

201009007A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究

人工ガンマグロブリンの製剤化への
安全性と臨床試験にむけた
評価系の確立

(H21-政策創薬-一般-004)

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 23 年 (2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究

人工ガンマグロブリンの製剤化への
安全性と臨床試験に向けた
評価系の確立

(H21-政策創薬-一般-004)

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 23 年 (2011) 年 3 月

人工ガンマグロブリンの製剤化への安全性と 臨床試験にむけた評価系の確立

研究代表者：所属施設：千葉大学大学院医学研究院 特任教授
氏名：鈴木 和男

研究分担者

亀岡 洋祐：(独)医薬基盤研究所 主任研究員
大野 尚仁：東京薬科大薬学部 教授
高橋 啓：東邦大学医療センター 教授
荒谷 康昭：横浜市立大学大学院 教授
宇野賀津子：(財)ルイ・パストゥール医学研究センター 室長
野島 博：大阪大学微生物研究所 教授
平橋 淳一：東京大学医学部附属病院 助教
長尾 朋和：千葉大学大学院医学研究院 特任講師
山本 健二：国立国際医療研究センター研究所 国際臨床センター センター長
武曾 恵理：(財)田附興風会医学研究所北野病院 副所長、腎臓内科部長
佐地 勉：東邦大学医療センター小児科 教授
相澤 義房：新潟大学大学院内科 教授
小林 茂人：順天堂大学附属順天堂越谷病院 臨床教授
今井 圓裕：名古屋大学大学院医学研科 特任准教授
湯村 和子：自治医科大学医学部 教授
山縣 邦弘：筑波大学大学院医学研科 教授
有村 義宏：杏林大学医学部 教授
藤元 昭一：宮崎大学医学部附属病院血液浄化療法部 准教授
布井 博幸：宮崎大学医学部 教授
河内 正治：国立国際医療研究センター手術部 部長

【研究協力者・アドバイザー】

研究協力者：新井孝夫（東京理科大、教授）、本間栄（東邦大・医療センター大森病院、教授）、小野孝彦（市立島田市民病院、部長）、猪原登志子（財.田附興風会医学研究所北野病院、研究員）、鈴木章一（佐賀大学・医、助教）、大原関利章（東邦大・医療センター大橋病院、助教）、三浦典子（東京薬科大、講師）、中島裕史（千葉大院医、教授）、池田啓（千葉大院医、助教）、山崎力（東京大学、教授）、濱野慶朋（自治医科大学、准教授）、王 碧昭（筑波大学・院、教授）

アドバイザー：直江史郎（桐蔭横浜大、教授）、岡崎富男（呉共済病院、校長）、橋本博史（順天堂大・医、名誉教授）、中山俊憲（千葉大院医・免疫発生、教授）、David Jayne（英国 ケンブリッジ大学、教授）

目 次

I. 総括研究報告	
人工ヒト化ガンマグロブリンの製剤化にむけて	
鈴木和男	1
II. 分担研究報告	
1. 基礎分科会	
1) 人工ヒト化ガンマグロブリンの合成に関する研究	
人工免疫グロブリン合成に関する研究 VH-CH1-h 型人工ガンマグロブリンの構築と	
クローンの多様性の検討	
亀岡洋祐、大島正道、鈴木和男	12
2) 人工ヒト化ガンマグロブリンの評価法に関する研究	
2-1) GM-CSF 遺伝子導入マウスを用いた CAWS 誘発アナフィラキシー様ショック並びに血	
管炎の解析	
大野尚仁	18
2-2) 人工ガンマグロブリン評価法の確立	
宇野賀津子	23
2-3) 難治性血管炎の遺伝子解析	
野島 博	30
3) モデルマウスによる in vivo の評価法に関する研究	
3-1) CAWS 誘発血管炎モデルにおける抗 TNF- α 製剤の血管炎抑制効果の検討	
高橋 啓	34
3-2) 免疫グロブリンの評価法としてのモデルマウスの検討	
—血管内皮細胞標的分子 Moesin による評価法—	
長尾朋和、鈴木和男、高橋 啓、山本健二、河内正治、	37
3-3) 自己免疫性心筋炎の病態解析と IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーの IL-1 抑制作用の検討	
相澤義房	44
3-4) カンジダ死菌誘発性肺炎における食細胞機能異常の影響	
荒谷康昭	48
2. 臨床分科会	
1) 人工ヒト化ガンマグロブリンの臨床試験にむけた IVIg 治療に関する研究	
1-1) MPO-ANCA 陽性 MPA の急性期におけるサイトカイン・ケモカインの相互関係の解析と	
炎症逆相関性物質の検出、およびこれらへの IVIg 療法の影響の検討	
武曾恵理	52
1-2) 小児期血管炎の急性期川崎病における超大量単回免疫グロブリンの効果を Multiple	
Biomaker の変化から判定する	
佐地 勉	60
1-3) 糸球体病変を欠く MPO-ANCA 関連血管炎の一症例と病理的考察	
今井圓裕	65
1-4) RPGN・血管炎のアフェレシス療法の問題点と今後の課題	
山縣邦弘	70
1-5) 血管炎の早期発見の試み	
湯村和子	74
2) 臨床研究および疫学	
2-1) わが国のウェゲナー肉芽腫症の臨床症状に関する研究	
小林茂人	77
2-2) 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎の疫学～日本・英国間比較～	
藤元昭一、布井博幸	80
2-3) 抹消神経障害を有する寛解期 Chung-Strauss 症候群に対する大量 γ グロブリン療法の	
有用性	
有村義宏	84

2-4)エイコサペンタエン酸による ANCA 血管炎治療法の開発 平橋淳一	88
Ⅲ. 公開シンポジウム、班会議資料	91
Ⅳ. 研究成果の刊行に関する一覧表	98
Ⅴ. 研究成果の刊行物・別刷（主要のみ）	111

人工ガンマグロブリンの製剤化への安全性と臨床試験にむけた評価系の確立

— 人工ヒト化ガンマグロブリンの製剤化にむけて —

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

研究要旨：大量免疫グロブリン製剤 (IVIg) による治療法は、重症感染症や川崎病の治療として使用されている。また、高齢者に発症し増加している自己免疫疾患に、より有効な免疫補助療法としてその適応拡大が検討されはじめている。2010年1月に Churg-Strauss 症候群(CSS)への適応拡大が認可されるなど需要の増加に加え、血液製剤の安全性や医療経済の点からも、人工化することが今日的急務となっている。そこで、本研究では、免疫グロブリンの人工化を目的とし、これまでにマウス型の完成を基にヒト型を構築した。本年度は、ヒト型の臨床試験に向けてプロトタイプクローンの構成を絞り込み、モデルマウスでの評価に加え、*in vitro* での体外評価法も検討した。具体的には、1) ヒト型人工ガンマグロブリンのクローンの絞り込み、2) モデルマウスによる力価判定法と評価マーカの検討、3) 体外診断法の開発の検討：免疫系と血管内皮細胞、4) **臨床治験をみすえた臨床研究：**血管炎の治療成績の新知見と状況準備、人工免疫グロブリンの安全性の向上についても臨床サイドからの動物実験の評価と治療法のバックアップ、を中心に研究した。以上のように、ヒト型人工免疫グロブリンの *in vivo* と *in vitro* の評価法ができた。一方、IVIg 治療の効果判定の有効性のパラメーターの選択は、欧州血管炎協会 (EUVAS) でも採用されており、**国際評価会議**に当班からも運営委員2名、オブザーバとして2名が参加して討論に加わり、わが国も ACR/EULAR の新基準策定メンバーとなった。本研究事業の成果を臨床に生かし、国民の保健・医療ならびに効率的な医療経済に応えるようにしたい。

