVIg の影響

図 1 Th1 サイトカイン産生と IVIg の影響

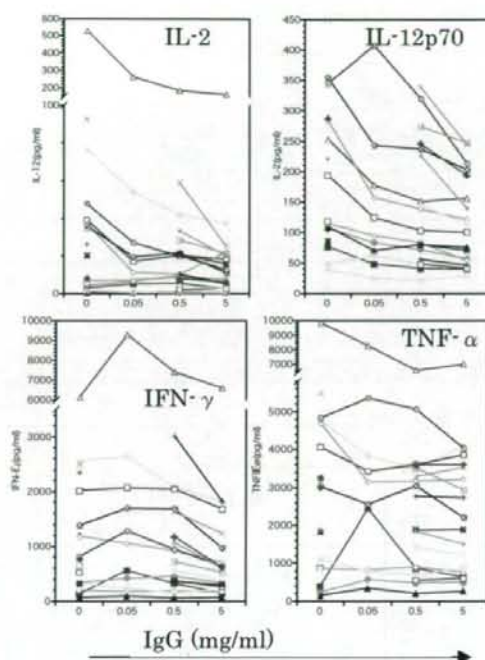


図 2 Th2 サイトカイン産生と IVIg の影響

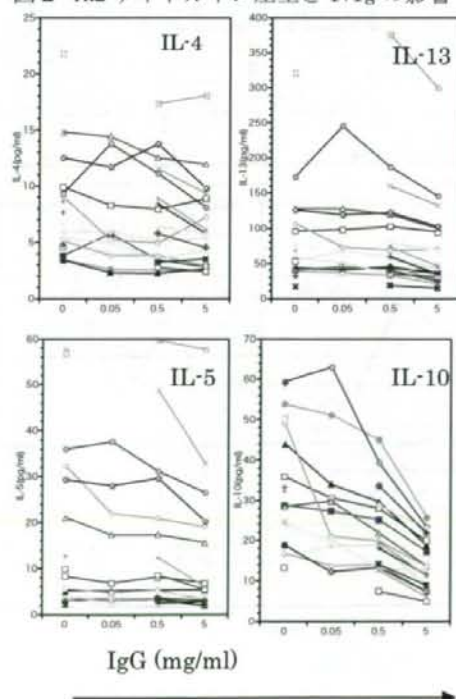


図 3 に MPO-ANCA 腎炎患者の単球と健常人 CD4<sup>+</sup>T 細胞、抗 CD3 抗体を用いIVIg の影響を検討した。その結果、Fc 部分には特に抑制効果は認められなかったが、1, 10mg/ml のIVIg 添加でIFN- $\gamma$  産生の抑制が認められた。

さらに、人工 $\gamma$ グロブリン製剤の評価系にこの系を適用することを考え、単球にかえて株細胞を用いて、検討した。図4に示されるように、単球に代えて単球系細胞株

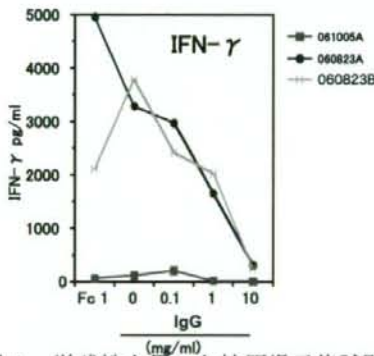
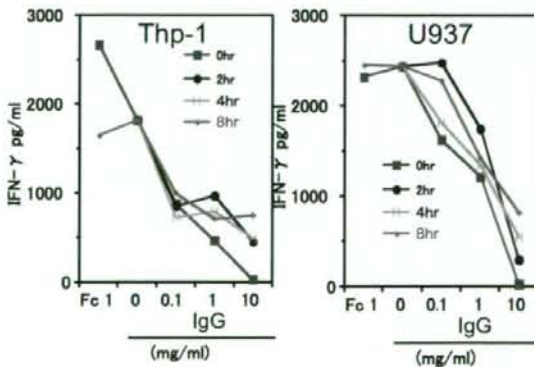


図 4 単球株を用いた抗原提示能試験へのIVIg の影響



である Thp-1, U937 細胞でも、IVIg の影響を認める事が可能であった。IVIg の添加時間は、反応開始時が顕著ではあったが、8

時間後でも十分にIFN- $\gamma$  産生を抑制できる事が明らかにされた。

また同様に健常人 CD4<sup>+</sup>T 細胞に代えて、Jurkat 株等について検討したが、現時点では成功していない。

### C-2, MPO-ANCA 腎炎患者のサイトカイン動態の特性の検討

27plex array のうち、RANTES を除き、26 項目のサイトカイン・ケモカインを測定することが出来た。Table 1 に示すように健常人と比較して MPO-ANCA 腎炎患者で、IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-bb, VEGF が有意に上昇していた。

