

B. 研究方法

I. PMS 調査

方法 IVIG 4 社から、既に解析が終了し厚労省へ提出された PMS の結果 (H15.8.1 から H18.7.31 までの集計症例) を基にした。対象：収集症例数：7631、安全性評価対象症例：7259、有効性解析対象症例：7196、初回治療例：6954、追加治療例 1199、投与目的；初回治療：5998、追加：129、初回+追加：1040、男：女：4200(57.9%)、3059、年齢分布：1 歳未満：1754、1-3 歳未満：3153(43.4%)、3 歳以上：2352、初発：6976、再発：280 例

[結論]

各製品間で有効性ならびに安全性の定義や評価の方法が微妙に異なるため、比較可能な範囲に限られるが、同一疾患の多数例の PMS 報告と考えれば、急性期川崎病においては有用かつ比較的安全に使用されていると推測された。

II. CO-1 測定

対象 診断の手引きを満たす KD 典型例で入院した 80 症例を対象とした。IVIG に対する不応例は、初回 IVIG 終了後 24 時間で 37.5 度以上の発熱が持続しているものとした。患者の血中 CO 濃度、および末梢白血球、赤血球、C-reactive protein(CRP)、総ビリルビン(TB)を IVIG 開始前および終了後 2 ないし 4 日後に測定した。血中 CO 測定には TRiIyzer™ mBA-3000(株式会社タイヨウ、大阪)を使用し、Bleman Colison らの方法にて実施した。データは全て平均±標準誤差で表記した。Student's unpaired t 検定を使用して 2 群間の比較を行い、 $p < 0.05$ を統

計学的有意差有とした。

C. 結果

I. IVIG の安全性：

合併症：あり：1708(23.5%)、なし：5546、不明：3、安全性調査対象：副作用：484 例 (6.7%)、697 件、重篤な副作用：68 例 78 件。副作用 (件数)：掻痒感・発疹 78、肝機能障害 69、肝機能関連検査値異常：40、低体温 50、無菌性髄膜炎 19、低血圧 19、蒼白 15、チアノーゼ 14、末梢冷感 13、ショック 13、心不全 13、溶血性貧血 4、その他 408。

IVIG の有効性：

初回治療時無効率：平均 13.52% (12.5~15.2%)、追加治療時無効率：平均 17.74% (15.0%~20.1%) (4 製品間で有意差なし)。心断層エコー所見：初回のみ異常：平均 1.69%(0.63~2.49) (但し 3 社の報告)、Total 異常率：2.84 (0.932~4.2%) (但し 3 社のみ、3 製品間で有意差なし)。

II. CO-1

IVIG 療法前 CRP は、反応例 $3.02 \pm 1.65 \text{ mg/dl}$ ($n=49$)、不応例 $7.85 \pm 4.01 \text{ mg/dl}$ ($n=31$)、 $p=0.00015$ であった。CO 濃度は、反応例 $309 \pm 21 \text{ ppm}$ ($n=49$)、不応例 $352 \pm 38 \text{ ppm}$ ($n=31$)、 $p=0.0117$ であり、CRP 値、CO 濃度ともに、不応例は反応例に比較して有意に高値であった。IVIG 療法前後の CRP 値は、反応例前 $3.02 \pm 1.65 \text{ mg/dl}$ ($n=49$)、反応例後 $0.53 \pm 0.38 \text{ mg/dl}$ ($n=49$)、 $p=0.0007$ 、不応例前 $7.85 \pm 4.01 \text{ mg/dl}$ ($n=31$)、不応例後 $3.58 \pm 2.87 \text{ mg/dl}$ ($n=31$)、 $p=0.0367$ であり、ともに IVIG 療法により有意に低下したが、不応例の後値は反応例の前値より高値を呈していた。

一方、IVIG 療法前後の CO 濃度は、反応

例前 309±21ppm (n=49)、反応例後 247±19ppm (n=49)であり、反応例では IVIG 療法後の CO 濃度に有意 (p=0.0158) な低下を認めた。しかし不応例では、IVIG 療法前 352±38ppm (n=31)、IVIG 療法後 411±53ppm (n=31)となり、CO 濃度は有意な低下は認められず、むしろ増加傾向を示した。

D. 考案

I. IVIG の副作用の頻度は、HIV 感染、ITP (特発性血小板減少性紫斑病)、ギランバレー症候群等と比較すると、明らかに KD では副作用が少ないと考えられた。しかし、副作用は多彩であり、予測因子に乏しく充分注意する必要がある。第一に血漿浸透圧の上昇、その他、凝固能亢進、容量負荷による心不全の悪化、Coomb 試験陽性の溶血性貧血、無菌性髄膜炎、血球貪食症候群、敏性症候群、アナフィラキシーなどに関連する報告があった。

II. KD の病態の主座は全身の中小動脈の血管炎であり、単球/マクロファージでの転写因子 nuclear factor kappa B(NFκ-B)の活性化を介した tumor necrosis factor alpha(TNF-α), interleukin(IL)-1,IL-6 などの炎症性サイトカインによる接着因子の発現増強と、単球の接着が関与している。

生体内でヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase:HO)は heme 蛋白の補欠分子族である protoheme を基質として heme と等モルの CO と還元鉄(Fe²⁺)、ビリベルジンを生成する酵素であり、これらの生成物質は多彩な生理作用を持つ。CO は IL-10 などを介して抗炎症作用を発揮する。HO-1 は誘導型で酸化ストレス、サイトカインなどの多彩な

刺激でその活性が誘導され、生体の恒常性を保ち、細胞を保護する役割を担っている。

E. 結論

I. IVIG の安全性

各製品間で有効性ならびに安全性の定義や評価の方法が微妙に異なるため、比較可能な範囲に限られるが、同一疾患の多数例の PMS 報告と考えれば、急性期 KD においては有用かつ比較的安全に使用されていると推測された。(尚、研究に協力して頂いた製薬企業の各担当者、花田孝弘(化学及血清療法研究所)、今城幸子(帝人ファーマ株式会社)、伊堂寺 徹(日本製薬株式会社)、池川千穂(パイエル薬品株式会社)、野口 豊(ベネシス株式会社)に深謝する。)

II. KD 急性期では IVIG 療法前後の血中 CO 濃度の動態を解析することは、CRP 値と比較して IVIG 反応性の診断に有用である。

II. 酸化ストレス

IVIG 療法前後の血中 CO 濃度の動態を測定により、IVIG 反応性の予測が可能である。

F. 参考論文

1. Tremoulet AH, Best BM, Song S, Wang S, Corinaldesi E, Eichenfield JR, Martin DD, Newburger JW, Burns JC: Resistance to intravenous immunoglobulin in children with Kawasaki disease. *J Pediatr.* 153(1): 117-21, 2008
2. Ashouri N, Takahashi M, Dorey F, Mason W: Risk factors for nonresponse to therapy in Kawasaki disease. *J Pediatr.* 153(3): 365-8, 2008
3. Uehara R, Belay ED, Maddox RA, Holman RC, Nakamura Y, Yashiro M, Oki I, Ogino H, Schonberger LB, Yanagawa H: Analysis of risk factors associated with nonresponse to initial intravenous immunoglobulin treatment among Kawasaki disease patients

in Japan. *Pediatr Infect Dis J.* 27(2): 155-60, 2008

4. Pinna GS, Kafetzis DA, Tselkas OI, Skevaki CL. Kawasaki disease: an overview. *Curr Opin Infect Dis.* 21(3): 263-70, 2008
5. Popper SJ, Shimizu C, Shike H, Kanegaye JT, Newburger JW, Sundel RP, Brown PO, Burns JC, Relman DA. Gene-expression patterns reveal underlying biological processes in kawasaki disease. *Genome Biol.* 8(12):R261, 2007