A. 研究目的

高度高齢社会に入ったわが国においては、加齢によって増加する重症感染症、自己免疫疾患、血管炎、リウマチなどの難治性疾患への初期治療として、ステロイドパルス治療は、高齢者には危険性が高いことから、免疫グロブリン製剤大量療法 (IVIg) の必要性が増している。また、2010年1月に Churg-Strauss 症候群(CSS)への適応拡大が認可されるなど需要の増加に加え、血液製剤の安全性や医療経済の点からも、人工化することが今日的急務となっている。感染症リスク・安全性確保や高額治療のため、免疫グロブリンの人工化が望まれている。

本年度は、**1) ヒト型人工ガンマグロブリンのクローンの絞り込み：**これまでに得られているプロトタイプのヒト型クローンを絞り込むことを目的とした。また、**2) モデルマウスによる力価判定法と評価マーカの検討：**血管炎 IVIg 治療法の開発のためのモデルマウスに種々の治療法の検討と、

上記モデルマウスによる力価と治療マーカを選定する。**3) 体外診断法の開発の検討：**ヒト型の臨床応用に向けて、血管炎、腎炎、急性期川崎病における IVIg の *in vitro* での体外評価法の開発をめざす。特に、anti-MPO 抗体の糸球体血管内皮細胞への作用の利用、Bio-Plex による多項目のサイトカイン・ケモカインの網羅的解析、免疫細胞の機能評価法を検討する。さらに、**4) 臨床治験をみすえた臨床研究：**急性期川崎病および、それと同じプロトコルによる、血管炎・腎炎の臨床研究の成果 (Nephron Clin Pract. 102:c35-c42, 2005) を基にヒト型に特化した治療効果判定や臨床治験に向けた動物モデルでの治療を評価・支援する。

これらの目的にフォーカスを絞り、臨床探索試験も含め臨床応用の準備を開始し、人工免疫グロブリンの安全性の向上についても臨床サイドからの動物実験の評価と治療法のバックアップをする。

B. 研究方法

詳細は、各分担報告を参照

1. 基礎分科会

1) 人工ガンマグロブリンの構築、クローンの解析、培養と精製：VH-CH1-hinge-6xHis の構成による人工ガンマグロブリン重鎖 Fab の単鎖フラグメントとして設計した。totalRNA より VH-CH1-hinge 領域 c DNA を RT-PCR により増幅し、pBAD ベクターにクローニングし、2 万クローンを含むライブラリーを作成し、その中からランダムに 1000 クローンを抽出した。塩基配列解析によりガンマグロブリン VH-CH1-hinge を正しく発現できるクローンを選択しアミノ酸配列を用いてクラスター解析を行った。これらのクローンについて、菌体抽出液をウェスタンブロットし、抗ヒト Fab 抗体によりグロブリンペプチドの発現を確認した。

2) 人工ガンマグロブリンの血管炎モデルマウス (SCG/kj マウス) での力価判定：SCG/kj マウスへの投与実験：10 週齢メスマウスに対して、腹腔内投与を 3dose で行い、対照としてヒトグロブリン製剤の適用量に従った 400mg/kg/day を 5 日間連続投与した。3 週間の経過観察の後、麻酔下で血液、腎臓、肺、心臓、脾臓を採材し、重量測定、血液成分分析を行った。

3) *in vitro* 評価系による力価判定：健常人および、寛解期にある血管炎である MPO-ANCA 腎炎患者から静脈血をヘパリン採血し、採取した血液をイーグル MEM にて 4 倍に希釈した。その後、25 μ g/ml の PHA を添加。96 well plate には、事前に 0.008, 0.04, 0.2 mg/ml モノバレント hScFv を蒸留水にて希釈し、一晚固相化した。CO₂ インキュベーターにて培養、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。

4) モデルマウスおよび評価系の検討

4-1) SCG/Kj 半月体形成腎炎モデルマウス：マウス：SCG/Kj マウス (日本化薬、雌) initial phase 群：6~7 週齢、active phase 群：14~15 週齢、また薬剤投与群：8~10 週齢、Control 用マウス：C57BL/6 (日本クレア、雌 9~10 週齢) を SPF 環境下にて千葉大学医学部動物室で飼育・投与実験に使用した。ウロペーパー (栄研化学) を用いて尿蛋白、尿潜血 (ヘモグロビン・赤血球)、白血球を測定した。血清採取：ネンブ

タールで安楽殺したマウスから心採血し、30 分間室温で静置し、5000 rpm、4°C で 15 分間遠心後、上清を回収した。

4-2) MPO-ANCA 標的分子 Moesin の同定：ウェスタンブロット法及び PMF 解析により確定した。好中球、単球、リンパ球と moesin 抗体の反応を FACS 解析した。

4-3) CAWS 誘導冠状動脈炎による他の治療法：C57BL/6N マウス (4 週齢、雄) に対し *Candida albicans* water soluble fraction (CAWS) 4mg を連続 5 日間腹腔内接種した。次いで、インフリキシマブ (I 群) およびエタネルセプト (E 群) を複数回、腹腔あるいは皮下投与した。実験 5 週目に屠殺、大動脈起始部および冠状動脈のステップ標本を作製し、汎血管炎の発生頻度、血管炎の広がりおよび炎症の程度を病理組織学的に検討した。屠殺時に採取した血漿を用い、Bio-Plex、ELISA 法にて炎症性サイトカインを測定した。

尚、他の基礎研究の「方法」は、当該報告を参照。

2. 臨床分科会

1) 血管炎の病態と IVIG 治療

1-1) 21 例の MPO-ANCA 陽性高齢 MPA 患者の IVIG 治療：治療前急性期の臨床および病理学的パラメーターを対象とした。このうち 17 例には IVIg 大量療法を行った。

1-2) 臨床パラメーター：尿所見、末梢血像、CRP、補体系、ANCA を含む自己抗体、さらに病理所見として、従来当研究班で提唱している各種パラメーターを用いた。

1-3) Bioplex 法による解析：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- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF α , VEGF, IFN- α 2, IL-1 α , IL-2Ra, IL-3, IL-12p40, IL-18, CTACK HGF, M-CSF, MIF, MIG, SCF, TNF- β の 39 種類の測定を急性期と IVIg 療法前後で解析した。

1-4) 糸球体障害を認めないMPO-ANCA 関連血管炎：名古屋大学腎臓内科における腎障害を示すANCA 関連血管炎の例内、糸球体障害について検討した。

1-5) 本邦におけるMPO-ANCA 陽性のMPAの病態：過去の血管炎の病態検討より、本邦におけるMPO-ANCA 陽性のMPAの病態を明らかにする。MPAの診断にまでいたる状況（いわゆる現病歴）を調べた。また、腎生検を施行の症例に関しては、半月体形成性腎炎であることを確認し、硬化糸球体で腎機能の可逆性を判断した。

1-6) 寛解時期に末梢神経障害のあるCSS へのIVIG 治療：寛解時期に末梢神経障害のあるCSS 6症例（男性0例、女性6例、平均年齢：69.1歳±5.15歳）。罹患期間：3カ月～8年（平均3.6±3.28年）。静注用γグロブリン400mg/kg 体重/日を5日間施行しMMT、VASなどを測定した。

1-7) 進行性腎障害調査

1-7-1) 厚生省難治性班での解析：厚生省難治性疾患克服事業進行性腎障害調査研究班RPGN 分科会（分担研究者 筑波大学 山縣邦弘）の全国アンケート調査により集積した1772例ならびに自験例をレトロスペクティブに検討した。

1-7-2) 1992年から2006年までの順天堂大での病歴解析：1992年から2006年まで、順天堂医院にて診断・入院治療を受けた20症例の病歴を解析した。診断は厚生省難治性血管炎分科会（1998年）の診断基準を使用した。

1-7-3) PSV の調査：PSV の調査対象疾患はEuropean Systemic Vasculitis Study Group (EUVAS) で行われている疫学調査と同様に、中小血管炎を引き起こすMPA (microscopic polyangiitis)、WG (Wegener granulomatosis)、CSS (Churg-Strauss syndrome) の3疾患群とし、これらの疾患の定義と分類基準はEUVAS で用いられてきたもの (European consensus classification algorithm) と同じとした。宮崎地区では新規発症例の全例調査を、膠原病内科、腎臓内科、耳鼻咽喉科の専門病棟・