Table 1 MPO-ANCA 腎炎患者と健常人の血漿中サイトカイン・ケモカインの比較値は log(pg/ml)

	健常人	SE	MPO-ANCA腎炎	SE	p	IgA腎症	SE	p
IL-1 $\beta$	0.077	0.06	0.363	0.107	0.07	0.044	0.111	1
IL-1Ra	2.24	0.005	2.922	0.009	0.006	1.97	0.082	0.1
IL-2	0.279	0.236	0.807	0.14	0.044	0.107	0.14	1
IL-4	-0.064	0.083	0.079	0.12	0.83	-0.207	0.12	0.94
IL-5	0.618	0.301	1.854	0.127	<0.0001	0.322	0.132	1
IL-6	-0.273	0.081	0.31	0.0888	0.0029	-0.101	0.081	1
IL-7	-0.273	0.0745	0.1885	0.107	0.0089	-0.221	0.111	0.9
IL-8	1.259	0.051	1.826	0.073	0.0183	0.84	0.076	0.0048
IL-9	1.88	0.0833	2.388	0.119	<0.0001	1.88	0.12	0.008
IL-10	0.525	0.07	1.071	0.102	0.0002	0.295	0.105	0.2
IL-12p70	0.399	0.097	1.261	0.14	<0.0001	0.323	0.145	0.9
IL-13	0.173	0.0604	0.308	0.087	0.013	0.135	0.09	1
IL-15	0.884	0.058	0.845	0.0805	0.9	0.803	0.063	0.003
IL-17	0.348	0.059	0.986	0.0817	<0.0001	0.899	0.069	0.0058
Eotaxin	1.701	0.04	1.71	0.059	1	1.567	0.061	0.4
FGFbasic	1.32	0.04	1.511	0.067	0.09	1.255	0.064	0.99
G-CSF	0.878	0.084	0.839	0.12	0.88	0.588	0.12	0.99
GM-CSF	0.888	0.08	1.405	0.12	0.0021	0.8999	0.125	1
IP-10	1.156	0.06	1.807	0.087	<0.0001	1.32	0.09	0.521
IP-13	2.453	0.035	3.87	0.054	<0.0001	2.501	0.053	0.98
MCP-1	1.819	0.058	1.85	0.048	0.918	1.72	0.048	0.48
MIP-1 $\alpha$	0.185	0.056	0.472	0.077	0.0007	0.152	0.0801	1
MIP-1 $\beta$	2.01	0.27	2.747	0.388	0.0334	1.83	0.0407	0.53
PDGF	2.282	0.081	2.819	0.084	<0.0001	2.81	0.087	<0.0001
Thp-1	0.496	0.078	0.794	0.129	0.054	0.508	0.132	1
VEGF	1.21	0.051	2.04	0.074	<0.0001	1.51	0.77	0.078

一方、IgA 腎症では、IL-9, IL-17, PDGF が上昇していた。また、IL-8, IL-15 はむしろ低下していた。

即ち、IL-9、IL-17、PDGF-bb は両腎炎に共通して上昇していたが、他のサイトカイン・ケモカインは、MPO-ANCA 腎炎で特異的に上昇していた。

#### D. 考案

人工γグロブリンの開発時に、その有効性を検証する、測定系を IVIg を用い、検討した。第一の測定系は、全血を希釈し、PHA で刺激した際に、IVIg を添加、Th1/Th2 サイトカインの産生抑制を検証した。その結果測定したサイトカイン全てで、高濃度の IVIg 添加で、産生抑制が認められることが明らかとなった。またこの系で抑制効果の認められる濃度に個人差があることから、治療の適用の可否の判断につかえる可能性も示唆された。とりわけ、IL-10 の産生抑制は顕著であった。この測定系は 0.5cc 程度の血液があれば測定可能な事から、実用性は高いと思われる。

また、単球の T 細胞刺激能への IVIg の影響についても検証し、その有用性が明らかにされた。現段階では測定のために、健常人 CD4T 細胞が必須であるので、より汎用性の高い測定系とするためには、単球に代えて単球系細胞株の使用のみならず、CD4T 細胞についても細胞株を用いて、検証できるようにする必要があると考えられた。今後、IFN-γ 以外のサイトカインについても、検討する事で、人検体に依存しない評価系の開発が期待できる。

