

投与群における MPO-ANCA 値の有意な低下が認められた (図 6)。

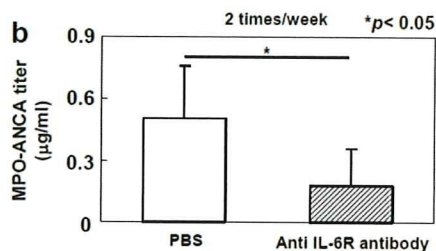


図 6. 抗 IL-6R 抗体投与時の MPO-ANCA 値の低下

・ミゾリビン投与による MPO-ANCA 値の変化: MPO-ANCA 値に低下傾向が認められた。治療による血清中サイトカイン・ケモカインの変化

・抗 IL-6R 抗体およびミゾリビン投与によるサイトカイン・ケモカインの変化: 有意な変化が見られたものはなかった。

・CAWS 誘導マウスへのミゾリビン治療効果

ミゾリビン投与による冠状動脈炎の軽減が認められた (図 7)。

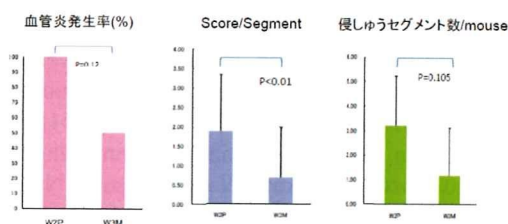


図 7. ミゾリビン投与による冠状動脈炎の軽減  
ミゾリビン投与による血中サイトカイン・ケモカインの低下が認められた (図 8)。

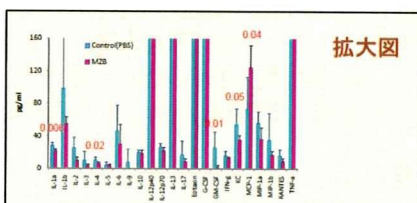
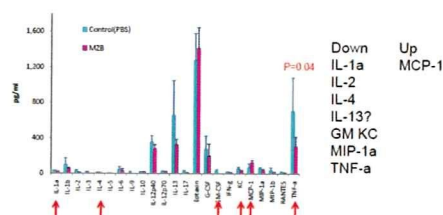


図 8. ミゾリビン投与による血中サイトカイン・ケモカインの低下

#### D. 考察

本研究では、血管炎 RPGN や川崎病の発症

に關与する因子を特定することで、その因子をターゲットとした治療法の評価ができる。人工ガンマグロブリンの治療効果を判定する方法として、モデルマウスでの治療方法を検討した。

RPGN の発症に伴って有意に変化したサイトカイン・ケモカインの内、半月体形成率と有意な相関が認められた IL-6, MCP-1 が、半月体形成に寄与している可能性が示唆された。MPO-ANCA 値が有意な低下が認められたことから、IL-6 が少なくとも自己抗体の産生に寄与していることが推察された。また、MPO-ANCA は初期段階で疾患活動性との相関が高いものの、活動期以後には疾患活動性と相関せず、MPO-ANCA 値が低下しても病態が改善しない場合もあるという報告がある。

本研究においても、MPO-ANCA によって刺激を受けた好中球が、sIL-6R を乖離し、血中の IL-6 と複合体を形成することにより、内皮細胞の活性化、MCP-1 などの放出、炎症性細胞のリクルートや接着に寄与し、半月体形成を誘導している可能性が考えられる。

次に、ミゾリビン投与による、尿所見、半月体形成率、MPO-ANCA 値、糸球体への IgG の沈着に緩和傾向が認められたことから、ミゾリビンが緩解維持に作用している可能性が推察された。

DSG 投与では、蛋白尿、白血球尿が有意に抑えられ、対照群に見られるような半月体形成、糸球体への IgG の沈着も抑えられ、MPO-ANCA 値が DSG 投与量依存的に低下したことから、DSG の自己抗体価を低下させる効果について確認することができた。これは、活性化 B リンパ球に直接作用し抗体産生能を抑制するという DSG の作用によるものと考えられる。また、2 次リンパ組織の腫脹の軽減は、対照群に見られた CD3+B220+細胞が DSG 投与によって減少したことによると考えられる。さらに、DSG 投与により有意な減少が認められた IL-2, IL-12(p40), MIP-1β が発症因子の候補として新たに浮かび上がった。

これらの結果は、免疫グロブリン、人工ガンマグロブリンとともに、DSG が寛解導入薬としての有用性があり、ミゾリビンのような副作用の少ない薬剤を維持療法薬として併用することで、奏功を得られる可能性が推察された。

一方、CAWS 誘導の「冠状動脈炎モデル」に、ミゾリビン投与することで、冠状動脈炎の減少、上昇した炎症性サイトカインの低下が認められた。

以上より、これらの治療法による評価項目は、

人工ガンマグロブリンの前臨床を施行する際に重要な知見として浮かび上がった。

## E. 結論

人工ガンマグロブリンによる血管炎発症の治療効果を判定する目的で、RPGN 自然発症する SCG/Kj 「RPGN モデルマウス」および CAWS 誘発の「冠状動脈炎モデルマウス」を開発してきた。本年度は、RPGN 発症に伴って半月体形成率と有意な相関が認められた IL-6, MCP-1 の内、抗 IL-6R 抗体投与により IL-6 の RPGN 発症への関与を解析し、抗 IL-6R 抗体により MPO-ANCA の低下が認められた。ANCA 関連腎炎の寛解維持療法としての有効性が期待されているミゾリピンにより、緩和傾向が認められた。さらに、DSG 投与によって IL-2, IL-12(p40), MIP-1β の有意な低下が認められた。以上より、IL-6 が初期の自己抗体産生への関与が示唆され、新たな発症因子として IL-2, IL-12(p40), MIP-1β が挙げられた。また、免疫グロブリンと同様に DSG の寛解導入薬としての有用性が認められた。一方、CAWS 誘導の「冠状動脈炎モデル」に、ミゾリピン投与することで、冠状動脈炎の減少、上昇した炎症性サイトカインの低下が認められた。これらのモデルマウスの治療の成績から、モデルマウスの有用性と、人工ガンマグロブリンによる血管炎発症の治療効果の判定マーカーとして有用であることが示された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Kazuo Tomizawa, Tomokazu Nagao, Reina Kusunoki, Kan Saiga, Masamichi Oshima, Kazuo Kobayashi, Toshinori Nakayama, Masaru Tanokura, Kazuo Suzuki. Reduction of MPO-ANCA epitopes in SCG/Kj mice by 15-Deoxyspergualin treatment restricted by IgG2b associated with crescentic glomerulonephritis Rheumatol. 2010; in press
2. Kei Takahashi, Toshiaki Oharaseki, Noriko Nagi-Miura, Naohito Ohno, Akiko Ishida-Okawara, Hitomi Yamada, Yoshiaki Kaneshiro, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki. Administration of human immunoglobulin inhibited development of vasculitis in a murine model of vasculitis induced with CAWS, Candida albicans water soluble fraction. Modern Rheumatol. 2009 Nov 27. [Epub ahead of print]
3. Akihiro Hasegawa, Katsuhiko Hayashi, Hiroyuki Kishimoto, Meng Yang, Soichi Tofukuji, **Kazuo Suzuki**, Hiroshi Nakajima, Robert Hoffman, Mutsunori Shirai, Toshinori Nakayama. Color-coded real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model. J Allergy Clin Immunol 2010;125:461-8..
4. Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, Simon DI, Stavrakis G, Shimosawa T, Xiao L, Nagahama Y, Suzuki K, Fujita T, Mayadas TN. Circulation. 2009; 120:1255-65..
5. Miura NN, Komai M, Adachi Y, Osada N, Kameoka Y, **Suzuki K**, Ohno N. IL-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice as assessed by comparison with Bruton's tyrosine kinase-deficient CBA/N mice. J Immunol. 183(5):3417-24 (2009).
6. Yuka Osaki, Yasuhiro Maehara, Masaki Sato, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Tomokazu Nagao, **Kazuo Suzuki**, Shoji Kawachi. Analysis of cytokines in broncho-alveolar lavage fluids of patients with ARDS: Increase of IL-6, G-CSF, MCP-1, MIP-1β. JJSICM(Journal of Japanese Society of Intensive Care. in press 2009.
7. Shoji Kawachi, San Thi Luong, Mika Shigematsu, Hiroyuki Furuya, Thuy Thi Bich Phung, Phuc Huu Phan, Hiroyuki Nunoi, Liem Thanh Nguyen, **Kazuo Suzuki**. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome followed by avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. J. Infectious Dis. 2009; 200: 510-515.
8. Chiaki Kaga, Shigeyuki Nomura, Mina Okochi, Tomoko Nozu, Tomokazu Nagao, Atsushi Nagai, Toshinori Nakayama, **Kazuo Suzuki**, Hiroyuki Honda. Screening of epithelial cell-adhesive peptides from fibronectin loop region and its cell specificity. J Chem. Engineering Japan 2009; 4:298-302.
9. Tomoko Nozu, Mitsuko Kondo, **Kazuo Suzuki**, Jun Tamaoki, Atsushi Nagai. A Comparison of the Clinical Features of ANCA-Positive and ANCA-Negative Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients. Respiration 2009;77:407-415.