外来を有する病院において行った。今回の二国間の比較研究の調査対象期間は2005年1月～2008年12月の4年間とした。今回の調査でも倫理面では患者名が特定できないよう配慮した。

2) 川崎病のIVIG 治療

2-1) 川崎病バイオマーカー：①血管炎マーカー（高感度CRP: HsCRP）、②血栓マーカー（D-dimer）、③心筋細胞質マーカー（CK、CK-MB、H-FABP）④心筋構造蛋白マーカー（Troponin T;TnT, Troponin I;TnI）、⑤心筋不全・心筋ストレスマーカー（ANP, BNP, NT-proBNP）、⑥酸化ストレスマーカー（Bil）。上記のバイオマーカーをIVIG 投与前、投与後2日目、7日目で血清および血漿にて評価した。IVIG 治療への反応例、不応例（投与終了24時間以内に37.5度以下にならないもの）に分け、これらのマーカー値の変動を検討した。対象：A)急性期の川崎病患者10例（平均3歳 0.6～11歳 男4：女6）。全例で初期治療にIVIG 療法を施行されている。B)小林スコア5点未満（4点以下）の軽症例での検討。年齢；3ヶ月-12歳、平均36ヶ月、中間値31ヶ月、41例19男、22女。

3. 安定性と毒性試験

1) 安定性：宿主株の遺伝子安定性、発現ベクターにおける有害遺伝子配列の否定、組み換えγグロブリン製剤の安定性を検討した。

2) 毒性試験：組み換えγグロブリン製剤の毒性：急性、亜急性、生殖発生の毒性試験、抗原性、変異原性、局所刺激性、発熱性、不純物の毒性、加速試験を検討した。

4. 国際評価関連—新基準に関する国際会議

国際会議に鈴木和男、小林茂人、藤元昭一、平橋淳一の4名が招聘され、各国から専門の研究者が参加した。会議にて問題点を確認および多数決で議案を採択し、論文化した。具体的な各国の調査は、倫理委員会の松陰を得て、情報を収集しており、日本でも登録が開始された。本件に関連して、欧米の会議（米国・フィラデルフィア）にも出席した。

(倫理面での配慮【全般】)

具体的には分担者報告書を参照

患者の血液・血清の使用に当たっては、各施設の倫理委員会（以下「委員会」）規定に従い実施した。患者の検体が派生することが予想される場合には、1) 研究計画を含む具体的な研究計画書、2) 主治医を含む共同研究者との合意文書、患者とのインフォームドコンセントに関する実施計画概要を記載した書式を予め「委員会」に提出し、「委員会」の許可を得て実施することとし、個人情報にはコード化し、ネットワークでの個人情報交換はしないなど、プライバシー情報の漏洩がないよう万事を期した。遺伝子の発現量を検索するだけで塩基配列の違いを比較することは該当しない場合でも、必要に応じて「ヒトゲノム研究審査」を申請して許可を得た。

さらに、動物実験に関しては、動物実験計画書を所属機関の動物委員会（分担研究者においては当該機関の同等委員会）の許可を得て、動物愛護のもとに行った。必要最小限のマウスを使用することに努め、必要に応じて安楽死させた。ノックアウトマウスは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に準じて、組換え体として飼育した。

C. 研究結果

本年度の事業計画を綿密に討議し、主な結果を記載した。詳細な「結果」については、各分担研究者報告の「結果」の項を参照。

1. 基礎分科会

1) 人工ヒト化ガンマグロブリンの合成に関する研究：VH-CH1-hinge-6xHis の構成による人工ガンマグロブリン重鎖の Fab の単鎖として構築した。1000 クロンの解析より 178 クロンの完全タンパク発現クローンを得、ポリクローン混合培養より組み換えタンパク精製し、0.3mg 精製票品/1L を実現した。エンドトキシン混入を最小限とし、力価判定用モデルマウスへの接種が可能なレベルまで精製した標品を得、本標品を用いて ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj に投与しその生物活性を検討した。その結果、末梢血血液像および脾臓の腫大抑制において現在臨床で使用されているグロブリン

製剤の 1/10 以下の濃度で同等の成績を得ており、人工ガンマグロブリンとしての現実の製剤化に近づいたと思われる。今期の成果によって、前臨床試験に向けた大規模バッチのライブラリー作成が望まれる。（亀岡洋祐[医薬基盤研究所属]，協力研究者）

2) 人工ヒト化ガンマグロブリンの *in vitro* での評価：産生された人工γグロブリンの *in vitro* 評価法は、製品の開発に必須である。全血を用い、PHA で刺激した際に産生されるサイトカインへの免疫グロブリンの影響を評価する評価系を用い、新たに作られた、モノバレント hScFv の評価を、既存のγグロブリン製剤と比較しつつ評価した。その結果、多くのサイトカインにおいて、既存のγグロブリン製剤より低い濃度で、サイトカイン産生への抑制効果が認められた。（宇野賀津子[ルイパスツール医学研究所]，協力研究者）

3) モデルマウスでの人工ヒト化ガンマグロブリンの *in vivo* での評価：

3-1) 血管炎モデルマウス：精製人工ガンマグロブリンを用いて ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj に投与しその生物活性を検討した。その結果、末梢血血液像および脾臓の腫大抑制において現在臨床で使用されているグロブリン製剤の 1/10 以下の濃度で同等の成績を得ており、人工ガンマグロブリンとしての現実の製剤化に近づいたと思われる。（鈴木和男[研究代表者]、亀岡洋祐[医薬基盤研究所属]，協力研究者）

3-2) 川崎病様モデルマウス：CAWS 誘発マウス血管炎モデルに抗 TNF-α 製剤を投与した場合、血管炎は著明に抑制されることを示した。この時、いくつかの炎症性サイトカインの産生が抑制されており、本モデルの血管炎発生には TNF-α をはじめとする炎症性サイトカインが密接に関与している可能性がある。（高橋 啓 [東邦大学医療センター大橋病院]，協力研究者）

一方、CAWS 刺激により TNF-α、IL-6、GM-CSF など種々の炎症性サイトカインを産生し、そのレベルは他の系統よりも亢進してい

る。中でも産生された GM-CSF は TNF- α や IL-6 産生に大きな影響を与えることが明らかとなっている。そこで、GM-CSF 産生が急性致死毒性、CAWS 血管炎に影響を与えるかどうかについて、GM-CSF 遺伝子導入を施したマウスを用いて検討した。(大野尚仁[東京薬科大学], 協力研究者)

3-3) モデルマウスでの病態・病因解析:

3-3-1)血管炎の病因に関与する分子 moesin: 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、2つのモデルマウス: 1 急速進行性糸球体腎炎 (RPGN) を自然発症する 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」を用いて、病因分子の1つを新たに明らかにした。本分子を mGEC から単離し PMF 解析した結果、moesin と同定した。Moesin には、MPO-ANCA のリスクエピトープ部位の MPO の N 末端部分と相同な構造が含まれていた。これらマウスから得られた MPO-ANCA の標的分子 moesin が人工ガンマグロブリンによる治療評価に使えかを明らかにするには、まず、moesin 抗体価の定量の ELISA 測定系を確立した。(鈴木和男[千葉大院医]、長尾朋和[千葉大院医]、高橋 啓[東邦大医療センター大橋病院]、山本健二[国立国際医療研究センター]、河内正治[国立国際医療研究センター])

3-3-2) 血管炎の治療モデル-1: 実験的自己免疫性心筋炎(EAM)の発症機序を詳細に検討してきた。EAM の発症には、炎症部位に存在する様々な細胞が互いにクロストークして病変を形成する。またその周りに存在する細胞外基質も病態形成に深く関わっていると考えられる。さらにこの時に様々なサイトカインが重要であるが、IL-1 は炎症を引き起こす上で最も大きな役割を演じる炎症性サイトカインの一つであることが知られている。今回これらを明らかにするために、in vivo で細胞間のクロストークを調べる新しい方法の確立、細胞外基質の動態、さらに新しい IL-1 阻害薬の検討を行った。1)多検体か