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Muro T, Maruyama Y, Onishi K, Saze M, Pkada E, Matsuura H, Saji T: Mimicking Kawasaki disease in bumed children: Report of four cases. *Burns.* In press
2. Onouchi Y, Gunji T, Burns JC, Shimizu C, Newburger W, Yashiro M, Nakamura Y, Yanagawa H, Wakui K, Fukushima Y, Kishi F, Hamamoto K, Terai M, Sato Y, Ouchi K, Saji T, Nariai A, Kaburagi Y, Yoshikawa T, Suzuki K, Tanaka T, Nagai T, Cho H, Fujino A, Sekine A, Nakamichi R, Tsunoda T, Kawasaki T, Nakamura Y, Hata A: ITPKC functional polymorphism associated with Kawasaki disease susceptibility and formation of coronary artery aneurysms. *Nature Genetics.* 40(1): 35-42, 2008
3. Takeuchi D, Saji T, Takatsuki S, Fujiwara M: Abnormal Tissue Doppler Images are Associated With Elevated Plasma Brain Natriuretic Peptide and Increased Oxidative Stress in Acute Kawasaki Disease. *Circ J.* 71: 357-362, 2007
4. Saji T, Kemmotsu Y: Infliximab for Kawasaki syndrome. *J Pediatr.* 149(3), 426, 2006
5. 佐地勉: 川崎病の治療: ウリナスタチン療法の作用メカニズム. *小児科診療.* 69, 994-998, 2006

2. 学会発表

1. 佐地勉、菌部友良、濱岡建城、荻野廣太、大田八千雄、大島美保、長谷山圭司、大久保淳、梶野真弓、監物靖、高月晋一、秋元かつみ、松原知代、今川智之、石井正浩、喜瀬広亮、渡部綾佳、廣野恵一、吉林宗夫、白石泰資、市山高志、岸本小百合、城尾邦隆、宗内淳: 川崎病の急性期治療としての Infliximab の安全性と有効性—3 回のアンケート調査の結果

から—第 28 回日本川崎病研究会. 2008.10、札幌

2. 大原関利章、横内幸、若山恵、伊原文恵、山田仁美、佐地勉、直江史郎、高橋啓: 川崎病動脈炎モデルにおける抗 TNF- α 療法の血管炎抑制効果の検討. 第 28 回日本川崎病研究会. 2008.10、札幌
3. 原田涼子、内野由美子、鳥羽崇仁、佐藤真理、松裏裕行、小原明、佐地勉、陳 怡如、関東裕美: 大量免疫グロブリン療法が奏功した全身性重症 TEN 型薬疹の男児例. 第 561 回日本小児科学会東京都地方会講話会. 2008.12、東京
4. 小林徹、佐地勉、森川昭廣、市田蕨子、小川俊一、中村哲也、野村裕一、竹内一夫、三浦 大、荒川浩一: 川崎病に対する新規治療法を開発するための多施設共同無作為比較試験 (RAISE study). 第 35 回日本小児臨床薬理学会学術集会. 2008.12、東京
5. 佐地勉: 急性期川崎病・治療の再考—IVIG 不応例への対応—第 1 回岐阜免疫・感染・川崎病研究会. 2008.5、岐阜
6. 佐地勉: 急性期川崎病の難治例・IVIG 不応例に対する新規治療選択. 第 11 回みなと川崎病研究会. 東京、2008.6
7. 佐地勉: 急性期川崎病の不応例・重症例への新規治療法の展望 (教育セミナー). 第 110 回日本小児科学会総会・学術集会. 2007.4、京都
8. 佐地勉: レミケードの使用実態調査結果. 第 27 回日本川崎病研究会. 2007.10、東京
9. 佐地勉: IVIG の市販後調査からみた有用性と安全性. 第 27 回日本川崎病研究会. 2007.10、東京
10. 佐地勉: 急性期川崎病の IVIG 抵抗例に対する治療 Option—抗サイトカイン療法の有用性・安全性を含めて— (モーニングセミナー). 第 17 回日本小児リウマチ学会. 2007.9、横浜
11. 直井和之、佐地勉: メチルプレドニゾン 1.5mg/kg パルス療法は初回 IVIG 不応急性期川崎病に対し有効である. 第 110 回日本小児科学会総会・学術集会. 2007.4、京都
12. 監物靖、嶋田博光、高月晋一、中山智孝、松裏裕行、佐地勉、楠夏子、川合眞一、石黒精、幸田恭子: 急性期川崎病における血中アディポサイトカインの変化. 第 27 回日本川崎病研究会. 2007.10、東京
13. 高月晋一、岡松千都子、寺田江里、池原聡、嶋田博光、中山智孝、松裏裕行、盛田俊介、佐地勉、石黒精、幸田恭子: 急性期川崎病における酸化ストレスによる血管内皮障害—Reactive Oxygen Species の変動から—第 27 回日本川崎病研究会. 2007.10、東京
14. 直井和之、池原聡、監物靖、嶋田博光、高月晋一、中山智孝、松裏裕行、佐地勉、我妻聖司、高橋宏: 肺癌を疑われ精査で一部石灰化を伴う冠動

- 脈瘤病変と判明した川崎病既往の54歳成人例. 第27回日本川崎病研究会.2007.10、東京
15. 佐地勉: 急性期川崎病に対する静注用ガンマグロブリン製剤の使用成績調査(PMS)の最終報告.第27回日本川崎病研究会.2007.10、東京
 16. 佐地勉:免疫グロブリン (IVIG)不応例への治療 options 一次の一手は何か(特別講演).第3回新潟川崎病研究会.2007.4、新潟
 17. 佐地勉:IVIG 不応の川崎病の治療方針指針.川崎病臨床懇話会.2007.7、横浜
 18. 佐地勉: 急性期川崎病の難治例に対する抗サイトカイン療法～その有用性と安全性について～.第11回川崎病治療懇話会.2007.9、大阪
 19. 佐地勉:川崎病不応例への新規治療法. 第5回栃木県川崎病研究会.2007.10、宇都宮
 20. 佐地勉:急性期川崎病の IVIG 不応例・重症例への治療法の再考.第4回若葉小児科臨床研究会.2008.2、神戸
 21. 佐地勉:IVIG 不応の重症川崎病に対する治療薬の選択～抗サイトカイン療法の有用性と安全性～(特別講演).川崎病フォーラム in FUKUOKA.2008.2、福岡
 22. 佐地勉:川崎病治療におけるガンマグロブリン製剤の有効性と安全性.第32回近畿川崎病研究会.2008.3、大阪
 24. 小林徹、佐地勉:重症川崎病患者に対するステロイド初期投与の効果を検討する前方視的無作為比較試験の計画に関する研究.平成19年度厚生労働科学研究臨床試験推進研究成果発表会.2008.2、東京
 25. 佐地勉:川崎病は今!ー急性期・遠隔期治療そして原因は.第26回川崎病の子どもの持つ親の会総会記念講演会.2007.9、東京
 26. 佐地勉:急性期川崎病への IVIG の有用性再考ー市販後使用成績調査 (PMS) の結果の解析も含めてー.愛知川崎病フォーラム.2007.11、名古屋
 27. 佐地勉、高月晋一、嶋田博文、池原聡、直井和之、中山智孝、松裏裕行.急性期川崎病に対する静注用ガンマグロブリン超大量単回投与(2g/kg/日)の大規模市販後成績調査から見た有効性と安全性.International Conference regulation of Inflammatory Diseases Vsculitis and Asthema-2008 in Chiba. 2008.1、千葉
 28. 佐地勉、監物靖:抗サイトカイン療法(抗 TNF α 製剤)による川崎病 IVIG 不応例・難治例の治療(シンポ).第26回日本川崎病研究会.2006.10、大阪
 29. 監物靖、嶋田博文、中山智孝、松裏裕行、月本一郎、佐地勉、楠 夏子、川井眞一:急性期川崎病における血中 Resistin (レジスチン). 第26回日本川崎病研究会.2006.10、大阪
 30. 直井和之、池原 聡、嶋田博文、高月晋一、中山智孝、松裏裕行、佐地勉:初回 IVIG 不応の急性期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26回日本川崎病研究会.2006.10、大阪
 31. 監物靖、池原聡、嶋田博文、中山智孝、松裏裕行、月本一郎、佐地勉:ガンマグロブリン・ステロイドパルス療法が無効な急性期川崎病における Infliximab(レミケード)の有効性.第26回日本川崎病研究会.2006.10、大阪
 32. 佐地勉、直井和之、監物靖、栗木愛子、鈴木えり子:ガンマグロブリン静注療法 (IVIG) 無効の急性期川崎病に対するステロイドパルス療法.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班班会議.2006.10、京都
 33. 佐地勉:急性期川崎病の難治例に対する治療 option. 第80回日本小児科学会香川地方会.2006.12、高松
 34. Tsutomu Saji, Yasushi Kemmotsu, Hiromitsu Shimada, Satoshi Ikehara, Shinichi Takatsuki, Tomotaka Nakayama, Hiroyuki Matsuura: Treatment for Intravenous Immunoglobulin (IVIG) Resistance Patients with Acute Kawasaki Vasculitis Children - Survey of The Efficacy of Anti TNF α (Infliximab) Therapy -. 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.2007.2 東京
- 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