### 書籍

1. 長尾朋和、鈴木和男 ANCA 関連血管炎と Neutrophil Extracellular Traps(NETs、好中球細胞外補足構造) リウマチ科 (科学評論社) in press
2. 長尾朋和、鈴木和男 MPO-ANCA 関連血管炎と血管内皮細胞 「腎臓と透析」東京医学社 in press
3. 鈴木和男 ANCA 関連血管炎モデルマウスの新知見 「脈管学」メディカルトリビューン社 in press
4. 鈴木和男 ナノ粒子の知恵の塊-ドラッグデリバリーシステムのイメージング 技術評論社刊 「光る生き物—ここまで進んだバイオイ

- メーキング技術」 pp140-153、2009年11月1日刊行
5. 長尾朋和、鈴木和男「好中球機能異常による血管炎・腎炎」、細胞(ニューサイエンス社)、41(2)、pp.60-63、2009.
  6. 長尾朋和、鈴木和男「ANCA 関連血管炎」ANCA 関連血管炎—発症機構解析・モデルマウス・新たな治療法—炎症と免疫(先端医学社)、2009年17卷(6)11月 707-713
2. 学会発表
- 【国内学会】
1. 平橋淳一、他 ANCA 関連血管炎と Neutrophil シンポジウム「ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合」第52回日本腎臓学会学術総会 横浜 平成21年6月3-5
  2. 長尾朋和、鈴木和男 MPO-ANCA が直接誘導する糸球体血管内皮細胞活性化の分子機構 シンポジウム「ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合」第52回日本腎臓学会学術総会横浜 平成21年6月3-5日
  3. 鈴木和男 総合討論：ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合 シンポジウム「ANCA 関連血管炎—基礎と臨床の融合」第52回日本腎臓学会学術総会 横浜 平成21年6月3-5日
  4. 常賀、他 IVIg 治療による活性化血管内皮細胞からのサイトカイン産生調節機序の解析 第74回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2009年6月26-27日
  5. 三浦典子、他 CAWS血管炎に対するIL-10 遺伝子治療の効果 第74回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2009年6月26-27日
  6. 鈴木和男 「プライマリーケア医が血管炎を見つける」血管炎の国際情報普及フォーラム、栃木、2009年9月20日
  7. 第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
  8. Yoshitomo Hamano et al., Genetic dissection of dendrocytosis related to the pathogenesis of ANCA related systemic vasculitis: lessons from SCG/Kj mouse model. 第15回MPO研究会、09年11月7-8日 栃木
  9. 藤元昭一、他 宮崎県におけるANCA 関連血管炎の疫学調査—発症率と欧米との差異を明らかにするために—第15回MPO研究会、09年11月7-8日、栃木
  10. 小林茂人、他 抗好中球細胞質抗体(ANCA) 関連血管炎など疫学調査の種類と考え方—欧米と日本の差異：発症率と罹病率：population-based study と hospital-based study—第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
  11. 武曾恵理、他 MPO-ANCA 陽性MPA へのIVIg 療法の急性期の血中サイトカインケモカインに対する抑制効果. 第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
  12. 村上央、他 GM-CSF 遺伝子導入マウスのCAWS 反応性. 第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
  13. 鈴木和男 好中球研究の新たな展開. 第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
  14. 宇野賀津子、他 MPO-ANCA 腎炎患者のインターフェロンシステムの特徴：健常人、IgA 腎症との比較から. 第15回MPO研究会、2009年11月7-8日、栃木
  15. 鈴木和男 ANCA 陽性の間質性肺炎：最近の話題 ANCA 陽性の間質性肺炎 第27回呼吸器・免疫シンポジウム 2009年11月21日、東京
  16. Miyuki Omori-Miyake et al., A role of LECT2, leukocyte cell-derived chemotaxin 2, in experimental sepsis. 39回日本免疫学会、12月2-4日、大阪
  17. Reina Kusunoki et al. Involvement of Interleukin-6 in RPGN of SCG/Kj mice. 39回日本免疫学会、12月2-4日、大阪
  18. Tomokazu Nagao et al., A mouse model of pauci-immune glomerulonephritis induced by monoclonal anti-LAMP-2 antibody.. 39回日本免疫学会、12月2-4日、大阪
- 【国際学会】
1. Kazuo Suzuki Discussion Leader 'Myeloperoxidase and the heart' 6th International Human Peroxidase Meeting April 19-22, 2009, Chapel Hill, North Carolina, USA.
  2. Kazuo Suzuki, Yoshitomo Hamano. Role of the 'Man-1' cluster gene region on chromosome-1 in response in MPO-ANCA vasculitis genetic dissection of vasculitis, MPO-ANCA production, and related traits in scg/kj mice. 6th International Human Peroxidase Meeting April 19-22, 2009, Chapel Hill, North Carolina, USA.
  3. Kazuo Tomizawa et al. Association of risk epitopes of MPO-ANCA with renal failure in SCG/Kj mice showing crescentic glomerulonephritis. 6th International Human Peroxidase Meeting April 19-22, 2009, Chapel Hill, North Carolina, USA.
  4. Kazuo Suzuki. Lecture on Epitope of MPO-ANCA in Workshop-I: Epitope specificity. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
  5. Toshiko Ito-Ihara et al. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark

6. Eri Muso et al., Specific cytokines and chemokines as the predictor of clinical and pathological activity and chronicity in patients with ANCA-ANCA-positive MPA. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
  7. Toshiaki Oharaseki et al., Histopathology of late-stage arteritis in murine systemic vasculitis induced by polysaccharide of *Candida albicans*, as animal model of Kawasaki disease. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark.
  8. Kazuo Suzuki et al., Japan-UK-EU Project Members. Risk Epitopes of MPO-ANCA in Patients with MPA in Japan. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
  9. Kei Takahashi et al., Effect of anti-TNF-alpha medicaments in mice vasculitis model caused by *Candida albicans* water soluble fraction. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
  10. Kazuo Tomizawa et al., Risk Epitopes of MPO-ANCA in SCG/Kj mice. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
  11. Kazuko Uno et al., Comparison of plasma cytokine/chemokine levels and IFN-alpha production capacity amongst healthy subjects, patients with MPO-ANCA positive MPA, and IgA nephritis. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
  12. Shouichi Fujimoto et al., Incidence and clinical phenotype of ANCA-associated renal vasculitis: comparison between Japan and the UK. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
  13. Junichi Hirahashi et al., Dietary enrichment with eicosapentanoic acid (EPA) prevents anti-neutrophils cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
  14. Yoshitomo Hamano et al., Genetic dissection of leukocytosis related to spontaneously occurring crescentic glomerulonephritis in a model of SCG/Kj mice. The American Society of Nephrology The 42nd Annual Meeting and Scientific Exposition October 27 to November 1, 2009. San Diego, USA
  15. Kazuo Suzuki. Role of Neutrophils and Myeloperoxidase in Severe Lung Injury in Mice with influenza infection, Seminar in NIAID-NIH, Oct 15, 2009, Bethesda, USA
  16. Hamano et al. Genetic Dissection of Leukocytosis Related to Spontaneously Occurring Crescentic Glomerulonephritis in a Model of SCG/Kj Mice. ASN Meeting, Oct. October 29, 2009, USA.
  17. Eri Muso et al., IVIg therapy for acute phase MPO-ANCA positive systemic vasculitis—New horizon of therapy with evidence of suppressive effect on acute cytokine and chemokine storm—Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
  18. K. Takahashi et al. CAWS-induced murine vasculitis and Kawasaki disease. Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
  19. Tomokazu Nagao et al. Development of murine crescentic glomerulonephritis model using anti-MPO and anti-LAMP-2 antibodies. Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
  20. Yoshitomo Hamano et al. Genetic dissection of aberrant T cell activation related to the pathogenesis of ANCA related systemic vasculitis in a model of SCG/Kj mice. Inflammation Program (炎症制御学セミナー), 2010年1月15日-15日, 千葉
- 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

## フリーのヘムによる自然炎症の検討

研究分担者 相澤義房 所属 新潟大学大学院医歯学総合研究科 役職 教授  
研究協力者 塙 晴雄 所属 新潟大学大学院医歯学総合研究科 役職 講師  
研究協力者 小玉 誠 所属 新潟大学大学院医歯学総合研究科 役職 准教授

**研究要旨：**人工グロブリンによる血管炎や臓器炎に対する治療の有効性を検討する上で、その炎症の機序を明らかにすることが重要である。近年、これらの炎症の進展に、細胞死によって放出される内因性の物質が、自然免疫を活性化し、炎症をさらに進展する機序があることがわかってきた。たとえば、熱ショック蛋白、ヒアルロン酸、ファイブロネクチン断片、尿酸などは *danger signal* として、炎症のカスケードをトリガーし、炎症を進展させることが報告されている。一方最近我々は、ラット自己免疫性心筋炎の心筋細胞を分離し、正常の心筋細胞と DNA microarray で遺伝子発現を検討した結果、いくつかの鉄代謝に関連する蛋白（Lipocalin-2/NGAL、Hepcidin、HO-1）が著明に増加することを明らかにした。この蛋白の臓器障害における役割は不明な点が多いが、この現象は、鉄を含有するある物質が、炎症を促進させる”*danger signal*”になるのではないかと仮説を想定させる。我々は、この仮説に基づき、フリーのヘムが心臓の在住細胞に対して、炎症誘発蛋白、活性酸素種（ROS）を産生するのではないかと考え、正常心臓から培養した細胞を用いて、定量的 RT-PCR、ELISA、Flow cytometry にて検討した。その結果、フリーのヘムは、炎症性サイトカイン、ケモカイン、プロスタグランジンおよび細胞内 ROS をこれらの細胞に対して強力に誘導することが明らかになった。フリーのヘムは主に心臓在住マクロファージに作用し、さらにこのマクロファージが平滑筋細胞や線維芽細胞などとクロストークしてこれらの蛋白を強力に誘導すると考えられた。さらにフリーのヘムの細胞内シグナルに NF- $\kappa$ B が重要な役割をしていることが示唆された。

### A. 研究目的

心臓での炎症を考える上で、鉄含有物質が、*danger signal* になりうるか否かを検討する。またそのときに、その標的細胞を検討し、細胞内の機序を検討する。心臓の炎症と自然免疫との関わりを検討する。

### B. 研究方法

#### 1, 心臓在住培養細胞と培養法

ラットの両心室を生理食塩水で十分洗って細かく刻んだ後、コラゲナーゼ中で、37°C、20 分間インキュベートし、茶こしを用いてすりつぶして細胞を分離した。35-mm 穴の dish に RPMI1640 溶液（10% 非働化済み FBS 入り）中で 2-3 週間培養した。CD11bc 陰性心臓在住培養細胞は、さらに MACS マグネット細胞ソーティングシステムを用い

て、CD11bc 陽性細胞を除去して精製した後に、同様に 2-3 週間培養した。

## 2, 初代培養細胞、細胞株および培養法

初代正常ラット大動脈平滑筋培養細胞 (RASMCs)、初代正常ラット心臓毛細血管内皮細胞 (RHMVEC) は CS-C 培地キットで、初代正常ラット心臓線維芽細胞はラット線維芽細胞成長培地で、NR8383 ラットマクロファージ細胞株は、Ham's F12K medium でそれぞれ培養した。

## 3, ヘム刺激および ROS、プロテアーゼ阻害薬による抑制

心臓在住培養細胞、各種初代培養細胞および細胞株に、20  $\mu$ M のヘミンを加え、経時的に細胞を採集した。また ROS 産生の阻害作用をもつスーパーオキシドスカベンジャーである tiron を hemin 付加の 3 時間前から培養液に加え、プロテアーゼ阻害薬は、hemin 付加の 1 時間前から 25  $\mu$ M TPCK あるいは 300  $\mu$ M TLCK を培養液に加えた。

## 4, フローサイトメトリー

心臓から分離した細胞および MACS マグネット細胞ソーティングシステムで CD11bc 陽性細胞を除去した CD11bc 陰性心臓在住細胞を、抗ラット CD11bc 抗体 (OX-42) で染色し、フローサイトメトリー (FACScan; BD Pharmingen) にて解析した。細胞内の ROS の測定は、心臓在住培養細胞と CM-H2DCFDA 色素液を用いて、hemin (20  $\mu$ M) を添加後 60 分間インキュベートし、フローサイトメトリーにて解析した。

## 5, 培養細胞染色

心臓在住培養細胞の特徴を同定するため、上記のように分離した細胞を Lab-Tek II chamber slides で 2 週間同様に培養し、マウス抗  $\alpha$ -smooth muscle actin 抗体、ウサ

ギ抗 factor VIII-related Ag 抗体、ウサギ抗 rat collagen type III 抗体あるいはマウス抗ラット CD11bc 抗体 (OX-42) とビオチン化抗ウサギ・マウス抗体 anti-rabbit and anti-mouse Igs を用いて染色した。

## 6, RNA 抽出と定量的 RT-PCR

上述した検体から総 RNA を抽出し、cDNA を合成し、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-2、CINC-1、CINC-2、CCL5、G-CSF、GM-CSF、Cox-2、PGES、iNOS、HO-1、Lipocalin-2/NGAL についてライトサイクラーにて測定した。

## 7, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

培養上清を採集し、その上清中の IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  の値を Rat IL-1 $\beta$  ELISA Kit および Rat TNF- $\alpha$  ELISA Kit を用いて測定した。