また IVIg の作用機作解明のために、対象疾患である MPO-ANCA 腎炎患者の血漿中サイトカイン・ケモカインレベルを健常人、IgA 腎症患者と比較しつつ調べたところ、測定出来た 26 項目中 17 項目が、健常人、

IgA 腎症患者と比較して有意に上昇していた。即ち、IL-9、IL-17、PDGF-bb は両腎炎に共通して上昇していたが、他のサイトカイン・ケモカインは、MPO-ANCA 腎炎で特異的に上昇していた。IL-9 上昇は両者の発症のきっかけとなる気道アレルギーとの関連、IL-17 は組織障害、PDGF-bb は腎局所の炎症やメザンギウム増殖との関連が考えられた。このように、多項目サイトカイン・ケモカイン動態の網羅的解析は、病態、病因の理解に有用であることが示唆された。

#### E. 結論

In vitro における、IVIg の影響の評価系を開発した。PHA 刺激による Th1/Th2 サイトカイン産生、とりわけ IL-10 の産生について調べることにより、IVIg の評価が可能ながことが明らかにされた。また単球の抗原提示能についても測定系を開発したが、この系については、評価系に使うには、株化細胞を用いる等、更なる検討の余地が残されていた。

また、MPO-ANCA 腎炎は、IgA 腎症と比較しても、高サイトカイン血症であることが明らかとなった。従って、in vitro の系で示された IVIg による、サイトカイン産生抑制効果は、IVIg の作用機作の一つとして考えられ、それを人工γグロブリンの良否の判断の基準とする事は、有用であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Kobayashi, K. Uno, N. Tamura, Y. Yamanishi, A. Fukatsu, R.A. Watts, D.G.I. Scott, D.R.W. Jayne, K. Suzuki, H. Hashimoto A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe, Clinical and Experimental Rheumatology, In press

・ Uno K, Matsuzaki T, Yagi K, Hamuro J, Okuno K. Pre-operative Intracellular Peripheral Monocyte Glutathione Levels Correlate with anti-Tumor Immune-responses and Predict Overall Survival of Patients with Colorectal Carcinoma. Cytokine, Vol.43, 289, 2008

・ Uno K, Tominaga M, Hasegawa G, Fukui M, Yagi K, Tanigawa M, Fujita S, Yoshikawa T, Nakamura N. Multiple Cytokine/Chemokine Analysis Related to the Development of Impaired Glucose Metabolism and DM in Human Plasma. Ann Nutr Metab., Vol.53, 61, 2008

・ 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、八木克己、鈴木和男 MPO-ANCA 腎炎のサイトカイン・ケモカイン動態 PASKEN JOURNAL 2007 Vol.20 1-5

・ 宇野賀津子、富永真澄、長谷川剛二、福井道明、八木克己、谷川真理、藤田哲也、吉川敏一、中村直登 境界型糖尿病から糖尿病への進展をサイトカイン・ケモカイン動態：多項目同時測定法による網羅的解析 PASKEN JOURNAL 2007 Vol.20 6-11

・ 宇野賀津子、富永真澄、長谷川剛二、福井道明、八木克己、藤田哲也、吉川敏一、中村直登 2型糖尿病の発症過程におけるインターフェロン- $\alpha$  産生能の変化, PASKEN JOURNAL 2007 Vol.20 12-18

・ 安田みう子、下田泰治、宇野賀津子、立石成人、八木克己、古谷誠一、鈴木和男、藤田哲也 マウスの免疫学的特性と 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) 感受性 2007 PASKEN JOURNAL Vol.20 19-28

安田みう子、下田泰治、宇野賀津子、立石成人、古谷誠一、藤田哲也 一過性前脳虚血再開通後海馬 CA1 におけるミクログリアの動態と NG2 の発現 2007 PASKEN JOURNAL Vol.20 29-41

・ Yasuda Y, Shimoda T, Uno K, Tateishi N, Furuya S, Yagi K, Suzuki K, Fujita S. The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes and cytokine/chemokine levels in different mice strains. J Neuroimmunol. 204, 43-51, 2008

## 2. 学会発表

・ Uno K, Matsuzaki T, Yagi K, Hamuro J, Okuno K. Pre-operative Intracellular Peripheral Monocyte Glutathione Levels Correlate with anti-Tumor Immune-responses and Predict Overall Survival of Patients with Colorectal Carcinoma. Montriol, Canada

・ 宇野賀津子、富永真澄、長谷川剛二、福井道明、八木克己、谷川真理、藤田哲也、吉川敏一、中村

直登. 境界型糖尿病から糖尿病進展に伴う、血漿中サイトカイン・ケモカインの変動 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

I. 特許取得

なし

J. 実用新案登録

なし

K. その他

なし