ら mRNA を測定し、その相関関係を解析することによって、病変に存在する細胞間のクロストークを推測できる可能性があること、2)細胞外基質に関連する蛋白は発現時期が様々で、炎症性サイトカインによって誘導されるものがいくつもあり、細胞外基質の分解に密接に関係する Secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI)の遺伝子治療は EAM を有意に改善させること、3)IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーは、既存の IL-1 阻害薬よりも強力な IL-1 阻害薬になりうることである。(相澤義房[新潟大院医], 協力研究者)

3-3-3) 血管炎の治療モデル-2: EPA が心血管系のみならず自己免疫疾患の発症を抑制する可能性について検証し、ANCA 血管炎の自然発症型モデルマウスに血管炎発症前から EPA を長期経口投与し、急速進行性腎炎が抑制され生命予後が著明に改善されることをすでに見出している。さらに EPA 投与は MPO-ANCA 産生を明らかに抑制し、自己免疫制御効果を示唆した。このメカニズムを探索するため、脂質メタボロームによる EPA を前駆体とした抗炎症性メディエーターの網羅的解析の系を確立し解析を続けた。(平橋淳一[東京大学医学部府付属病院腎臓内分泌内科]、研究代表者、研究協力者)

3-3-4) 血管炎の治療モデル-3: 炎症誘発における食細胞由来活性酸素の影響を個体レベルで知るために、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)あるいは食細胞 NADPH オキシダーゼ(gp91phox)の各ノックアウトマウス(MPO-KO マウス、CGD マウス)における、カンジダ死菌による誘発性肺炎の病態を解析した。MPO-KO マウスにカンジダ死菌を経鼻投与すると、野生型マウスよりも重篤な肺炎を発症した。投与4日目の肺から肺胞洗浄によって回収された全白血球数は、MPO-KO マウスの方が野生型マウスよりもおよそ6倍多く、そのほとんどが好中球(Gr-1陽性細胞)であった。また、CGD マウスにカンジダ死菌を投与しても MPO-KO マウスと同様に重篤な肺炎を発症し、投与4日目の肺からは

MPO-KO マウスと同程度の好中球が回収された。(荒谷康昭[横浜市大総合科学], 協力研究者)

4) 病因にかかわる遺伝子: 川崎病をはじめとした自己免疫疾患に対する有効な治療として、高用量ヒト免疫グロブリン静注療法 (IVIG) が効力を持つ仕組みを理解する手段のひとつとして、難治性血管炎のみでなく、類似の疾患における末梢血単核球 (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell) で転写誘導 (抑制) されている多種類の遺伝子を単離して解析している。今回は難治性血管炎のひとつである、顕微鏡的多発血管炎 (MPA) との比較解析のため、慢性糸球体腎炎の患者について遺伝子解析を進めたので、その結果を報告する。とくにスピアマンの順位相関係数解析法により IgA 腎症と非 IgA 腎症が血液診断で識別できる可能性を示唆するデータが得られたのは大きな成果であった。(野島 博[大阪大・微生物病研究所], 協力研究者)

2. 臨床分科会

1) 人工ヒト化ガンマグロブリンの臨床試験にむけた治療と病態—血管炎

1-1) 血管炎病態とガンマグロブリン治療—1:

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、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多く発現するが、臨床的炎症所見と逆相関を呈するサイトカイン類の発現が確認された。その一部である SCF は組織学的には硬化病変と相関を示した、組織修復に関与することが示唆された。これらのサイトカイン類へのIVIg治療の影響を検討したが、他の炎症性サイトカイン類に比し、上昇する症例が半数以上を占め、IVIgによる組織修復の促進が示唆された。(武曾恵理[北野病院]、臨床班分科会員および協力研究者)

1-2) 血管炎病態とガンマグロブリン治療—2: 糸球体病変を欠き、間質炎および小動脈炎主体の稀なMPO-ANCA関連血管炎を経験した。この

ような病理像を示すMPO-ANCA関連血管炎は1%程度存在すると報告されており、ANCA尿所見が軽度で、腎機能が急速に悪化する際には本例のような病態を考慮する必要がある。(今井圓裕[名古屋大学学医学系研究科・腎臓内科]、研究協力者)

1-3) 血管炎病態とガンマグロブリン治療—3: ガンマグロブリン大量療法は、広く血管炎に対して有用な治療法と考える。そのためにも、人工γグロブリンの開発は重要である。血管炎は、川崎病から古典的多発動脈炎まで、好発する障害血管部位が異なり、それゆえ病態も様々である。本邦に多くみられる顕微鏡的多発動脈炎 (MPA) は、比較的細い中・小血管に起こる炎症であり、障害臓器の特徴がある。そのような血管炎の病態の熟知は重要である。さらに、障害が進行してしまった段階では、いかなる治療によっても難治である。このようなことからMPAを早期発見し、今後immunomodulatory therapyによる改善を明確にし、不可逆性の障害を少なく、患者のQOLの向上を目指すことは、医療経済上も重要であることを周知徹底させていきたい。(湯村和子[自治医科大学腎臓内科]、研究協力者)

1-4) 血管炎病態とガンマグロブリン治療—4:

Churg-Strauss 症候群の寛解時期に持続する末梢神経障害に対し、大量γグロブリン (IVIG) 療法を行った。対象: 寛解時期に末梢神経障害のあるCSS6症例。方法: 静注用γグロブリン400mg/kg体重/日を5日間施行しMMT、VASなどを測定。結果: 自覚症状 (VAS) は83% (5例/6例) で改善し、感覚神経の改善は83% (5例/6例) に認められた。運動神経障害 (MMTスコア) は67% (4例/6例) で改善した。またIVIG投与時期に生じた副作用は、頭痛が1例のみで投与中断例はなかった。結論: IVIG療法はCSSの寛解期で長期経過した末梢神経障害に対しても有用で、安全性の高い治療法であると思われた。またMPAの末梢神経障害においても、今後IVIG治療を検討する必要があると思われた。(有村義宏[杏林大学医学部腎臓内科]、研究協力者)

2) 血管炎の調査

ウェゲナー肉芽腫症(WG)は欧米と比べわが国では比較的少ない。わが国のWGの臨床症状、特に腎症の合併頻度が欧米と異なるのかどうか検討した。腎症の合併は本研究班の過去の2回の全国調査結果では64%,39%、順天堂大学膠原病内科で45%、過去の耳鼻科からの2報告は45%,12%であり、欧米からの報告77%(米国)、77%(ドイツ)と比べ、比較的低い傾向にあることが明らかになった。腎症のないWGは「限局型(localized・limited form)」と呼ばれるが、腎症の判定基準、経過観察の期間など規定して厳密な解析が必要であり、その他の臨床症状についても、欧米と比較することによってわが国のWGの病態が解明されることが考えられる。(小林茂人[順天堂大学医学部付属越谷病院]、研究協力者)

急速進行性糸球体腎炎(RPGN)は、WHOにより「急性あるいは潜在性に発症する肉眼的血尿、蛋白尿、貧血、急速に進行する腎不全症候群」と定義され、わが国ではANCA陽性RPGN、抗GBM抗体型RPGN、その他に分別される。わが国の保険診療において、アフェレシス療法が認められている腎疾患として巣状糸球体硬化症、ループス腎炎、血栓性血小板減少性紫斑病、同種腎移植が挙げられるが、RPGNを呈する代表的疾患であるANCA陽性RPGNやGoodpasture症候群を含む抗GBM抗体型RPGNのアフェレシス療法ははまだ未承認である。しかし、過去の有効性を元に、わが国では実地診療に用いられているという実状がある。代表的なRPGNのうち、ANCA関連腎炎に関して、過去の有効性に関する検討、自験例、厚生労働省進行性腎障害研究班による全国RPGNアンケート調査の結果を踏まえ、アフェレシス療法の選択およびその適切な適応を明確にし、保険診療による実施を検討すべきである。(山縣邦弘[筑波大学院医学研究科]、研究協力者)