ガンマグロブリン製剤大量療法:これまでの有害事象の検討と
皮膚型多発性動脈炎(CPN)への治療の可能性

欧州・米国リウマチ学会の血管炎の基準改訂のための国際会議に参加して

小林茂人 順天堂大学医学部附属 順天堂越谷病院 先任准教授

研究要旨: 平成 18 年度はガンマグロブリン製剤大量治療および関節リウマチに対する生物学的製剤にて報告されている有害事象について報告し、人工ガンマグロブリン製剤の安全性の検討の際に必要な事項を報告した。平成 19 年度は、皮膚型多発性動脈炎(CPN)についての現状に検討し、川崎病の動脈炎と同じ中型動脈の病変のため、足趾の壊死・壊疽を起こす CPN の治療に、ガンマグロブリン治療の有用性も推定された。平成 20 年度は、欧州・米国リウマチ学会による血管炎の基準を見直すための国際会議に参加し、新しい血管炎の分類に関して検討を行った。

A. 研究目的

平成 18 年度は、ガンマグロブリン製剤大量治療および関節リウマチに対する生物学的製剤にて報告されている有害事象を検討した。

平成 19 年度は、皮膚型 PN の概念や難治性病態の頻度など不明確である。今回、皮膚型 PN の臨床病態について、検討し、治療の可能性について検討した。

平成 20 年度は、EULAR/ACR(欧州・米国リウマチ学会)にて、血管炎の概念・定義・分類基準・診断基準の改定作業に参加した。

B. 研究方法

平成 18 年度は、文献検索を行った。平成 19 年度は、臨床検討を行った。平成 20 年度は、EULAR/ACR(欧州・米国リウマチ学会)改定作業に参加した。

C. 研究結果

平成 18 年度:ガンマグロブリン大量療法

に関する有害事象で、一般的に知られているものは、1)C 型肝炎など感染性微生物の伝播、2)自己抗体による有害事象(ガンマグロブリン製剤や患者の持つ抗体による)、3)頭痛・無菌性髄膜炎、4)血管炎、5)急性腎不全などであった。

平成 19 年度:皮膚型 PN の皮疹の特徴は、結節性紅斑、皮下結節、下腿潰瘍(7 症例、1 例が壊疽のため切断に至った)であった。現在行われている下腿潰瘍・壊死に対する再生医療は既存の阻血病変に対する血流再開治療である。皮膚型 PN に対する人工ガンマグロブリン大量治療の意義は、1)皮膚型 PN が川崎病と同じ口径の血管炎をもつため有効と考えられること。2)血管の阻血変化、damage 形成に対する予防・治療である。3)下腿の難治性潰瘍・壊疽～切断手術を回避できる可能性があること。以上が推定される。

平成20年度：ACR分類・CHCC基準の改訂が行われた。症候群やサブグループに対しては、階層制での分類が行われた。高安、川崎、Wegenerなど報告者の名前を冠した病名を改める意見も提唱されたが、混乱を起こすため、現行のままで表記することが決められた。

D. 考案・結論

血管炎とその治療法に関して幅広い多くに知見が得られた。しかも、3年間にて、多くの学会発表や論文発表の成果を得た。この研究を通じて、国際的にも評価されたため、欧州・米国のリウマチ学会の血管炎の基準改訂作業に主任研究者 鈴木和男とともに参加依頼があり、研究・改訂作業に加わった。今後、人工ガンマグロブリン作成が完了した際には、従来のヒト由来製剤の問題点である 1)感染症の危険性、2)手間がかかり高価であること、などが解消され、さらに、日本からの世界に向けた「創薬」になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

1. Fujimoto S, Uezono S, Hisanaga S, Fukudome K, Kobayashi S, Suzuki K, Hashimoto H, Nakao H, Nunoi H. Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in the Miyazaki Prefecture: the first population-based, retrospective, epidemiologic survey in Japan. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 1016-1022, 2006
2. Miyashita R, Tsuchiya N, Yabe T, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* 54:992-997, 2006
3. Suzuki K, Kobayashi S, Yamazaki K, Gondo M, Tomizawa K, Arimura Y, Nakabayashi K, Ozaki S, Yashida M, Yoshida T, Tsusaka N, Muso E, Okazaki T, Hashimoto H. Analysis of risk epitopes of anti-neutrophil antibody MPO-ANCA in vasculitis in Japanese population. *Micro Immunol* 2007;51:1215-20
4. Tamura N, Matsudaira R, Hirashima M, Ikeda M, Tajima M, Nawata M, Morimoto S, Kaneda K, Kobayashi S, Hashimoto H, Takasaki Y. Two cases of refractory Wegener's granulomatosis successfully treated with rituximab. *Intern Med* 2007;46:409-14
5. Matsumoto T, Kobayashi S, Ogishima D, Aoki Y, Sonoue H, Abe H, Fukumura Y, Nobukawa B, Kumasaka T, Mori S, Suda K. Isolated necrotizing arteritis (localized polyarteritis nodosa): examination of the histological process and disease entity based on the histological classification of stage and histological differences from polyarteritis nodosa. *Cardiovasc Pathol* 2007;16:1569-70.
6. Tougan T, Oda A, Okuzaki D, Kobayashi S, Hashimoto H, Nojima H. Focused microarray analysis of peripheral mononuclear blood cells from Churg-Strauss syndrome patients. *DNA Research* 2008 15(2):103-14.
7. Mamegano K, Kuroki K, Miyashita R, Kusaoi