## C. 研究結果

### 1, 心臓在住培養細胞の特徴

心臓在住培養細胞は、大部分が線維芽細胞あるいは平滑筋細胞と思われる細胞と考えられ、一部が CD11bc 陽性のマクロファージ、ごく少数の細胞が内皮細胞と考えられた。フローサイトメトリーでは、培養直前の細胞は、約 10% が CD11bc 陽性細胞のマクロファージあるいは好中球で 2-3 週間培養した後の細胞は、約 10% がマクロファージであった。

### 2, ヘミンによる細胞内 ROS 産生

ヘミン刺激 1 時間後、心臓在住培養細胞内の ROS の産生は明らかに増加し、Tiron によってほぼ完全に抑えられた。

### 3, ヘミンによる炎症促進蛋白発現

心臓在住培養細胞はヘミン刺激によって、

IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-2、CINC-1、CINC-2、CCL5、G-CSF、GM-CSF、Cox-2、PGES、iNOS および HO-1、Lipocalin-2/NGAL の急激で著明な遺伝子発現の上昇がみられ、培養上清中に IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白の産生上昇もみられた。しかし、CD11bc 陰性の心臓在住培養細胞あるいは初代培養細胞のヘミン刺激では、その上昇はほぼ消失していた。一方ラットマクロファージの細胞株 NR8383 のヘミン刺激では、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の顕著で著明な発現上昇がみられ、CD11bc 陰性の心臓在住培養細胞に直接 IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  で刺激をしたところ、様々な炎症促進蛋白の顕著な上昇が認められた。

4、ヘミンによる炎症促進蛋白発現に対する ROS 産生およびプロテアーゼ阻害による影響

心臓在住培養細胞に、Tiron を加え、ヘミンで刺激しても、様々な炎症促進蛋白の顕著な上昇の抑制はみられず、TPCK、TLCK を加えると、様々な炎症促進蛋白の顕著な遺伝子発現上昇がほぼ完全に抑制された。

#### D. 考案

ヘミンと炎症との関わりについては、血管透過性亢進、接着因子の発現、IL-8 の発現の増強、MCP-1 の発現増強などいくつか報告がみられる。今回の我々の検討で得られた新たな知見は、一つには、正常心臓の在住細胞の培養細胞でも、ヘミンによる遺伝子発現が誘導されることが明らかになったことである。さらに、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-2、CINC-1、CINC-2、CCL5、G-CSF、GM-CSF、Cox-2、PGES などのたくさんの炎症促進因子、iNOS や

Lipocalin-2/NGAL の発現が、ヘミンによって強く誘導されたことも新たな知見である。また、この時に反応する細胞は、主に心臓在住マクロファージと考えられたことも新たな知見であり、今後局所のマクロファージにもっと注目して検討すべきものとする。またマクロファージだけでなく、マクロファージの産生する IL-1 や TNF- $\alpha$  が、平滑筋細胞、線維芽細胞などとクロストークし、様々な炎症促進蛋白の強い誘導がみられることも示唆された。以前の我々のラットの心筋炎の実験では、MCP-1、IL-6、Cox-2、PGES、CINC-2 を最も多く発現している細胞は、マクロファージではなく平滑筋細胞や線維芽細胞であったことから、在住マクロファージに加え、これらの細胞も重要であると我々は考えている。Wegenerらは、ヘミンをマウスに大量に静脈注射すると、肝臓に白血球の浸潤がみられると報告している。彼らのデータと我々のデータを考え合わせると、in vivo でも、ヘミンによって、心臓に白血球が浸潤してくる可能性があると思われる。心筋梗塞の場合、心筋細胞が壊れ、大量のフリーのヘムが心臓局所に生じると考えられる。心筋梗塞巣に大量の白血球が浸潤してくることは周知の事実であるが、ヘミンによるこのような炎症促進蛋白の誘導が、大きく関与しているのかもしれない。いずれにしても、フリーのヘムが、心臓に与える影響を今後さらに検討する必要があると思われる。

また心臓在住培養細胞に対する、ヘミンによる遺伝子発現誘導の機序であるが、今回の我々の検討では、Tiron によって細胞内 ROS を抑制しても、遺伝子発現の変化はみられなかった。一方、TPCK、TLCK などの

プロテアーゼ阻害薬によって、多くの遺伝子発現が明らかに抑制された。これらのプロテアーゼ阻害薬による発現誘導抑制効果は、NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B を介していることを強く示唆している。しかし HO-1 の発現誘導については、TPCK、TLCK によって、抑制ではなく逆に増強がみられた。このように、フリーのヘムによる発現誘導は、いくつかの異なるシグナルを介している可能性が考えられる。

#### E. 結論

組織傷害によって、炎症局所に放出、産生されると考えられるフリーのヘムは、心臓在住培養細胞に対して、強力に炎症促進蛋白の産生、細胞内 ROS の産生を誘導した。この蛋白の多くは、まず在住マクロファージがフリーのヘムに反応することによって IL-1 や TNF- $\alpha$  を産生し、これらに線維芽細胞、平滑筋細胞などが反応し、炎症促進蛋白産生が増幅されるものと考えられた。このとき、ROS 産生は、フリーのヘムによるこれらの発現誘導にはあまり関与せず、NF- $\kappa$ B を介する機序が深く関与するものと考えられた。今後、このような自然免疫、danger signal により引き起こされる炎症が、人工グロブリン治療によってどのような効果を示すのかを検討する必要があると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Isoda M, Hanawa H, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Hao K,

Ding L, Tanaka K, Takayama T, Kato K, Okura O, Kodama M, Ota Y, Hayashi J, Aizawa Y. Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. J Nutr Biochem. in press.

・ Ding L, Hanawa H, Ota Y, Hasegawa G, Hao K, Asami F, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Ogura M, Kodama M, Aizawa Y. Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis. Circ J. in press.

##### 2. 学会発表

・ Lipocalin-2 a New Biomarker of Inflammatory Heart Disease? 第73回日本循環器学会総会

#### 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。



## 菌体成分誘発性肺炎における食細胞機能異常の影響

研究分担者： 荒谷康昭 横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科・教授

### 研究要旨：

炎症誘発における食細胞由来の活性酸素の影響を個体レベルで知るために、gp91<sup>phox</sup> ノックアウトマウス (CGD マウス) における、菌体成分による誘発性肺炎の病態を解析した。まず、野生型および CGD マウスにザイモザンを経鼻投与すると、CGD マウスは野生型マウスよりも好中球性の肺炎が顕著に重篤化した。一方、リポポリサッカライド投与では両マウス間の肺炎の重篤度に有意な差は認められなかった。

### A. 研究目的

炎症誘発における食細胞由来の活性酸素の関わりを知ることを目的とした。食細胞 NADPH-オキシダーゼは、好中球や単球に存在し、病原体感染時に活性化して、酸素からスーパーオキシドを産生して殺菌に働く。本酵素複合体のうちの gp91<sup>phox</sup> を欠くノックアウトマウス (CGD マウス) の炎症病態の解析を実施した。

### B. 研究方法

野生型 C57BL/6 マウス（日本 SLC から購入）および CGD マウスは、8～10 週令の雌マウスを使用した。飼育管理は、公立大学法人横浜市立大学動物実験指針に準じた。