宮崎県と英国 Norfolk での ANCA 関連血管炎 (ANCA-associated primary systemic

vasculitis ; PSV) の 2005~2008 年の 4 年間の前方視的疫学調査結果の比較検討を行なった。今回は、MPA (microscopic polyangiitis)、WG (Wegener granulomatosis)、CSS (Churg-Strauss syndrome) 新規発症例の全例調査を、膠原病内科、腎臓内科、耳鼻咽喉科の専門病棟・外来を有する病院において行った。宮崎地区と Norfolk における PSV の年間発症率は 15 歳以上の成人 100 万人当たり、各々、 23.7 ± 3.9 (95% C.I 19.2-26.0) vs. 18.0 ± 8.2 (95% CI 9.9-26.0) と大差なかった。平均年齢 (中央値) は、 69.9 ± 11.0 (72) vs. 60.3 ± 14.8 (61) 歳と宮崎県患者で約 10 歳高齢であったが、男女差はなかった。AAV 全患者の内、各疾患の比率 (MPA: WG: CSS) は、各々、81%:10%:10% vs. 21%:76%:3% と我が国では MPA、英国では WG が多いことが確認された。ANCA サブタイプに関しては、各々、MPO-ANCA 陽性例が 83% vs. 15%、PR3-ANCA 陽性例が 7.0% vs. 69% と明らかに異なっていた。今回の前方視的疫学調査結果から、以前の宮崎地区と Norfolk における PRV (ANCA-associated primary renal vasculitis) の二国間調査 (2000~200 年) と同様に、宮崎地区における PSV の多くは MPA で、しかも多くは MPO-ANCA 陽性であることが確認された。(藤元昭一[宮崎大学医学部]、布井博幸[宮崎大学医学部]、研究協力者)

3) 人工ヒト化ガンマグロブリンの臨床試験にむけた治療と病態—川崎病

IVIG 不応例が存在する急性期川崎病血管炎では超大量単回免疫グロブリン IVIG 静注療法の効果を判定するよりの確な指標を見つける必要がある。今回、多くのバイオマーカー、即ち①血管炎マーカー (高感度 CRP: HsCRP)、②血栓マーカー (D-dimer)、③心筋細胞質マーカー (CK,CK-MB、H-FABP) ④心筋構造蛋白マーカー (Troponin T; TnT, Troponin I;TnI)、⑤心筋不全・心筋ストレスマーカー (ANP, BNP, NT-proBNP)、⑥酸化ストレスマーカー (Bil) を同時に測定した。その結果、治療開始前の各

マーカーでは、D-ダイマー、BNP、NTproBNP、T-Bil 値が、不応例で高い傾向を認めた。治療後 3 日目における変化率では、不応例で CRP の減少率が少ない傾向にあった。7 日目においては、不応例では、NTproBNP、HS-CRP が高い傾向を示した。多種類のバイオマーカーの組み合わせにより、IVIg 療法の治療効果の指標としての多方面からの評価が可能である。(佐地勉[東邦大学医療センター大森病院小児科]、研究協力者)

4) 血管炎の新基準に関する国際会議

これまでの日欧間の調査と議論から浮かび上がった臨床症状・ANCA 型別の頻度など相違点をふまえて、2008 年 3 月と 12 月にチューリッヒでの EULAR/ACR の分類基準の見直し討論に参加した。アンケートで論議すべき問題点が集計され、ACR および CHCC 両者とも大型血管炎の基準に対する改訂必要の希望者は多くなかったが、中小血管炎の基準に対する改訂希望が多かった。疾患名の変更に関する提案が行われた。しかし、結論は、現行の疾患名の変更は行わないこと、Wegener については事実の調査を継続することで、Granulomatous with polyangiitis(GPA)に確定して論文発表 (Jennette JC. Nomenclature and classification of vasculitis: lessons learned from granulomatosis with polyangiitis (Wegener's granulomatosis) Clinical and Experimental Immunology REVIEW ARTICLE doi:10.1111/j.1365-2249.) になった。

血管炎の分類方法に関して重要な概念が確認された。1) 症候群やサブグループに対しては、可能な限り病態生理学的の観点からの階層制で表現する。2) 症候群と一次性/二次性血管炎との間でのオーバーラップについては、症候群が一次性か二次性血管炎か、関連性の深い選択肢に分類される。3) 診断の信頼性をその状態において Definite, Probable, Passible の段階に定義する。個々の症例では診断の信頼性がより確実な方向に変化する。4) 小児の血管炎、血管炎の類似疾患、非炎症性血管障害も分類上考慮する。これらの基本方針に基づいて、この議論のまとめは、論文として受理された。現在、この議論から抽出された提案は、欧州・米国・日本をはじめ、世界各国の関連施設の登録により検証が進められている。日本からも血管炎関連の班を中心として登録が開始させている。

本件と関連して、2012 年 3 月、東京にて「The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012」の開催が、厚労省科研費「血管炎」関連の研究班の協力を得て開催することが決まった。

国際会議に鈴木和男、小林茂人、藤元昭一、平橋淳一の 4 名が招聘されている。また、2010 年 11 月の欧米の会議 (米国・アトランタ) には、小林、平橋が出席した。

5) 安全試験

現在施工中の動物実験に使用している人工免疫グロブリンの安全性について、感染性因子、内因性・外因性毒素、炎症惹起分子の特定など、感染研の安全研究ガイドラインを基に安全性を検討し、臨床に向けた原案を協議した。(全員)

D. 考察

これまで作製してきた合成ヒト型免疫グロブリンのクローンを選定することができた。また、体外診断法にむけた *in vitro* での評価法をほぼ確立した。さらに、疾患モデル動物での評価法もほぼ確立することができた。

一方、臨床班では、小児に多発する血管炎である川崎病や、高齢者に多い MPO-ANCA 関連血管炎の治療法としての IVIg のデータの蓄積および他の治療法などの検討を継続的に行い新知見を得た。

免疫グロブリンの需要増加やリスク軽減から免疫グロブリンの人工化を推進へ向けて準備が整った。最終年度の治療法の確立に向けて向けて前進した。

1. 基礎分科会

1) 人工免疫グロブリン合成: 今年度は、主要な結合活性を担う VH と CH1 および hinge を含む VH-CH1-h フラグメントを再構築し再度クローニングを行い、1000 クローンの組み換え体から 178 クローンの hScFv 発現クローンを得て、ポリクローンのミックスバッチ培養より精製 hScFv を回収し、最終精製標品 1 L 当たり 0.8~0.9mg を実現できた。最終製品のエンドトキシン混入レベルを最小限とし、生物活性判定のため ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj に投与し結果を観察した。末梢血血液像および脾臓の腫大抑制において現在臨床で使用されているグロブリン製剤の 1/20 から 1/40 以下の濃度で同等の成績を得ており、人工ガンマグロブリンとしての現実の製剤化に近づいた。また、前期開発された VL-VH 複合体標品に比べ VH-CH1-h 複合体では可溶性が増しているこ

とが考えられた。1000 クロンのライブラリーより有効な生物活性を示す 178 クロンを得、低濃度で有効な可溶性標品を得ることができ、製剤化に近づいたことは大きな成果と言える。

2) In vitro での評価法: 今年度の結果は、IL-2 の産生に対しては、モノバレント hScFv は γ グロブリン製剤に比べてより低い濃度で、抑制効果を発揮した。しかしながら、IFN- γ や TNF- α に対しては抑制効果はほとんど認められなかった。但し、 γ グロブリン製剤についても同様の傾向であったので、高濃度の製剤を使うことで、抑制的な結果も期待出来る可能性も考えられた。

また、TH2 サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 に対しては抑制傾向が、認められた。特に γ グロブリン製剤に比較して、モノバレント hScFv はより低い濃度でより強い抑制効果が示された。