- K, Kobayashi S, Matsuta K, K Maenaka K, Colonna M, Ozaki S, Hashimoto H, Takasaki T, Tokunaga K, Tsuchiya N Association of LILRA2 (IL1, LIR7) splice site polymorphism with systemic lupus erythematosus and microscopic polyangiitis. *Genes and Immunity* 2008, 1-10, Feb7 {Epub ahead of print}, 2008, 9:214-223.
8. Seta N, Tajima M, Kobayashi S, Kawakami Y, Hashimoto H, Kuwana K. Autoreactive T cell responses to myeloperoxidase in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis and healthy individuals. *Mod Rheumatol* 2008;18(6):593-600.
9. Watts RA, Scoydt DG, Jayne DR, Ito-Ihara T, Muso E, Fujimoto S, Harabuchi Y, Kobayashi S, Suzuki K, Hashimoto H. Renal vasculitis in Japan and the UK-are there differences in epidemiology and clonical phenotype? *Nephrol Dial Transplant* 2008 23(12):3928-31.
10. Kobayashi S, Ito A, Okuzaki D, Onda H, Yabuta N, Nagamori I, Suzuki K, Hashimoto H, Nojima H. Expression profiling of PBMC-based diagnostic gene markers isolated from vasculitis patients. *DNA Res* 2008;15(4):253-65.
11. Ito-Ihara T, Muso E, Kobayashi S, Uno K, Tamura N, Yamanishi Y, Fukatsu A, Watts RA, Scott DGI, Jayne DRW, Suzuki K, Hashimoto H. 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*. 2008;26:1027-1033.
2. 学会発表
国際会議
1. S Kobayashi, T Ito-Ihara, K Suzuki, S Fujimoto, RA Watts, DG Scott, DJ Jayne, H Hashimoto and the Japan-UK AAV Study Group. Incidence of ANCA-associated vasculitis in Japan. A preliminary report from Japan-UK collaboration study.
2. Kobayashi S: Outpatient diagnosis and management of vasculitis, *Rheumatology Minisymposium*. PB403 Queen Mary Hospital, The University of Hong Kong, June 6th, 2008
3. Kobayashi S. ANCA-associated vasculitides: results of Japan-UK study in recent 3 years and plans in very near future. International Conference Regulation of Inflammatory Diseases-Vasculitis and Asthma -2008 in Chiba, Jan 18-19, 2008, Chiba University of Medicine, Chiba.
4. Kobayashi S. ANCA-associated vasculitides: results of Japan-UK study in recent 3 years and plans in very near future. International Conference Regulation of Inflammatory Diseases-Vasculitis and Asthma -2008 in Chiba, Jan 18-19, 2008, Chiba University of Medicine, Chiba.
5. Kobayashi S, Suzuki K, Fujimoto. Development EULAR/ACR endorsed of points of consideration in the diagnosis, definition and classification of systemic vasculitis (by Watts R, Luqumani R). EULAR House, Zurich, March 3-4th, 2008.
6. Kobayashi S, Suzuki K, Fujimoto. Development

EULAR/ACR endorsed of points of consider in the diagnosis, definition and classification of systemic vasculitis (by Watts R, Luqumani R). EULAR House, Zurich, Dec 1st-2nd, 2008.

国内会議

1. 平島美賀, 松平蘭, 池田真, 金田和彦, 森本真司, 田村直人, 深沢徹, 小林茂人, 高崎芳成, 橋本博史. リツキシマブを投与した難治性ウェゲナー肉芽腫症の2症例. 日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集. 339, 2006.
2. 宮下リサ, 土屋尚之, 小林茂人, 橋本博史, 尾崎承一, 徳永勝士. 顕微鏡的多発血管炎(MPA)の疾患感受性におけるKIR(killer cell Ig-like receptor)-HLA遺伝子間相互作用の検討. 日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集 Page19, 2006.
3. 小林茂人, 大型血管炎に関する問題提起、

「大型血管炎をもう一度考える」、ラウンドテーブルディスカッション、第14回MPO研究会、10月25日、東邦大学医療センター大橋病院、2008年

5. 小林茂人 血管炎症候群、内科-病理の医療連携：内科（膠原病内科）の立場から、第54回日本病理学会秋期特別総会ワークショップ「血管炎研究の最前線、」平成20年11月20日、松山市総合コミュニティーセンター、日本病理学会会誌、97(2): 22, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

自己免疫性心筋炎における免疫グロブリンおよび融合蛋白治療の有効性に関する研究

研究分担者 相澤義房 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：劇症型心筋炎は、集中治療をしても約半数が死亡する難治性の疾患であり、積極的に炎症を沈静化する治療法の確立が望まれる。既に我々はラット自己免疫性心筋炎 (EAM)を開発しているが、このモデルは急性期には劇症型心筋炎モデルと考えられ、炎症を生き抜いた例では拡張型心筋症/心不全モデルとなる。本モデルは T 細胞依存性心筋炎でもある。自己免疫性心筋炎には、Th1 細胞が発症に深く関与し、Th2 細胞が心筋炎を制御する細胞と考えられる事を示してきた。

目的蛋白と免疫グロブリンの Fc 部分(Ig) 融合蛋白を作成し、ハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入した。ヒト目的蛋白が Ig と融合蛋白にすることによって得た Ig 融合蛋白 (IL-13Ig、CTLA4Ig、IL-1RA1g) の、高い血中濃度が持続して得られ、劇症型心筋炎モデルで炎症を抑制した。pCAGGS-IL-22-Ig を IL-22 は Ig と融合蛋白にすることによって IL-22 単独に比し、100 倍以上の血中濃度が得られ心筋炎は軽減を確認したが、IL-22 受容体と IL-10 受容体 β の発現は、非心筋非炎症性細胞にみられた。治療群の血清によって EAM 心臓から得た後、IL-1 で刺激した培養細胞は、IL-22 によって PGE 合成酵素、IL-6、CINC-2、MIP-2、MCP-1 の遺伝子や蛋白発現が有意に抑制され、IL-22-Ig の EAM の抑制効果に、PGE 合成酵素、ケモカイン、IL-6 の抑制などがあると考えられた。

EAM 治療群の第 1 日目に pCAGGS-IL-10-Ig をハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入も有意に心体重比、心筋炎面積率の減少および ANP の発現量の減少がみられた。IL-10-Ig は EAM の IL-1 にて刺激した脾細胞に対して、TNF- α や IL-1 だけでなく IL-17 の発現を抑制することも機序の一つと考えられた。

以上、EAM では炎症細胞だけでなく、線維芽細胞、平滑筋細胞が、多種類のサイトカイン/ケモカインを大量に産生し、EAM の発症に関与することが示唆され、心筋細胞も抗菌蛋白や鉄代謝に関わる蛋白などを急激に発現することが明らかになった。さらに IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーが、桁違いに強い IL-1 抑制作用を有することが明らかになった。

A. 研究目的

劇症型心筋炎は、健康人が突然発症し心原性ショックを呈し、集中治療を行っても

約半数が死亡する。そのため、より積極的に炎症を沈静化する治療法の確立が望まれる。現在、IVIg 療法は、炎症を沈静化し

副作用が少ないとされる臨床的に使われている唯一の治療であるが、有効性については不明な点が多い。

ポリクローナル免疫グロブリンの静注は、劇症型心筋炎にも有効であるとの報告がなされている。また、免疫グロブリンのFc部分をコードする遺伝子断片のN端側に、ある目的タンパク質のフレームを合わせて作成した人工免疫グロブリン(Ig)融合タンパクは、近年、自己免疫疾患の治療に試みられるようになってきている。しかし、目的タンパクのIg融合タンパクを作成し、それを静脈投与するには、大きな労力とコストがかかり、多くの蛋白について検討することは困難である。