市販のザイモザンおよびリポポリサッカライド (LPS) を LPS フリーの PBS に懸濁し、各マウスに麻酔下で経鼻的に肺に投

与した。投与後 6 日目の肺症状を病理学的に解析し、比較検討した。

（倫理面への配慮）

実験動物は動物の保護及び管理に関する法律に準じて扱い、必要最小限の動物を使用した。やむを得ず動物を殺す際には、頸椎脱臼法で安楽死させた。

### C. 研究結果

野生型と CGD マウスにザイモザンを経鼻投与し、6 日目のマウスの肺組織切片 H&E 染色後を検鏡したところ、野生型マウスは、ごく軽度の肺炎が生じたに過ぎなかった。それに対して CGD マウスは、野生型マウスよりも重篤になり、その炎症は 30 日目まで持続した。炎症部位に集積した細胞のほとんどは好中球であった。

一方、LPS 投与 6 日目では、両マウスともに肺にわずかに炎症が生じていたが、同

量のザイモザンによって起こる炎症よりも遙かに弱かった (図 1)。

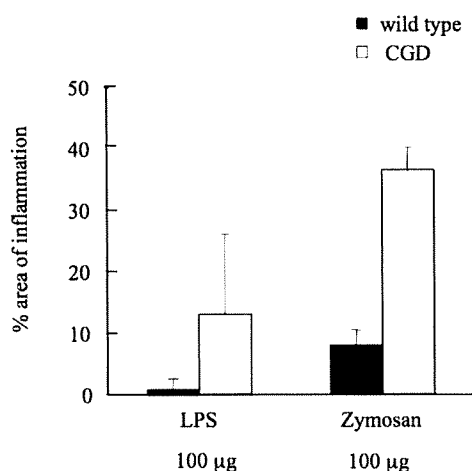


図 1. LPSまたはザイモザンを投与した際の炎症度の比較

#### D. 考察

CGD 患者は易感染を起こす。また、CGD マウスも殺菌力が極度に低下しているために重篤な肺炎が生じてしまうことも明らかにされている。ところが、ザイモザンという酵母菌体成分でも、CGD マウスの方が好中球性の肺炎が野性型マウスに比べて重篤となるという興味深い結果が得られた。食細胞からの活性酸素産生異常は、炎症を助長することが分かった。ただし、グラム陰性菌の菌体成分である LPS を投与した際には、軽度の炎症しか観察されなかったことから、菌体成分の種類によって食細胞由来の活性酸素の関与の度合いが異なることが示唆された。この理由を追求することは、炎症疾患の発症

機序の解明の一助になる。

#### E. 結論

食細胞からの活性酸素産生を欠如する食細胞機能異常マウスは、ある種の菌体成分の肺投与によって、重篤な肺炎を発症することが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

##### 国際会議

- 1) Aratani, Y., Umeki, Y., Nishikawa, N., Tozuka, S., Yoshida, M., Suzuki K: Myeloperoxidase deficiency enhances zymosan-induced acute lung inflammation by up-regulating KC and MIP-2. 7th International Peroxidase Meeting, USA, 2009. 4.
- 2) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Maeda, N., Koyama, H., Suzuki, K: *In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense against fungi. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009. 5.
- 3) Nagao, T., Dobashi, H., Yamamoto, K., Nakajima, N., Sato, Y., Tomizawa, K., Aratani, Y., Jun, Z., Todaka, R., Oshima, M., Sata, T., Kobayashi, K., Kawachi, S., Nakayama, T., Suzuki, K: Role of

Neutrophils and Myeloperoxidase in Lung Injury induced by Influenza A/H1N1 (PR-8) Infection in Mice. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, Denmark, 2009.6.

国内会議

- 1) 長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、中島典子、佐藤由子、荒谷康昭、鄒軍、戸高玲子、大島正道、佐多徹太郎、小林一夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男：インフルエンザ感染誘導による劇症型ARDS モデルマウスの作製とその発症機構の解析。第74回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2009年6月（京都）
- 2) 長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、中島典子、佐藤由子、富澤一夫、荒谷康昭、鄒軍、戸高玲子、大島正道、佐多徹太郎、小林和夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男：インフルエンザウイルスPR-8(H1N1)感染による肺傷害機構の解析。第20回日本生体防御学会学術総会 2009年7月（東京）
- 3) 吉田后那、山本桂、鈴木和男、荒谷康昭：ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球のケモカイン産生能の解析。第15回MPO研究会 2009年11月（栃木）
- 4) 荒谷康昭：The Structure and Function of Myeloperoxidase. 第15回MPO研究会 2009年11月（栃木）
- 5) Tomizawa, K., Nagao, T., Sugamata, R., Aratani, Y., Kobayashi, K.,

Kawachi, S., Nakayama, T., Suzuki, K: Role of neutrophils and myeloperoxidase in lung injury induced by influenza A/H1N1 (PR-8) Infection in Mice. 第39回日本免疫学会学術集会 2009年12月（大阪）

- 6) 荒谷康昭、吉田后那：好中球機能異常による炎症性腸疾患の解析。第17回食細胞機能異常症研究会 2009年12月（東京）
- 7) 山本 桂、吉田后那、鈴木和男、荒谷康昭：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス好中球のケモカイン産生能の促進。2010年度日本農芸化学会大会 2010年3月（東京、発表予定）
- 8) 松本典子、吉田后那、荒谷康昭：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス好中球のザイモザン貪食能の促進。2010年度日本農芸化学会大会 2010年3月28日（東京、発表予定）

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

## MPO-ANCA陽性血管炎へのIVIgによる急性期治療の可能性 —サイトカインストーム抑制効果のエビデンス—

研究分担者：武曾恵理 財団法人田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科部長  
研究協力者：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  
立石 悠：財団法人田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科医員  
古宮俊幸：財団法人田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科副部長  
岩崎由加子：財団法人田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科客員研究員  
猪原登志子：財団法人田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科医員  
鈴木和男：千葉大学大学院医学研究院・特任教授

**研究要旨：**MPO-ANCA陽性全身血管炎である顕微鏡的多発血管炎は我が国の急速進行性糸球体腎炎(RPGN)の多くを占め、欧米と異なり、微小血管炎の多くがこの疾患であり、対応が急務である。この疾患の初期には、各種炎症性サイトカインやケモカインが血中でストームとなって上昇することが知られており、これらは本疾患の臨床的、組織学的病態パラメーターと有意な相関を示すことが、本研究班の研究過程で、明らかとなってきており、その報告を重ねてきた。一方、急性期のこの病態に対する治療において、免疫抑制剤の多用による副作用を和らげ、さらに免疫補助療法としての、 $\gamma$ グロブリン大量療法(IVIg)の有用性は、すでにこの班から世界に発信しているところであるが、その効果発現機所の一部には、IVIgによる活性化好中球やマクロファージの抑制効果の結果として、サイトカインストームの鎮静があると考えられる。H21年度は急性期患者の治療前後の血漿のサイトカイン、ケモカイン測定をおこない、そのエビデンスを検討した。結果として、多くの急性期に異常に上昇した血中サイトカイン、ケモカインはIVIgの大量療法で低下を示したが、とくに、炎症性所見と相関の深い M-CSF、IL18 と、同時に発現する組織修復性サイトカイン SCF は有意な低下をきたした。今後の人工グロブリン開発時の血管炎治療の効果発現パラメーターとして、これらのサイトカイン類を追跡することの有用性が示唆された。

### A. 研究目的

MPO-ANCA陽性のMPAでは、急性期には血中に炎症性サイトカイン、ケモカインのストームが起こるが、この時期に発症する急速進行性糸球体腎炎は特異的な半月体形成をともなう、病理所見を呈する。これらの病理所見パラメーターの疾患活動性の指標としての有用性に関