免疫抑制性サイトカインである IL-10 は特にモノバレント hScFv で、IL-10 の産生の増大が認められた。特に MPO-ANCA 腎炎患者での、モノバレント hScFv での IL-10 産生の増大は γ グロブリン製剤に比べて顕著であった。IL-10 は免疫抑制性サイトカインであり、IVIg 対症疾患では、むしろ過剰なサイトカイン産生が、病態に影響していると考えられるので、IL-10 産生の亢進は、好ましい結果と考えることもできる。

一方、単離した慢性糸球体腎炎特異的遺伝子はいずれも機能は未確定な部分も多く残されているが、発症と何らかの関連があると考察した。

3) 疾患モデルマウスでの評価法

本モデルの血管炎発生には TNF- α をはじめとする炎症性サイトカインが密接に関与している可能性がある。

また GM-CSF が CAWS 血管炎の増悪因子として働くことを明らかにするには至らなかったが、CAWS の活性の一つである急性致死活性に対して GM-CSF が感受性を増強させる因子として働くことが明らかとなった。CAWS 血管炎に対する影響を検討するためには、さらに詳細に検討する必要がある。抗 TNF 抗体製剤は種々の疾患に応用されてきているが、GM-CSF は状況によっては炎症を増悪する因子となる。グロブリン製剤の人工化にあたっては、GM-CSF のシグナリングも重要なターゲットとなるであろう。

さらに、炎症におけるサイトカインの重要性は言うまでもないが、IL-1 はその中でも中心的

な役割を演じているものの一つである。今回、IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーリコンビナント蛋白は、既に実用化されている IL-1 阻害薬に比し、強力な阻害作用を有していた。これを実用化することによってヒトの炎症疾患に対する治療薬となりうる可能性が示唆された。

一方、モデルによる他の治療法については、 $\omega 3$ 脂肪酸由来の脂質性メディエーターの代謝と網羅的解析の系を確立した。今後、血管炎発症前後の血漿、リンパ節、腎臓、脾臓の脂質メタボロームの比較解析を行うことにより、血管炎発症と再発に鍵となる物質の同定を目指す。また、ANCA 血管炎患者血漿を用いて、上記の解析を行うことにより、新しい治療標的の探索を進めることが重要である。

2. 臨床分科会

1) 人工ヒト化ガンマグロブリンの臨床試験にむけた治療と病態—血管炎: MPA 急性期において誘導される多くの炎症性物質の中には炎症所見と逆相関を示すものがあり、これらは IVIg でむしろ誘導が増強される症例もあることがわかった。その中でも SCF は cKit の Ligand として造血細胞や mast cell に発現することが知られているが、貧血で増加し、組織硬化病変と相関していたことはこれらの性質によるものと考えられた。一般の炎症サイトカインとは異なり、組織修復性に関与することが考えられ、本疾患のサイトカイン・ケモカインストームの多義性を示した。さらに IVIg の炎症抑制作用に同期して誘導が増強されるものがある事が示唆された。

また、CSS の寛解時期に長期に渡り持続する末梢神経障害に対する IVIg 療法の報告はこれまで少なく、われわれの検索した限り、数例にとどまっている。発症より 1 年以上経過しても末梢神経障害が持続した CSS 8 例のうち 6 例 (75%) に MMT スコアの改善を認めたと報告がある。また、1 年間持続する末梢神経障害を認めた CSS の 1 症例に 2 週間ごとに IVIg 療法を施行し、運動障害、感覚障害が改善したと報告している。今回の結果は寛解期 CSS の 6 症例に IVIg 療法を施行し、高率に運動障害・感覚障害の改善を認めた。CSS に対する IVIg 療法の効果機序は未だ十分に解明されていないが、寛解期の CSS においても有用で、副作用の出現頻度も少なく、安全性の高い治療法であると思われた。一方、ANCA 関連血管の中で最も患者

数の多い MPA においても、末梢神経障害の頻度は 44%¹⁾ と高率である。また、CSS と MPA の末梢神経障害は、軸索障害などの神経病理所見および末梢神経障害の頻度、分布、持続期間などにおいて共通の所見を有するとの報告がある。また猪原らは、急速進行性糸球体腎炎と末梢神経障害を呈し IVIG 療法を施行した MPA 4 症例のうち、2 例 (50%) で末梢神経障害の改善を認めたと報告している。これらのことから、MPA の末梢神経障害においても IVIG 療法は有用である可能性があり、今後さらに検討していく必要があると思われる。

また、従来行われている治療では、治療による腎障害改善効果は、多くは血清クレアチニン値の上昇を回避することができるが、硬化病変は改善できないことは事実である。つまり、腎障害から、腎不全→透析導入を回避するのは、早期発見しかないと考える。

2) 血管炎の調査: 現状において我が国の ANCA 関連 RPGN・血管炎に対しての血漿交換療法治療については生命予後・腎予後への有効性は確立されていない。しかしながら海外の報告では半数の報告で、末期腎不全症例において、血漿交換の実施により有意に透析からの離脱が可能であったと報告されている。また、透析からの離脱に際しては、ステロイドパルス療法よりも血漿交換療法の方が有効であることが示唆されている。一方日本の RPGN で末期腎不全例に限った解析でも、血漿交換療法の実施でも透析の離脱率に改善は無かった。一方びまん性肺胞出血等を合併する血管炎最重症型に、血漿交換療法を併用することで、生命予後の改善に寄与する可能性があることが明らかとなった。さらに感染症併発等により十分な免疫抑制療法が実施できない場合や再発・難治症例に、血漿交換療法を併用療法の一選択肢となりうる事が明らかとなった。

一方、検討方法[case recognition、症例の選択 (外来・入院患者)、臨床科の違い、診断・分類基準の違い]など様々な要因によって、国内外の成績が多少異なることが推定される。わが国では、いわゆる「限局型(localized・limited form)」WG が多いのか、その他の臨床症状の発現頻度に欧米と差異がないかなど、今後、多施設による調査が必要と考えられる。

さらに、宮崎での調査では、宮崎県が人口 100 万人で、人口の変動も少なく (5% 以下)、特に

本疾患の罹患率の高い 65 歳以上の老人人口で考えると 0.8% とほとんど人口移動は認められず、PSV の疫学調査には適切な地区だと考えられる。宮崎県北での患者発生が少なく、他県への紹介などが考えられたので (医療圏の違い)、患者分布から前回の調査と同様に県央、県南、県西地区に限った統計を行った。

前回の宮崎県の 2004 年までの 5 年間の retrospective な検討では腎臓内科医だけによる疫学調査であったことが、欧州の結果との差異になっている可能性も指摘されていた。すなわち、腎病変を伴うことが極めて高い MPA/RLV の拾い上げ症例が多く、また同疾患では MPO-ANCA 陽性率が高いために、疾患内訳、障害臓器、MPO-/PR3-ANCA 比が欧州と異なるのではないかとの問題であった。

今回は、同じ期間、同じ疾患分類法に基づく診断名、さらに ANCA サブタイプの検査法も異なりがないことを確認された二国間での前方視的調査結果を比較検討した。

まず、PSV の発症頻度は、年間成人人口 100 万人当たり宮崎地区で 23.7 名、Nolfolk 地区で 18.0 名と、ほぼ同率であった。しかし、宮崎地区の PSV の多くは MPO-ANCA 陽性の MPA 患者であるのに対し (MPA 発症率: 19.0/100 万人・年)、Nolfolk 地区では PR3-ANCA 陽性の WG 患者が多かった (WG 発症率: 13.6/100 万人・年)。さらに、臨床症状も異なり、ENT や呼吸器の臓器障害を呈する血管炎患者は英国に比べると本邦では少ないと考えられた。一方、腎症に関しては両国とも 70% 以上の患者が合併し、最も傷害されやすい臓器の一つであるという特徴は同じであった。その中で、WG 症例に関しては、宮崎地区では腎症を呈する症例の比率が Nolfolk 地区患者に比べて低いと考えられた (29% vs. 65%, $p < 0.001$)。