最近、小動物へのPlasmid DNAを用いたハイドロダイナミクス法は、肝細胞へ高率に遺伝子導入され、タンパクの静脈投与と同じように、濃度な血中濃度を保つことができること報告された。そこで、我々は、この新たに開発した方法を用いて、ラットの自己免疫性心筋炎(EAM)におけるIg融合タンパク治療の有用性について検討した。

EAMは急性期には劇症型心筋炎モデルとなり、慢性期には拡張型心筋症/心不全モデルとなる。これまでに、いくつかの人工免疫グロブリン(Ig)融合蛋白(IL-13Ig, CTLA4Ig, IL-1RAIg)の、ヒト劇症型心筋炎に類似するラット自己免疫性心筋炎モデル(EAM)に対する治療効果を報告した。ここでは、IL-13Ig、IL-22 Ig融合蛋白の治療効果を中心に検討した。次いで、IL-10-Igの治療効果がIL-17を産生するTh17にどのような影響を与えるかも検討した。

B. 研究方法

目的タンパクのIg融合タンパクは、Igと融合させることによって、いくつかの利点があるとされ、その一つに、高い血中濃度を維持できるとの報告がなされている。そこで、まず我々は、目的タンパクをIg融合することによって、どの程度より高い血中濃度が得られるのかを、Plasmid DNAを用いたハイドロダイナミクス法にて検討した。

方法はIgと融合しないpCAGGS-vMIP-Glucagon-Tag、pCAGGS-IL22-Glucagon-TagおよびIgと融合するpCAGGS-vMIP-Ig-Glucagon-Tag、pCAGGS-IL22-Ig-Glucagon-Tagをそれぞれ作成し、正常ラットにハイドロダイナミクス法によりこれらを遺伝子導入し、最も高い濃度を示すと考えられる1日後の血中濃度をGlucagon-Tagを用いて測定し比較した。次に、いくつかの目的タンパク質(IL-13, CTLA, IL-RA, IL-22,)と-Ig融合タンパクと目的タンパク質を含まないIgのみとの治療を比較検討するため、これらのplasmidを作成し、EAMにおける治療効果を検討した。

第0日にブタ心筋ミオシンで免疫し、治療群に第1日目あるいは6日目にpCAGGS-IL-22-Igをハイドロダイナミクス法にて遺伝子導入し、pCAGGS-Igを遺伝子導入したコントロール群と比較検討した。また、標的細胞を同定するために、第18日目のEAMの心臓からランゲンドルフ還流装置下にコラゲナーゼ処理して分離し、金属ふるいと適当な抗体、マグネットビーズ抗体を用いて精製した細胞群で、IL-22関連蛋白の遺伝子発現を定量的RT-PCRにて検索した。さらに、IL-22-Igの作用を調べるた

めに、治療群の血清を EAM の心臓からえられた培養細胞に加え、いくつかの免疫関連蛋白の mRNA と蛋白の変化を検討した。

IL-10 に Ig を融合させた pCAGGS-IL-10-Ig も、第 0 日にブタ心筋ミオシンで免疫し、EAM を作成し、治療群に第 1 日目にハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入し、pCAGGS-Ig を遺伝子導入したコントロール群と比較検討した。

導入したサイトカインの標的細胞を同定するために、EAM の心臓から分離精製した細胞群で、IL-17 関連蛋白の遺伝子発現を定量的 RT-PCR にて検索し、さらに IL-17 関連遺伝子発現の時間経過も同様に検討した。IL-10-Ig 治療がどのように IL-17 などに作用するかを検討するために、治療群の血清を EAM の脾臓からえられた培養細胞に加え、IL-17 を含むいくつかの免疫関連蛋白の変化を検討した。

最後に、T 細胞、マクロファージ、樹状細胞および線維芽細胞、平滑筋細胞の様々なサイトカイン/ケモカインの発現を検討し、それらのクロストークについて心筋炎組織中の心筋細胞の遺伝子発現を DNA microarray で網羅的に検討した。

C. 研究結果

EAM の炎症像と炎症の経過および関与する免疫細胞やサイトカインについては、既報に詳しいのでここでは省略する。

Ig 融合タンパクの血中濃度は、融合しないものに比べて 17 - 334 倍と著明に高値を示した (vMIP, 0.28 ± 0.08 pmol/l = 3.40 ± 1.01 ng/ml; vMIP-Ig, 4.71 ± 0.52 pmol/l = 160 ± 25.4 ng/ml) (IL22, 0.38 ± 0.13 pmol/l = 7.89 ± 2.76 ng/ml; IL22-Ig, $126 \pm$

46.9 pmol/l = 5900 ± 2200 ng/ml)。

EAM の治療実験では、CTLA4-Ig 融合タンパク、IL-1 受容体アンタゴニスト-Ig 融合タンパク、IL-13-Ig、IL-22-Ig 融合タンパクが、心筋炎を有意に改善させた。即ち、心筋炎の抑制、心機能の悪化の阻止および炎症後の肥大や拡大の抑制(リモデリングの抑制)に対する有用性があきらかであった。また治療に用いた融合タンパクは、EAM から分離培養された細胞に対して、いくつかの免疫関連タンパク遺伝子の発現を大きく変化させ、これらが効果の現れた機序であると考えられた。

IL-22 の産生細胞は $\alpha\beta$ T 細胞であり、IL-22 受容体と IL-10 受容体 β とも高い発現が見られた標的細胞と考えられる細胞は炎症細胞群ではなく、非心筋非炎症性細胞であった。EAM 心臓から得られた IL-1 で刺激された培養細胞は、IL-22-Ig によって、PGE 合成酵素、Cox-2、MIP-2、MCP-1、IL-6、CINC-2 の遺伝子発現および蛋白の産生が有意に抑制された。

IL-10 は Ig と融合蛋白にすることによって、第 1 日目にハイドロダイナミクス法にて遺伝子導入した群は、以前、IL-10 を筋肉内にエレクトロポレーションを加え何回か遺伝子導入した群よりも 10 倍ほど高い血中濃度を示した。IL-10-Ig 治療群でも、有意に心体重比、心筋炎面積率の減少および ANP の発現量の減少がみられ、有効と考えられた。

一方、最近明らかにされた Th17 が産生する IL-17 は、以前報告した Th1 サイトカインと同様に、T 細胞のみに発現がみられ、発現する時期も Th1 サイトカインと同様に発症初期であり、IL-10 の発現よりも早い時期

であった。しかも、IL-17はTh1サイトカインよりも発現量は明らかに多く、EAMにおいて、重要な作用を持つのではないかと考えられた。また、IL-10-Igの作用を検討するために、EAMのIL-1にて刺激した脾細胞を用いて、IL-10-Igを加え、いくつかのサイトカインの発現量を測定したところ、TNF- α やIL-1だけでなく、著明なIL-17の発現抑制がみられた。IL-10-Igの治療効果の機序は、TNF- α やIL-1の抑制だけでなく、IL-17の抑制も重要なのではないかと考えられた。