しては、H19年度より、圧倒的にMPAの頻度が高いわが国から特異的なパラメーターの発信を行い、生検時の臨床所見パラメーターおよび、同時に多数の測定が可能なBioPlexによるサイトカインレベルとも比較して、病理マーカーと特異的に関連のあるサイトカインを同定して提唱してきた。さらにこのサイトカインストー

ムが、本疾患特異的であり、疾患特異的な臨床検査所見や、さらなる病理所見との相関性があることも確認した。今年度は、従来からこの班会議で発表してきた、急性期のIVIgの病態改善効果発現の背景に、このサイトカインストームの鎮静作用がどのようにかかわっているかを検討し、人工グロブリン開発後の本疾患での治療効果のパラメーターとなりうるサイトカインの候補を追及した。

## B. 方法

1) 症例: 28 例の MPO-ANCA 陽性高齢 MPA 患者 (原則として、治療前) と、対象として正常人 53 例を比較した。

2) IVIg 療法: 23 症例 (52—83 歳) の MPA 患者に、急性期に IVIg 療法を行った。治療は IVIg 単独で行った症例を解析対象とした。大量 IVIg 療法 (IVIg) は 献血グロブリン 400mg/kg/日 x 5 日 で 17 例、に 施行した。一方、少量 IVIg (5000mg/日 x 3 日間: 重症感染症を伴った症例に対する保険適応量) 療法を 6 例に行った。これらについては、尿所見、CRP、腎機能、などの疾患活動性所見も IVIg 前後で検討した。

3) サイトカイン測定: Bioplex 法により PDGF-bb, IL-1 b, 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, Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF  $\alpha$ , VEGF, IFN- $\alpha$ 2, IL-1 $\alpha$ , IL-2Ra, IL-3, IL-12p40, IL-18, CTACK HGF, M-CSF,, MIF, MIG, SCF, TNF- $\beta$  の 39 種類の測定を病態急性期と IVIg 療法前後に行った。一方、PDGF-bb, IL-1 b, 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, Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10,

MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF  $\alpha$ , VEGF の 27 種類は、正常人と比較した。

## C. 結果

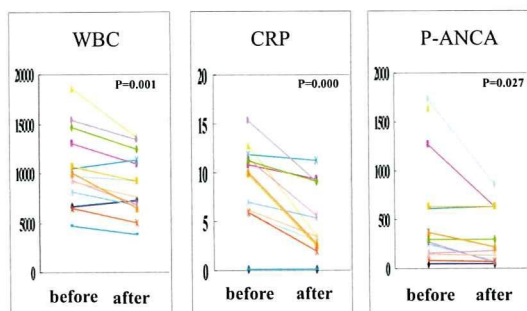
1) 正常人とのサイトカイン、ケモカインの急性期での比較: 表 1 に示すように、PDGF-bb, IL-1 b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGFbasic, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF  $\alpha$ , VEGF の 27 種のサイトカイン・ケモカインの測定で、PDGF-bb, 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, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , VEGF, が有意に MPA 患者で上昇を示し、サイトカインストームの様相を呈していた。

表 1. 正常人、MPA(治療前)の血中サイトカインケモカイン (27biplex)

	Healthy subjects	MPA	p
n	58	28	
IL-1b	0.077	0.383	0.19
IL-1ra	2.24	2.522	0.072
IL-2	0.279	0.602	0.044
IL-4	-0.064	0.079	0.93
IL-5	0.618	1.654	<0.0001
IL-6	-0.08	0.31	0.0029
IL-7	-0.273	0.1665	0.0069
IL-8	1.259	1.536	0.0183
IL-9	1.68	2.398	<0.0001
IL-10	0.525	1.071	0.0002
IL-12p70	0.399	1.241	<0.0001
IL-13	0.173	0.508	0.013
IL-15	0.884	0.845	0.9
IL-17	0.348	0.988	<0.0001
Eotaxin	1.701	1.71	1
FGFbasic	1.32	1.511	0.09
G-CSF	0.676	0.839	0.88
GM-CSF	0.888	1.435	0.0021
IFN- $\gamma$	1.156	1.657	<0.0001
IP-10	2.453	2.97	<0.0001
MCP-1	1.819	1.95	0.109
MIP-1a	0.165	0.472	0.0097
MIP-1b	2.01	2.147	0.0334
PDGF	2.247	2.919	<0.001
TNF- $\alpha$	0.481	0.794	0.279
VEGF	1.27	2.04	<0.0001

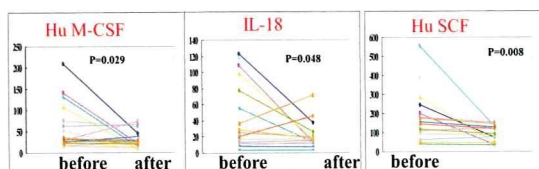
2) IVIg 療法を行った 17 症例では有意な炎症所見、および尿所見の改善を認めた。(図 1) miniIVIg でも改善傾向を認めた。

図1:IVIg大量療法による臨床データの改善(N=17)



3) サイトカイン・ケモカインの IVIg 前後の比較では、uFGFbasic, IL-1 $\alpha$ 、IL-2R $\alpha$ 、IL3, IL18, M-CSF, MIG, SCF, TNF- $\beta$  の有意な低下をみとめたが miniIVIg では、CTACK と SCF の低下を見たのみであった。とくに、以前の検討で組織学的活動度と優奈相関を認めたが、M-CSF, IL8、と、組織修復性(硬化病変)に相関の高かったSCFはともに有意な低下を診た(図2)

図2:活動性組織所見と相関のあったサイトカインMCSF, IL18、と組織硬化所見に関連のあったSCFのIVIgによる変動



#### D. 考察

本研究班で、従来から確認されてきた MPO-ANCA 関連腎炎血管炎急性期のサイトカインストームに対し、IVIg大量療法は多種類のサイトカインを同時に抑制して鎮静化をもたらすことが確認された。これらの変化は、単独のIVIg療法で確認され、直後に同時にもたらされていることから、大量のIVIgは末梢血中の

サイトカインそのものの回収にも働いていると考えられる。一方、それと同時に、MCSF, IL18など、ケモカインの抑制を通して、新たなマクロファージや好中球のリクルートを抑制することが考えられ、これらからもたらされるサイトカインの放出を抑えていることも重要と考えられた。さらに、昨年度の組織病変との相関で認識された、硬化病変に相関のあったSCFの発現も抑制されていることから、SCFの誘導は壊死性病変を誘導する各種炎症性サイトカインの発現と同期して怒っていること。炎症性サイトカインの鎮静化とも同期していることが観測された。さらに、少量の重症感染症抑制に用いられる量のIVIgも、いくつかの炎症性サイトカインの抑制力は認められており、感染症が明らかかな時の最初の治療としては推奨されると思われた。これらは人工グロブリン開発後の治療効果確認のパラメーターとして、どのサイトカインをターゲットにするかという課題に重要な示唆を与える知見であり、本疾患の病態の背景を検討するうえでも重要な情報とおもわれた。

#### E. 結論

MPO-ANCA 陽性血管炎であるMPAの活動期におこるサイトカイン、ケモカインストームに対し、IVIg 大量療法は単独で、鎮静化をもたらし、とくに組織の活動性と連動しているサイトカイン、ケモカインの抑制は組織崩壊を食い止める効果に寄与している可能性を示唆した。人工グロブリン開発後にその効果発現を感知する臨床的パラメーターとして有用な候補サイトカインの絞り込みに役立つ知見をえた。