3) 人工ヒト化ガンマグロブリンの臨床試験にむけた治療と病態—川崎病: IVIG の有効性の判定には、解熱傾向、WBC や顆粒球の低下、CRP 低下、等が一般診療上用いられてきたが、今回

の検討で血管炎を主症状とする KD では、血管炎の炎症マーカーでもある HsCRP、血栓マーカー心筋ストレスマーカー、酸化ストレスマーカーも IVIG 前後で変動し、効果の指標となり得ると考えられた。今回の検討で血管炎を主症状とする aKD では血管障害のマーカーと考えられる炎症マーカー (CRP)、血栓マーカー (d-dimer)、心筋ストレスマーカー (BNP,NT-proBNP)、酸化ストレスマーカー (T-Bil)が IVIG 前後で変動し、効果の指標となり得ると考えられた。また、軽症例でも炎症マーカー (CRP)、酸化ストレスマーカー (T-Bil) は IVIG 不応例で改善不良であった。

4) 血管炎の新基準に関する国際会議

最後に、これまでの日欧間の調査と議論から浮かび上がった臨床症状・ANCA 型別の見直しについての論議は、論文化され、また、現在、この議論から抽出された提案は、欧州・米国・日本をはじめ、世界各国の関連施設の登録により検証が進められている。日本からも血管炎関連の班を中心として登録が開始させている。また、名称変更については、Wegener が、Granulomatous with polyangiitis(GPA)に確定した。その他は、5月に Chapel Hill での会議に持ち越されている。

E. 結論

IVIg による治療法は、重症感染症や川崎病の治療として使用されている。また、高齢者に発症し増加している自己免疫疾患に、より有効な免疫補助療法としてその適応拡大が検討されはじめている。2010年1月に Churg-Strauss 症候群(CSS)への適応拡大が認可されるなど需要の増加に加え、血液製剤の安全性や医療経済の点からも、人工化することが今日的急務となっている。そこで、本研究では、免疫グロブリンの人工化を目的とした。本研究では、免疫グロブリンの人工化を目的とし、これまでにマウス型の完成を基にヒト型を構築した。本年度は、ヒト型の臨床試験に向けてプロトタイプクローンの構成を絞り込み、モデルマウスでの評価に加え、*in vitro*での体外評価法も検討した。具体的には、1) ヒト型人工ガンマグロブリンのクローンの絞込み、2) モデルマウスによる力価判定法と評価マーカーの検討、3) 体外診断法の開発の検討：免疫系と血管内皮細胞、4) 臨床試験をみすえた臨床研究：血管炎の治療成績の

知見と状況準備、人工免疫グロブリンの安全性の向上についても臨床サイドからの動物実験の評価と治療法のバックアップ、を中心に研究した。以上のように、ヒト型人工免疫グロブリンの *in vivo* と *in vitro* の評価法ができた。一方、IVIg 治療の効果判定の有効性のパラメーターの選択は、欧州血管炎協会 (EUVAS) でも採用されており、国際評価会議に当班からも運営委員2名、オブザーバとして1名が参加して討論に加わり、わが国も ACR/EULAR の新基準策定メンバーとなった。本研究事業の成果を臨床に生かし、国民の保健・医療ならびに効率的な医療経済に応えるようにしたい。

参考資料

本ワークショップに関連して、2012年3月、東京にて「The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012」の開催が、厚労省科研費「血管炎」関連の研究班の協力を得て開催することが決まった。

会長：鈴木和男(千葉大院医、当班代表研究者)、副会長：楨野博史(岡山大学院医)、尾崎承一(聖マリアンナ医大)、実行委員長：有村義宏(杏林大学医)、プログラム委員長：石津明洋(北大・院医)の国内組織から成っている。

(参考資料参照)

F. 健康危険情報

今年度は、特になし。

G. 研究発表：(分担者の項の記載を参照)

H. 知的財産権の出願・登録状況

申請中：新規血管炎の検査方法および検査用試薬

人工免疫グロブリン合成に関する研究

VH-CH1-h 型人工ガンマグロブリンの構築とクローンの多様性の検討

分担研究者 亀岡洋祐（独）医薬基盤研究所 難病資源研究室 主任研究員

分担研究者 大島正道 国立感染症研究所・免疫部 室長

協力研究者 小浦美奈子²、長尾朋和³、内田敬子¹、竹内喜久子¹、松田潤一郎²、鈴木和男³

1. 独立行政法人医薬基盤研究所・難病資源研究室
2. 独立行政法人医薬基盤研究所・疾患モデル小動物研究室
3. 千葉大学院医学研究院・免疫発生学・炎症制御学

研究要旨：

前期までの開発研究の結果を踏まえ VH フラグメントの存在が人工ガンマグロブリンにおいて重要と考えられ、今期は VH-CH1-hinge-6xHis の構成による人工ガンマグロブリン重鎖の Fab の単鎖として構築した。1000 クローンの解析より 178 クローンの完全タンパク発現クローンを得、ポリクローン混合培養より組み換えタンパク精製し、0.3mg 精製票品/1L を実現した。エンドトキシン混入を最小限とし、力価判定用モデルマウスへの接種が可能なレベルまで精製した標品を得、本標品を用いて ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj に投与しその生物活性を検討した。その結果、末梢血血液像および脾臓の腫大抑制において現在臨床で使用されているグロブリン製剤の 1/10 以下の濃度で同等の成績を得ており、人工ガンマグロブリンとしての現実の製剤化に近づいたと思われる。

今期の成果によって、前臨床試験に向けた大規模バッチのライブラリー作成が望まれる。

A. 研究目的

第1期及び第2期人工ガンマグロブリン研究班の研究により開発された人工ポリクローナルガンマグロブリンはマウス型およびヒト型人工ポリクローナルガンマグロブリンにおいて、マウスモデル系において血管炎における治療効果が本研究班の高橋らの分担研究により確認されている。これまでの検討から、抗体分子内の可変領域である scFv を用いると治療効果があり、Fc 領域を

用いても効果がみられないことから、scFv における多様性が治療効果を上げるために重要であることが推察されている。昨年度までの分担研究で、主要な結合活性を担う VH と CH1 および hinge を含む VH-CH1-h フラグメントを再構築しライブラリーを作成、再度クローニングを行い、その構成クローンからランダムに1000クローンを選択し塩基配列を決定すると共に、個々のクローンでのタンパク発現を抗ヒトFab抗体を用い

たウエスタンブロット法によりヒトScFvタンパク発現を解析した。クローンの配列解析をもとにクラスター解析により有効クローンの選択を行った。

選択された有効クローンの混合バッチを作成し、大量培養を行って、精製hScFvの作成を試み、エンドトキシンの除去方法について検討を行った。

また、得られた精製hScFvを用いてANCA関連血管炎モデルマウスSCG/Kjに投与し生物学的活性の評価を行った。

B. 研究方法

VH-CH1-hinge-6xHis の構成による人工ガンマグロブリン重鎖 Fab の単鎖フラグメントとして設計し図-1 のようにプライマー、ベクター組み込みを設定した。

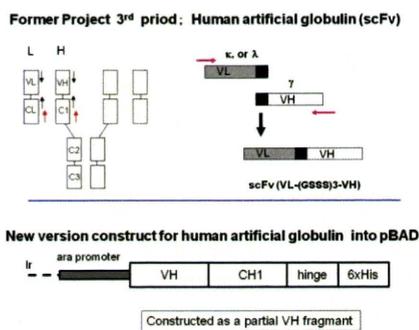


図-1

健康人末梢血単球画分より得られたtotalRNAよりVH-CH1-hinge領域cDNAをRT-PCRにより増幅しpBADベクターにクローニングし、2万クローンを含むライブラリーを作成し、その中からランダムに1000クローンを抽出した。塩基配列解析によりガンマグロブリンVH-CH1-hingeを正しく発現できるクローンを選択しアミノ酸配列を用いて図-2に示すようにクラスター解析を行った(特許申請のためクローンは