EAMの心臓中のT細胞は、IL-2、IFN- γ 、IL-17が発現し、CD11bc⁺細胞からは、IL-1 α および β 、TNF- α が発現していた。しかし、NCNI細胞にも、それらの受容体は明らかに発現が認められ、MCP-1、IL-6、G-CSFは、むしろほとんどがNCNI細胞で発現が認められた。サイトカイン/ケモカインの時間経過を見ると、初期にはIL-1、IL-17、IL-2、IL-6、MCP-1の発現が認められ、一方IL-10は回復期に認められた。また、初期に上昇していたそれらは、炎症細胞浸潤があまり病理学的に認められない組織中で明らかに上昇していた。心筋炎の組織から得られた培養細胞に、IL-1やIL-17を添加すると、IL-6、MCP-1の発現誘導が認められた。また異なる細胞が発現すると考えられるIL-1とIL-6やMCP-1の組織中発現量の相関関係は、非常に良好であった(IL-1 vs IL-6, $r=0.951$ $p<0.0001$; IL-1 vs MCP-1, $r=0.944$ $p<0.0001$)。以上より、心臓内の樹状細胞と病的T細胞の接触により産生されたサイトカインが、NCNI細胞などに働き、IL-6、MCP-1、G-CSFなどのサイトカイン/ケモカインを誘導し、炎症細胞の浸潤を誘導するのではないかと推測した。

心筋炎心臓のDNA microarrayの解析では、PAP(pancreatitis associated protein)/Reg(regenerating gene)、alpha 2 μ globulin-related protein、Collagen XVIII、NCAMなどが正常心筋細胞に比し、非常に発現が亢進していることが明らかになった。これらの一部は、抗菌蛋白あるいは鉄代謝に関連するものであり、最近注目されている蛋白であった。

IL-1の阻害薬の検討では、IL-1RII-Igのホモダイマー、IL-1RAcp-Igのホモダイマーに比べ、それらのヘテロダイマーが桁違いに阻害作用を有していた。これは、現在臨床で使われつつあるIL-1Rアンタゴニスト(anakinra)に比し、約10000倍強力な効果であった。

D. 考案

T細胞依存性心筋炎である自己免疫性心筋炎において、Ig融合タンパクの遺伝子導入の効果を検討した。

Ig融合タンパクは、タンパクの血中濃度を著明に高く維持できるという利点があった。ポリクローナルグロブリンが心筋炎に効果を示す一つの機序である可能性が考えられる。また、いくつかのタンパクのIg融合タンパクは、明らかにEAMに対して効果がみられた。ポリクローナルグロブリンの開発において、一つの指針になると思われる。

一方、ハイドロダイナミクス法による小動物への遺伝子発現は、簡便性、経済性に優れ、今後の蛋白製剤の開発に、おおきな利点を持つ方法論である可能性が考えられた。

今回のin vitroで、IL-1で刺激した非心筋

非炎症性細胞に対する IL-22-Ig の作用を検討した。既に EAM の心臓局所で、CD11b+ 細胞が多くの IL-1 を産生しており、非心筋非炎症性細胞は IL-1 受容体をもつ IL-1 の標的細胞でもあると報告しており、IL-22-Ig の標的細胞でもある非心筋非炎症性細胞は、in vivo においては CD11b+ 細胞が産生する IL-1 の刺激を受け、かつ $\alpha\beta$ T 細胞の産生する IL-22 の影響を受けているものと思われる。また、多くのケモカインも fibroblast などで IL-1 や TNF- α によって産生増強されるのはよく知られ、これらケモカインの自己免疫疾患における役割は大きく、IL-22-Ig はこれらを抑制することによって、治療効果が期待出来る可能性がある。

IL-22-Ig で EAM が抑えられたという事実は、IL-22-Ig の作用する非心筋非炎症性細胞が、EAM において重要な役割を果たす可能性を示していると考えられる。

pCAGGS-IL-10-Ig のハイドロダイナミクス法による治療は、pCAGGS-IL-10 のエレクトロポレーションによる筋肉内遺伝子導入よりも高い血中濃度が得られ、Ig と融合させるメリットがこの点からも示唆される。またこの治療は、EAM に対して有効であり、その時、IL-1 で誘導された T 細胞の IL-17 を著明に抑制し、それが大きな作用機序である可能性が考えられる。IL-17 は EAM でも重要なサイトカインと考えられ、これを制御する治療は有望なのではないかと思われる。

今までは、線維芽細胞、平滑筋細胞については、それほど積極的に炎症に関わっていないのではないかと考えられていた。しかし、最近、筋線維芽細胞が、他の臓器でも様々なサイトカイン/ケモカイン/成長因子

を産生し、またそれらの受容体を持つことが明らかになってきた。今後、血管炎の機序を考える上にも、重要な細胞として詳細に検討する必要があると考える。また DNA microarray によって網羅的な遺伝子発現の検討が可能になったため、今まで注目されなかった蛋白の重要性が、様々な分野で明らかになってきている。今回浮かび上がってきた抗菌蛋白や鉄関連蛋白は、再生、活性酸素種 (ROS)、アポトーシスなどに深く関わっていると想定される蛋白である。今後、その作用を明らかにする必要があり、バイオマーカーや治療薬の開発につながる可能性もある。IL-1 の阻害薬の検討では、驚くほど強力な IL-1 阻害作用が、IL-1R-Ig ヘテロダイマーでみられた。IL-1 は、他の炎症でも中心的な役割を果たすサイトカインである。この生物学的製剤は、今後血管炎でも有用になる可能性があると思われる。

E. 結論

T 細胞依存性心筋炎である自己免疫性心筋炎において、Ig 融合タンパクの遺伝子導入の効果を検討した。

目的タンパクを Ig 融合タンパクにすることによって、タンパクは安定化し、高い血中濃度を維持できた。EAM に対して、いくつかのサイトカインを持ち知多 Ig 融合タンパクは、著明な有効性を示した。様々なタンパクを Ig と融合させることによって、有効な治療薬となりうると考えられた。

とりわけ IL-22-Ig の EAM の抑制効果は、IL-1 で刺激された非心筋非炎症性細胞の PGE 合成酵素、Cox-2、MIP-2、MCP-1、IL-6、CINC-2 の抑制を介して働くと考えられた。

pCAGGS-IL-10-Ig のハイドロダイナミク

ス法による治療も、EAM に対して有効であり、これは IL-17 の抑制も関与する可能性が考えられた。

EAM におけるサイトカイン/ケモカインのクロストークには、線維芽細胞、平滑筋細胞などが重要な役割を演じている可能性が示唆され、今後血管炎でも、それらの細胞に注目すべきではないかと考えられた。

IL-1R ヘテロダイマーは強力な IL-1 抑制作用がみられ、今後血管炎の治療にも使える可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida T, Hanawa H, Toba K, Watanabe H, Watanabe R, Yoshida K, Abe S, Kato K, Kodama M, Aizawa Y. Expression of immunological molecules by cardiomyocytes and inflammatory and interstitial cells in rat autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res.* 2005;68:278-88.
- 2) Alldawi L, Takahashi M, Narita M, Ayres F, Tsukada N, Osman Y, Furukawa T, Aizawa Y. Effect of prostaglandin E2, lipopolysaccharide, IFN-gamma and cytokines on the generation and function of fast-DC. *Cytotherapy.* 2005;7:195-202.
- 3) Abe S, Hanawa H, Hayashi M, Yoshida T, Komura S, Watanabe R, Lie H, Chang H, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Nakazawa M, Miyazaki J, Aizawa Y. Prevention of Experimental autoimmune Myocarditis by Hydrodynamics-Based Naked Plasmid DNA Encoding CTLA4-Ig Gene Delivery. *J Card Fail.* 2005 Sep;11(7):557-64.
- 4) Elnaggar R, Hanawa H, Liu H, Yoshida T, Hayashi M, Watanabe R, Abe S, Toba K, Yoshida K, Chang H, Minagawa S, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Aizawa Y. The effect of hydrodynamics-based delivery of an IL-13-Ig fusion gene for experimental autoimmune myocarditis in rats and its possible mechanism. *Eur J Immunol.* 2005 Jun;35(6):1995-2005.
- 5) Fuse K, Kodama M, Okura Y, Ito M, Kato K, Hanawa H, Aizawa Y. Short-term prognostic value of initial serum levels of interleukin-10 in patients

with acute myocarditis. *Eur J Heart Fail.* 2005 Jan;7(1):109-12.