#### F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表  
(英文論文)

1. Shimosawa M, Sakamoto K, Tomari Y, Kamikado K, Otsuka H, Liu N, Kitamura H, Uemura K, Nogaki F, Mori N, Muso E, Yoshida H, Ono T.: Lipopolysaccharide-Triggered Acute Aggravation of Mesangioproliferative Glomerulonephritis through Activation of Coagulation in a High IgA Strain of ddY Mice. *Nephron Exp Nephrol.*;112(4):e81-e91. 2009 Jun 16 [Epub ahead of print]
2. Koyama A, Yamagata K, Makino H, Arimura Y, Wada T, Nitta K, Nihei H, Muso E, Taguma Y, Shigematsu H, Sakai H, Tomino Y, Matsuo S, Japan RPGN Registry Group. :A nationwide survey of rapidly progressive glomerulonephritis in Japan: etiology, prognosis and treatment diversity. *Clin Exp Nephrol.* 2009 Dec;13(6):633-50. Epub 2009 Jun
3. Tanaka M, Yamada S, Iwasaki Y, Sugishita T, Yonemoto S, Tsukamoto T, Fukui S, Takasu K, Muso E: Impact of Obesity on IgA Nephropathy: Comparative Ultrastructural Study between Obese and Non-Obese Patients *Nephron Clin Pract* 112:c71-c78 2009

(和文論文)

1. 武曾惠理：血管炎における IVIG 療法 特集Ⅱ炎症性疾患・免疫疾患におけるγグロブリン大量静注療法 炎症と免疫 Vol. 18 No. 2 2009 先端医学社
2. 武曾惠理：壊死性血管炎と急速進行性糸球体腎炎 診断：治療に急を要する腎臓病 *Medicina* 2009 Vol. 46 no13
3. 武曾惠理：腎不全患者さんのリスクとの長いお付き合いをともに歩む 腎不全を生きる 日本腎臓財団 Vol. 40 2009
4. 武曾惠理：成人の腎炎・ネフローゼ症候群に対する治療の動向 日本小児腎臓病学会雑誌 Vol. 22 2009
5. 武曾惠理、井尻好雄：慢性腎不全（保存期）今日の治療方針 2009 別刷
6. 武曾惠理：3. 急速進行性糸球体腎炎、ANCA 関連腎炎において血漿交換療法、大量γグロブリン療法は有効なのでしょうか？ C 急速性糸球体腎炎、ANCA 関連腎炎 EBM 腎臓病の治療 2008-2009 富野康日巳 監修、柏原直樹 南学正臣 編集、中外医学社、pp. 69-73.
7. 武曾惠理：2. 単状糸球体硬化症。III. 治療方針・治療法。 A. 一次性糸球体疾患。腎疾患・透析 最新の治療 2008-2010 年度版、飯野靖彦、槇野博史、秋澤忠男 編集、南江堂、pp. 109-113,

## 2. 学会発表

(国際学会)

1. Eri Muso, Kensuke Joh, Kazuko Uno, Toshiko Ihara, Yukako Iwasaki, Toshiyuki Komiya, Kazuo Suzuki: Specific cytokines and chemokines as the predictor of clinical and pathological activity and chronicity in patients with MPO-ANCA positive MPA. 14<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop. 2009.6.10 (Lund, Sweden)
2. Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Shigeto Kobayashi, Kazuko Uno, Naoto Tamura, Yuji Yamanishi, Atushi Fukatsu, Richard A. Watts, David G. Scott, David R. Jayne, Kazuo Suzuki, and Hiroshi Hashimoto. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe. 14<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop. 2009.6.10 (Lund, Sweden)
3. Kazuko Uno, Eri Muso, Toshiko Ito-Ihara, Katsumi Yagi, Setusya Fujita, and Kazuo Suzuki. Comparison of plasma cytokine/chemokine levels and IFN-alpha production capacity amongst healthy subjects, MPO-ANCA-positive MPA patients, IgA nephritis. 14<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop. Lund, Sweden. 2009.6.10 (Lund, Sweden)

(国内学会)

1. 武曾惠理、宇野賀津子、岩崎由加子、立石悠、古宮俊幸、猪原登志子、鈴木

和男:MPO-ANCA 陽性血管炎へのIVIgによる急性期治療の可能性-新たなわが国における治療の動向とサイトカインストーム抑制効果のエビデンス-炎症制御学セミナー、共催厚生労働省科学研究創薬事業 人口ガンマグロリン平成21年度第2回班会議 2010.1.15 (千葉)

2. 宇野賀津子、武曾惠理、猪原登志子、鈴木和男:MPO-ANCA 腎炎患者のインターフェロンシステム-健常人、IgA腎症との比較から-炎症制御学セミナー、共催厚生労働省科学研究創薬事業 人口ガンマグロリン平成21年度第2回班会議 2010.1.16 (千葉)
3. 宇野賀津子、武曾惠理、猪原登志子、鈴木和男:MPO-ANCA 腎炎患者のインターフェロンシステムの特性:健常人、IgA腎症との比較から第15回MPO研究会 2009.11.8 (栃木)
4. 武曾惠理、宇野賀津子、岩崎由加子、立石悠、古宮俊幸、猪原登志子、鈴木和男:MPO-ANCA 陽性MPAへのIVIg療法の急性期の血中サイトカインケモカインに対する抑制効果 第15回MPO研究会 2009.11.7 (栃木)
5. 草部牧子、古宮俊幸、遠藤知美、佐藤有紀、近藤直哉、立石悠、米倉由利子、飛野杏子、米本智美、塚本達雄、武曾惠理; ANCA関連血管炎に膜性腎症を合併した2例 第39回日本腎臓学会西部学術大会 2009.10.16 (和歌山)
6. 米倉由利子、草部牧子、佐藤有紀、近藤直哉、立石悠、古宮俊幸、米本智美、塚本達雄、武曾惠理: MPO-ANCA陽性を伴い腎・血管病変を呈した若



- 年姉妹例の報告 第39回日本腎臓学会西部学術大会 2009.10.16 (和歌山)
7. 武曾惠理：RPGNの治療 第50回和歌山腎疾患勉強会特別講演 2009.9.17 (和歌山)
  8. 米倉由利子、塚本達雄、草部牧子、佐藤有紀、近藤直哉、立石悠、飛野杏子、糟野健司、古宮俊幸、米本智美、深澤晃、武曾惠理：血漿交換療法とステロイド投与を併用した抗GBM抗体関連腎炎3症例 第30回日本アフエレンス学会 2009.9.12 (札幌)
  9. 武曾惠理：抗サイトカイン療法は血管炎症候群に臨床応用できるのか 第74回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2009.6.26 (京都)
  10. 小野孝彦、下沢真木子、坂本興嗣、泊裕輝、上門弘平、大塚秀隆、劉寧、北村久代、上村秀和、野垣文昭、森典子、武曾惠理、吉田治義：IgA腎症モデルマウス HIGA における Toll-like receptor4 の発現増加と LPS 投与による凝固系活性化・腎炎増悪 第39回京都腎臓免疫研究会 2009.6.13 (京都)
  11. 米倉由利子、佐藤有紀、近藤尚哉、立石悠、飛野杏子、古宮俊幸、米本智美、福内史子、塚本達雄、武曾惠理：ステロイド治療を行い全身状態の安定を得た進行型抗GBM抗体関連腎炎3症例についての報告 第52回日本腎臓学会学術総会 2009.6.5 (横浜)
  12. 立石悠、佐藤有紀、近藤尚哉、米倉由利子、飛野杏子、古宮俊幸、福内史子、米本智美、塚本達雄、武曾惠理：急速進行性糸球体腎炎の臨床像を呈しステロイドが奏効した管内増殖性腎炎の臨床病理学的検証 (ポスター) 第52回日本腎臓学会学術総会 2009.6.4 (横浜)
  13. 平野正太郎、上村和秀、北村久代、野垣文昭、武曾惠理、吉田治義、伊藤正樹、小野孝彦：HIGA マウス F1 における AT1a 受容体過剰発現による細胞増殖・基質増生刺激 第52回日本腎臓学会学術総会 2009.6.4 (横浜)
  14. 武曾惠理、城謙輔、宇野賀津子、猪原登志子、古宮俊幸、鈴木和男：顕微鏡的多発血管炎における血中サイトカイン・ケモカインの特性—IgA腎症との対比— 第52回日本腎臓学会学術総会 2009.6.3 (横浜)
  15. 武曾惠理、宇野賀津子、岩崎由加子、猪原登志子、立石悠、古宮俊幸、鈴木和男；MPO-ANCA陽性MPAへのIVIg療法前後での多様なサイトカイン・ケモカインの動向～bioplex法による多種同時測定の見直し 国際炎症治療フォーラム 共催 厚生労働省科学研究創薬事業 人口ガンマグロリン平成21年度第1回班会議 2009.5.15 (千葉)
  16. 武曾惠理：厚生労働省科学研究創薬事業 人口ガンマグロリン研究班 これまでの臨床研究のまとめと今後のプロトコル提案 国際炎症治療フォーラム 共催 厚生労働省科学研究創薬事業 人口ガンマグロリン平成21年度第1回班会議 2009.5.15 (千葉)
  17. 宇野賀津子、武曾惠理、猪原登志子、鈴木和男：サイトカイン動態からみた、in vitro 人工ガンマグロリン評価系の確立 国際炎症治療フォーラム 共催 厚生労働省科学研究創薬事業 人口ガ