非表示)。これらのクローンについて、菌体抽出液をウエスタンブロットし抗ヒトFab抗体によりグロブリンペプチドの発現を確認した。

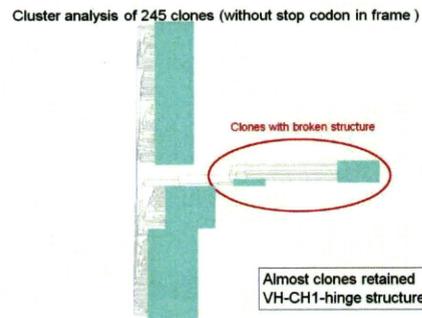


図-2 アミノ酸配列クラスター解析

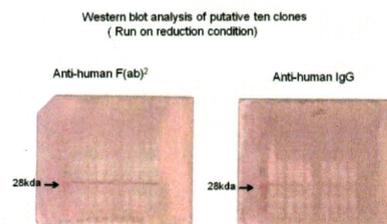


図-3 抗ヒトFab抗体による検出例

ガンマグロブリンVH-CH1-hingeのポリクローンミックスバッチの大量培養を行い、組み換えタンパク抽出精製を図-4に示す方法で行った。

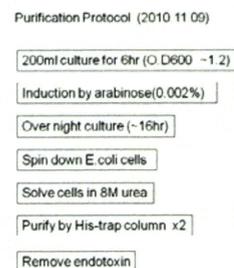


図-4 タンパク精製ステップ

精製した組み換えタンパクからのエンドトキシン除去はアルカリ変性法を用い、最終的には限外濾過法により濃縮、バッファの置換を行った。

SCG/kj マウスへの投与実験は図—5 に示すように、10 週齢メスマウスに対して、腹腔内投与を 3dose で行い、対照としてヒトグロブリン製剤の適用量に従った 400mg/kg/day を 5 日間連続投与した。3 週間の経過観察の後、麻酔下で血液、腎臓、肺、心臓、脾臓を採材し、重量測定、血液成分分析を行った。



図—5 投与実験プロトコール

C. 研究結果

本年度作成したガンマグロブリン VH-CH1-hinge 組み換え体クローンライブラリーよりランダムに抽出した 1000 クロンの解析結果は図—6 に示すように、1000 クローン中、約 4 分の 1 の 245 クロンの His タグが付加されたタンパクを発現できるものであり、その内の 224 クロンのガンマグロブリン VH-CH1-hinge をコードしていた。さらに 46 クロンの重複していたので、ユニーククローンとしては最終的に 178 クロンのガンマグロブリン VH-CH1-hinge クロンの得た。

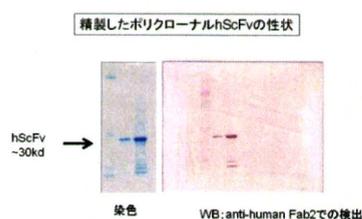
Summary of cluster analysis

- 245 clones were coded peptide with 6xHis tag in 1000 clones
- 224 clones have correct structure of VH-CH1-hinge-6xHis (21 clones have brokenstructure)
- 46 clones were redundant in 224

178 unique clones could be obtained from one thousand

図—5 クロンの配列解析結果

得られた 178 クロンのミックスバッチ培養を行い菌体タンパクを抽出して、図—4 に示す方法でタンパク精製を行った。精製した hScFv の SDS PAGE 染色とウエスタンブロットによる性状解析結果を示す。



図—6 精製 hScFv の性状

染色及び抗体による検出のパターンがほぼ一致しており、一部分解したてい分子を含んではいるが 90%以上の純度で精製できていると考えられる。培養当たりのタンパク回収率は、1L 培養から最終票品で 0.3 から 0.4mg と回収率はよいとは言えない。

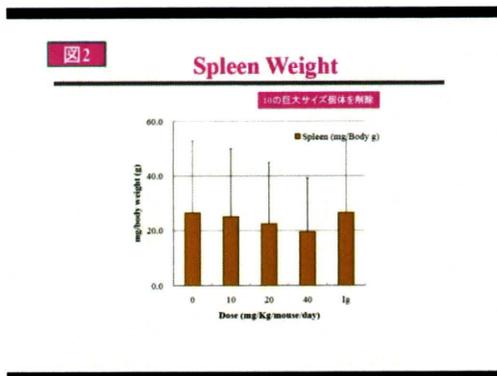
精製 hScFv からのエンドトキシンの除去については、アルカリ処理による分解で行い最終的なエンドトキシン濃度は、4mg hScFv/ml (バッファ; 0.9M アルギニン、

0.9%NaCl pH7.4) において 224EU/ml となり、hScFv タンパク mg 当たり 56EU が混入していることになる。このエンドトキシン混入レベルでもマウスへの投与実験は可能と考え、SCG/kj マウスへの投与実験を行った。

SCG/kj マウスへの投与実験は図—5 に示すように、10 週齢メスマウスに対して、腹腔内投与を hScFv 量 0mg/kg/day、10mg/kg/day、20mg/kg/day、40mg/kg/day の 3dose で行い、対照としてヒトグロブリン製剤の適用量に従った 400mg/kg/day を 5 日間連続投与し、3 週間の経過観察の後、麻酔下で血液、腎臓、肺、心臓、脾臓を採材し、重量測定、血液成分分析を行った。

現在までに実験に投入できたマウスの数が 22 匹と少ないために結果の傾向を示す。

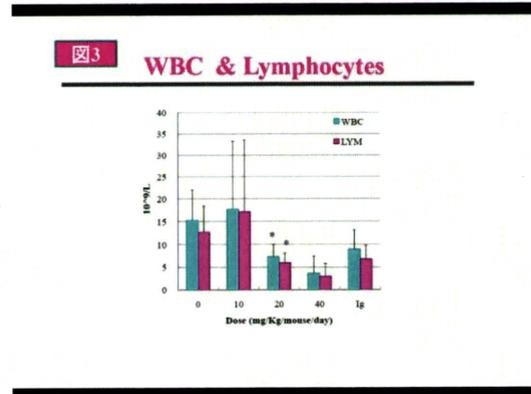
脾臓の重量変化を図—7 に示す。投入マウス数が少ないため有意な差とはなっていないが、投与量に準じて脾臓の腫脹抑制傾向がみられ製剤グロブリンの 20 分の 1 量でも同様の効果を示している。



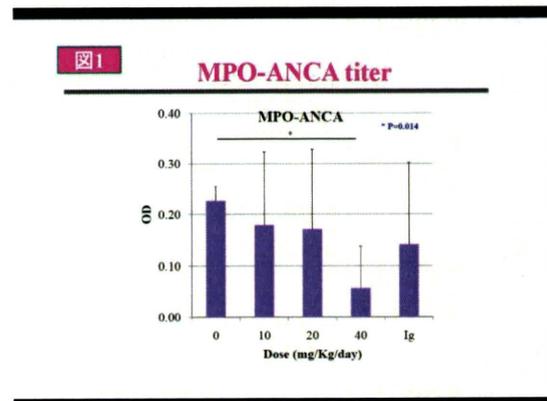
図—7 脾臓重量変化

白血球および末梢血リンパ球数の変化を図—8 にまた、MPO-ANCA 抗体価の変化を図—9 にしめした。hScFv 投入量に比例して減少している傾向がみられ、炎症抑制効果を

示しており、製剤グロブリンの硬化に比べて 20 分の 1 から 40 分の 1 量で製剤ガンマグロブリンと同等の効果を示している。



図—8 白血球およびリンパ球



図—9 MPO-ANCA 抗体価の変化

D. 考案

今年度は主要な結合活性を担う VH と CH1 および hinge を含む VH-CH1-h フラグメントを再構築し再度クローニングを行った。1000 クローンの組み換え体より 178 クローンの hScFv 発現クローンが得られた。

ポリクローンのミックスバッチ培養より精製 hScFv を回収し、最終精製標品 1 L 当たり 0.8~0.9mg を実現した。最終票品のエンドトキシン混入レベルを最小限とし、生