- 6) Liu H, Hanawa H, Yoshida T, Elnaggar R, Hayashi M, Watanabe R, Toba K, Yoshida K, Chang H, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Nakazawa M, Aizawa Y. Effect of hydrodynamics-based gene delivery of plasmid DNA encoding interleukin-1 receptor antagonist-Ig for treatment of rat autoimmune myocarditis: possible mechanism for lymphocytes and noncardiac cells. *Circulation.* 2005 Apr 5;111(13):1593-600.
- 7) Mitsuma W, Ito M, Kodama M, Fuse K, Okamura K, Minagawa S, Kato K, Hanawa H, Toba K, Nakazawa M, Aizawa Y. Cardioprotective effects of recombinant human erythropoietin in rats with experimental autoimmune myocarditis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;344:987-994
- 8) Chang H, Hanawa H, Yoshida T, Hayashi M, Liu H, Ding L, Otaki K, Hao K, Yoshida K, Kato K, Toba K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Aizawa Y. Alteration of IL-17 related protein expressions in experimental autoimmune myocarditis and inhibition of IL-17 by IL-10-Ig fusion gene transfer. *Circ J.* 2008 May;72(5):813-9.
- 9) Watanabe R, Hanawa H, Yoshida T, Ito M, Isoda M, Chang H, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Ding L, Hao K, Kato K, Kodama M, Aizawa Y. Gene expression profiles of cardiomyocytes in rat autoimmune myocarditis by DNA microarray and increase of regenerating gene family. *Transl Res.* 2008 Sep;152(3):119-2
- 10) Obata H, Yanagawa B, Tanaka K, Ohnishi S, Kataoka M, Miyahara Y, Ishibashi-Ueda H, Kodama M, Aizawa Y, Kanagawa K, Nagoya N. CNP infusion attenuates cardiac dysfunction and inflammation in myocarditis. *BBRC* 2007;356:60-66
- 11) Palaniyandi SS, Nagai Y, Watanabe K, Ma M, Veeraveedu PT, Prakash P, Kamal FA, Abe Y, Yamaguchi K, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y. Chymase inhibition reduces the progression to heart failure after autoimmune myocarditis in rats. *Exp Biol Med.* 2007 Oct;232(9):1213-21.
- 12) Chang H, Hanawa H, Liu H, Yoshida T, Hayashi M, Watanabe R, Abe S, Toba K, Yoshida K, Elnaggar R, Minagawa S, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Aizawa Y. Hydrodynamic-Based Delivery of an Interleukin-22-Ig Fusion Gene Ameliorates Experimental Autoimmune Myocarditis in Rats. *The Journal Immunology* 2006;117:3635-3643

2. 学会発表

・Influence of heme on cultured cells from heart.第12回日本心不全学会

・Expression of hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction 第72回日本循環器学会総会

・Iron related protein and influence of heme in rat myocarditis. The 25th Annual Meeting of ISHR Japanese Section

・Crosstalk between component cells in rat autoimmune myocarditis with cytokine/chemokine The 25th Annual Meeting of ISHR Japanese Section

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

生物学的製剤

国際出願 (PCT/JP2008/051457)

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

日本循環器学会留学生優秀論文賞

Liu H, Hanawa H, Yoshida T, Elnaggar R, Hayashi M, Watanabe R, Toba K, Yoshida K, Chang H, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Nakazawa M, Aizawa Y. Effect of hydrodynamics-based gene delivery of plasmid DNA encoding interleukin-1 receptor antagonist-Ig for treatment of rat autoimmune myocarditis: possible mechanism for lymphocytes and noncardiac cells. *Circulation*. 2005 Apr 5;111(13):1593-600.

- 1) 糸球体腎炎と無菌性心内膜炎を合併する PR3-ANCA 関連血管炎
- 2) 血管炎・腎炎の免疫グロブリンの治療に関する研究（免疫グロブリン大量療法の臨床的試み）

研究分担者 今井圓裕 大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学 准教授

研究要旨： 1) ANCA 関連血管炎は通常細小動脈を中心におこり、糸球体、肺毛細血管がその傷害の中心となる。最近、われわれは PR3-ANCA 関連血管炎の合併症として、糸球体腎炎に無菌性心内膜炎を示した症例を 2 例経験した。このため、ANCA 関連腎炎に無菌性心内膜炎を合併する症例について文献的考察を行った。これまで我々の 2 症例を含めて 15 例が報告されている。これらの症例に共通して認められるのは発熱、全身倦怠感、体重減少、血尿、腎機能低下、貧血、皮下出血などに加えて、大動脈弁の障害が主に認められることと、PR3-ANCA が全例陽性であるが、MPO-ANCA は全例陰性であることである。細菌性心内膜炎で ANCA 抗体陽性となる症例があるが、治療法が異なるため、鑑別診断は慎重に行うことが必要である。ANCA 関連血管炎の新しい疾患概念として、PR3-ANCA に合併する糸球体腎炎と無菌性心内膜炎の可能性を示唆するものであると考える。

2) ANCA 関連腎炎に対する免疫グロブリン大量療法の効果と安全性を検討を臨床的に行った。ANCA 関連腎炎による急速進行性糸球体腎炎を呈している患者 2 名に対して γ グロブリン大量療法を行い、その治療効果について検討し、感染予防・治療効果の点において、いずれも良好な治療成績を得た。

A. 研究目的

1) ANCA 関連血管炎は通常細小動脈の障害が中心であり、大動脈の障害は稀である。最近、大阪大学医学部附属病院で見られた ANCA 関連糸球体腎炎に無菌性心内膜炎を合併する 2 症例を経験したため、PR3-ANCA 関連血管炎のあたらしい表現系であると考え、これまでに報告された症例に関して文献的考察を加えて報告する。

2) ANCA 関連腎炎に対する免疫グロブリン大量療法の効果と安全性を検討する

B. 研究方法

1) 大阪大学医学部附属病院で ANCA 関連糸球体腎炎に無菌性心内膜炎を合併した 2 症例を経験したため、これらの症例について病理的検討を行い、さらに Pub Med を使用して、ANCA 関連腎炎と心内膜炎あるいは心臓弁膜症を合併した症例について文献的考察を加えた。

2) ANCA 関連腎炎による急速進行性糸球体腎炎を呈している患者に対して γ グロブリン大量療法を行い、その治療効果について検討した。また、本治療の治療効果に対す

る多施設共同研究のプロトコール作成・症例登録に参加し、その結果の解析に協力した。

C. 研究結果

1) 1例目は11歳にて発症したPR3-ANCA関連糸球体腎炎の男性で、腎不全に至り、その後腎移植を受けたが、ANCA関連腎炎が再発し、さらに心内膜炎の合併した症例である。血液培養は陰性で、抗菌薬には反応せず、ステロイドパルス療法と免疫抑制薬により軽快した。この症例は、大動脈弁の無冠尖に穿孔し、大動脈弁閉鎖不全を認めた(写真1)。肺炎で死亡後の剖検で大動脈弁の線維化と癒着化を認めた。