ンマグローリン平成21年度第1会班会  
議 2009.5.15 (千葉)

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

## 大量免疫グロブリン療法は急性期川崎病血管炎において 心筋ストレスマーカー- BNP/NTproBNP 値-を低下させる

研究分担者：佐地 勉 東邦大学医療センター小児科 教授  
研究協力者：高月晋一 東邦大学医療センター小児科 助教  
研究協力者：監物 靖 東邦大学医療センター小児科 助教  
研究協力者：高橋 啓 東邦大学医療センター大橋病院病理、教授  
研究協力者：小林 徹 群馬大学小児科 助教

**研究要旨：**免疫グロブリン（IVIG）大量療法の心筋ストレスマーカーに対する効果を血中 BNP/NTproBNP にて評価した。その結果、両者とも正常域の時は IVIG 単回投与に反応することが多いが、約 2/3 にみられる両者の上昇例では IVIG 単回では効果が少なく、追加治療を必要とすることが多かった。結論として BNP/NTproBNP は IVIG の心筋ストレスマーカーへの影響を判定するのに有効である。

### A. 研究目的

急性期川崎病(aKD)において、心筋ストレスマーカーである brain natriuretic peptide (BNP)と amino-terminal pro-fragment brain natriuretic peptide (NTproBNP)が上昇すると報告されている。我々は既に BNP 値と心エコー上の心筋拡張能低下が関連することを報告しているが、免疫グロブリン（IVIG）の心筋ストレスマーカーに及ぼす影響は良く解っていない。

### B. 研究方法

**対象：**31 例(男 16 例、女 15 例、年齢;中央値; 1 歳、3 ヶ月～148 ヶ月)の aKD の典型例を対象とした。大量 IVIG 療法前後に血漿 BNP(CLEIA法)と血清 NTproBNP(ECLIA法)を測定し炎症性マーカー、心エコー上の左室駆出率との相関を検討した。また、IVIG 反応例と不応例で、治療前値を検討した。

IVIG 投与量:2g/kg/day

不応例への追加療法: Steroid Pulse:10 例、  
Infliximab: 3 例  
炎症性マーカーとして、WBC、CRP,%  
neutrophile を測定し比較した。

### C. 研究結果

Table1 に、症例の Profile を示す。Table2 に BNP,NT proBNP の IVIG 前後の値を示す。  
BNP  
平均値は、34.5、NT pro BNP は 581pg/ml であった。BNP も NT proBNP も IVIG 後には有意に( $p < 0.05$ )低下していた。BNP,NTproBNP の正常例と、異常高値例における追加療法を要した症例の比較では、BNP 高値例 20 中 16 例、NT proBNP 高値例 27 例中 8 例では追加療法を必要とする症例があり、正常値より多い傾向があった。

#### D. 考案

aKD には急性期の特有な心筋炎様の低心機能状態が見られる。IVIGはこの急性期の心筋ストレスマーカーである、BNP,NT-proBNPを有意に減少させた。症例の60%程度で異常高値を示す症例では追加療法を必要とする傾向があり、これらの心筋ストレスマーカーは重症度の新たな指標となる可能性がある。

#### E. 結論

IVIG治療の有効性を判定する指標の一つとして、心筋ストレスマーカーであるBNP, NT-proBNPは有用性が高いと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 佐地勉：特集にあたって（特集 成人期における川崎病安城動脈瘤を考える）. *Vascular Medicine*.6 (1):1, 2010
2. Muro T, Maruyama Y, Onishi K, Saze M, Okada E, Matsuura H, Saji T: Mimicking Kawasaki disease in bumed children: Report of four cases. *Burns*, 35: 594-599, 2009
3. Kobayashi T, Inoue Y, Otani T, Morikawa A, Kobayashi T, Takeuchi K, Saji T, Sonobe T, Ogawa S, Miura M, Arakawa H: Risk stratification in the decision to include prednisolone with intravenous immunoglobulin in primary therapy of Kawasaki disease. *Pediatr Infect Dis J*. 28(6):498-502, 2009
4. Hirono K, Kemmotsu Y, Wittkowski H, Foell D, Saito K, Ibuki K, Watanakbe K, Watanabe S,

Uese K, Kanegane H, Origasa H, Ichida F, Roth J, Miyawaki T, Saji T: Infliximab reduces cytokine-mediated inflammation but does not suppress cellular infiltration of the vessel wall in refractory Kawasaki disease. *Pediatr Res*, 65 (6) : 696-701, 2009

5. Takatsuki S, Ito Y, Takeuchi D, Hoshida H, Nakayama T, Matsuura H, Saji T: IVIG Reduced Vascular Oxidative Stress in Patients With Kawasaki Disease. *Circ J*, 73(7): 1315-8, 2009

6. 荻野廣太郎、佐地勉、濱岡建城、菌部友良：特集 川崎病－第33回禁忌川崎病研究会－我が国における難治性急性期川崎病に対する infliximab 療法の現状－3回の使用実態調査結果から－. *Progress in Medicine* 29:1722-1727, 2009.7

7. 佐地勉:急性期治療 ウリナスタチン療法. 小児科臨床ピクシス 9 川崎病のすべて. 中山書店: 106-108.東京、2009.7

8. 佐地勉、鈴木啓之、市田露子、小林徹: 川崎病急性期治療の最前線 冠動脈瘤を作らないための治療オプション. *Pharma Medica*. 27 (3) :167-175、2009.3

##### 2. 学会発表

###### 【国内学会】

1. 佐地勉:川崎病の up-to-date: IVIG に不応の難治例への治療 option.第124回日本小児科学会岩手地方会, 盛岡, 2009.12
2. 佐地勉:肺高血圧症の新しい考え方と治療薬の選択.第1回広島小児肺高血圧研究会, 広島, 2009.12
3. 小島泰子、監物靖、池原聡、嶋田博光、高月晋一、中山智孝、佐藤真理、松裏