2例目は67歳のPR3-ANCA関連腎炎の男性で、経口ステロイドによる治療中に無菌性心内膜炎を発症し、大動脈弁置換術を受けた症例である。

文献的に無菌性心内膜炎を発症するANCA関連糸球体腎炎を調べると、全例で15症例が報告されており、いずれもPR3-ANCA陽性であるが、MPO-ANCAは陰性であった。これらの症例に共通するのは、強いANCA関連血管炎の症状が続き、糸球体腎炎に加えて、大動脈弁の障害が認められることである。

2) 本院で2症例のANCA関連腎炎に対してγグロブリン大量療法を行い、いずれも良好な治療成績を得た。また、本症例中1例がB型肝炎の感染症の合併があったが、いずれも経過中顕在化することなく本治療法の安全性が示された。

D. 考案

1) ANCA関連血管炎は本来細小動脈を中心に炎症が起こり、大血管に炎症が及ぶことは少ない。ANCA関連腎炎に無菌性心内膜炎

が合併することは稀である。特に、MPO-ANCA関連腎炎では報告が少ない。われわれは、最近経験した2症例が、無菌性心内膜炎を呈したので、文献的な考察を行った。その結果、これまで我々の2症例を含めて15例が報告されていることを確認した。これらの症例に共通して認められるのは発熱、全身倦怠感、体重減少、血尿、腎機能低下、貧血などに加えて、大動脈弁の障害が主に認められることと、PR3-ANCAが全例陽性であるが、MPO-ANCAは全例陰性であることである。

心内膜炎にANCA抗体が陽性となるのは2つのケースが報告されている。1つは細菌性心内膜炎の経過中にANCA抗体が陽性となるもので9症例が報告されている。この場合のANCA抗体はPR3-ANCA陽性が多いが、MPO-ANCAが陽性となる場合もある。2つ目はこれまで報告してきた、PR3-ANCA関連糸球体腎炎に無菌性心内膜炎を合併するものである。両者の特徴を表1に示す。

この2つ症候群は心内膜炎の原因が細菌とPR3-ANCA抗体との異なり、治療法も抗菌薬と免疫抑制薬と異なるため、鑑別診断は慎重に行うことが必要である。

2) ANCA関連腎炎による急速進行性糸球体腎炎は6ヶ月後生命予後が70%程度であり、極めて予後の悪い疾患である。γグロブリン大量療法を行った2症例ではいずれも生命予後、腎予後とも良好であり有効な治療法と考えられた。今後、人工γグロブリンの開発により本治療法の安全性が向上し、より一般的な治療法となることが期待される。

E. 結論

1) ANCA 関連血管炎の新しい疾患概念として、PR3-ANCA に合併する糸球体腎炎と無菌性心内膜炎の可能性を示唆する症候群が存在すると思われる。

2) ANCA 関連腎炎に対してγグロブリン大量療法を行い、良好な治療成績を得た。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

Iwatani H, Nagasawa Y, Oka K, Isaka Y, Imai E: Valvular injury in a patient with PR-3-ANCA-associated glomerulonephritis. Nat Clin Pract Nephrol 4: 576-582, 2008

2. 学会発表

国内会議

Yasuyuki Nagasawa, Enyu Imai: A Case of ANCA associated nephropathy along with chronic B hepatitis treated by IVIG, International conference on Regulation of inflammatory Diseases Vasculaitis and asthma 2008 in chiba Jan, 18-19,2008

PR3-ANCA を合併する非感染性心内膜炎

2008.10.24 第14回MPO研究会

於東邦大学大森病院 教育棟

大阪大学大学院老年・腎臓内科学

岩谷博次、長澤康行、岡 一雅、猪阪善隆、

今井圓裕

第37回日本腎臓学会西部学術大会

大量γグロブリン (IVIG) 療法が著効した、慢性B型肝炎合併、MPO-ANCA 関連腎炎の一例

永原麗、飯尾健一郎、富田弘道、古松慶之、濱野高行、長澤康行、伊藤孝仁、今井圓裕

第38回日本腎臓学会西部学術大会

大量γグロブリン (IVIG) が著効したMPO-ANCA 関連腎炎の一例

飯尾麗、林大祐、上田仁康、富田弘道、濱野高行、長澤康行、楽木宏実、今井圓裕、猪阪善隆

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

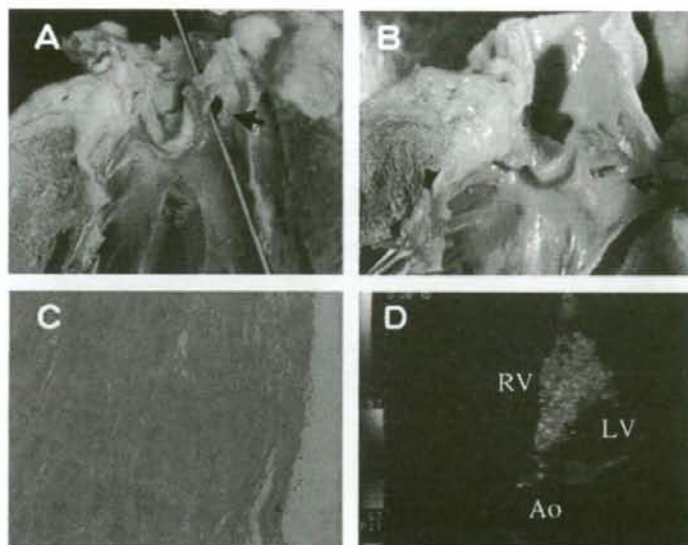


図1 糸球体腎炎と無菌性心内膜炎を合併する PR3-ANCA 関連血管炎
 A. B. 無冠尖に穿孔を認める。C. 大動脈弁は線維化と癒痕化をしめす。
 D. 心臓超音波で見られる大動脈弁の逆流

表 1 PR3-ANCA 関連腎炎に合併する無菌性心内膜炎と細菌性心内膜炎に発症する ANCA 抗体の比較

	Noninfective endocarditis associated with PR3-ANCA glomerulonephritis	Infective endocarditis evoking ANCA
Clinical findings		
Heart sounds	Aortic valve stenosis or aortic valve stenosis and regurgitation	Mitral valve stenosis or aortic valve stenosis
Fever	High fever	High fever
Cutaneous symptoms	Splinter hemorrhages	Splinter hemorrhages, Osler's nodes
General condition	Malaise, weight loss	Malaise, weight loss
Hematuria	Common	Common
Renal insufficiency	Common	<15% of cases
Anemia	Common	70-90% of cases
Presence of PR3-ANCA in the literature	15 out of 15 reported cases	7 out of 9 reported cases
Presence of MPO-ANCA in the literature	0 out of 15 reported cases	2 out of 9 reported cases
Bacterial culture	Negative	Positive
Pathological features of cardiac involvement	Mainly affects the aortic valve Increased fibrous tissue and inflammatory cell infiltration	Aortic valve is more commonly affected than the mitral valve Verrucous vegetations from bacteria or thrombi
Treatment	Corticosteroids and immunosuppressants; valve-replacement surgery is sometimes required	Penicillin G and aminoglycosides Surgery to repair or replace damaged valves, remove vegetations, or drain abscesses

Abbreviations: ANCA, antineutrophil cytoplasmic antibody; MPO, myeloperoxidase; PR3, proteinase 3.