

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と思われる。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 クローンのライブラリーより有効な生物活性を示す 178 クローンを得、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。

本研究班の分担者、高橋、大野、宇野らによっても *in vitro* での生物活性測定が並行して進められており、最終年度に向けてさらに完成度の高い人工ガンマグロブリンを作出するべく評価と検討を継続して行う必要がある。

## E. 結論

VH-CH1-h 構成による hScFv178 クローンのミックスバッチにより、炎症抑制活性を示す人工ガンマグロブリンバッチを作出することができた。

ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj に投与結果は、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示し、人工ガンマグロブリンとしての現実の製剤化に一層近づいたと思われる。さらに大きなライブラリーより有効クローンを収集していくことで、より効果の高い人工ガンマグロブリンを作出できる可能性が考えられる。この点を考慮し、さらに研究を進める必要がある。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Osada N, Uno Y, Mineta K, Kameoka Y, Takahashi I, Terao K.

Ancient genome-wide admixture extends beyond the current hybrid zone between *Macaca fascicularis* and *M. mulatta*.

*Mol Ecol.* 2010 Jul;19(14):2884-95. Epub 2010 Jun 23.

### 2. 学会発表

1. 竹内昌男、東濃篤徳、竹内喜久子、牧野初音、田沼玲子、平田誠、高橋 一朗、梅澤明弘、亀岡洋祐、長期培養により形質転換したヒト間葉系幹細胞のトランスクリプトーム解析、第 33 回日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 神戸

2. 東濃篤徳、長田直樹、坂手龍一、平田誠、亀岡洋祐、保富康弘、高橋一朗、次世代シーケンサーを用いたカニクイザルにおける遺伝子発現解析、第 33 回日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 神戸

3. 亀岡洋祐、小浦美奈子、内田敬子、竹内喜久子、松田潤一郎、長尾朋和、宇野賀津子、大野尚仁、鈴木和男、ヒト monovalent-hScFv の評価検討  
MPO 研究会 2011 年 1 月 仙台

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） | 特記事項なし |
| 1. 特許取得                 |        |
| なし                      |        |
| 2. 実用新案登録               |        |
| なし                      |        |
| 3. その他                  |        |

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

研究分担者 大野 尚仁 東京薬科大学 教授

**研究要旨：** CAWS血管炎は *Candida albicans* NBRC1385由来の複合多糖CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction) をマウスに投与し発症する動脈炎である。CAWS血管炎は冠状動脈起始部に頻発する血管炎であり、川崎病急性期に発症する血管炎と類似していることから川崎病病態モデルとして有用と考えられている。CAWS血管炎の感受性はマウス系統間で異なり、DBA/2マウスは致死的なCAWS血管炎を発症することが知られている。DBA/2の脾臓細胞は *in vitro*でCAWS刺激によりTNF- $\alpha$ 、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- $\alpha$ 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。そこで我々はGM-CSF産生がCAWSの生物活性（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。

**A. 研究目的**

本研究ではマウスに GM-CSF の遺伝子導入を施すことにより、GM-CSF が CAWS 誘発アナフィラキシー様反応並びに CAWS 血管炎に影響を与えるか検討した。本研究では、①作成した GM-CSF プラスミドの活性、②CAWS の急性致死活性に対する GM-CSF の及ぼす影響、③CAWS 血管炎に対する GM-CSF の及ぼす影響、について検討した。

**B. 研究方法**

遺伝子導入には pCAGGS プラスミドベクターを用いた。実験に用いたプラスミドはマウス GM-CSF cDNA を組み込んだ pCAGGS-GM-CSF 及びコントロールとしてマウス GM-CSF の 124 番目のアミノ酸をロイシンからプロリンへ改変したもの

(pGM-L124P) を用いた。さらにリンゲル液のみの投与も行った。これらの遺伝子を Hydrodynamic 法によりマウスに投与し発現させた。

**C. 研究結果**

1. GM-CSF プラスミドの作成

遺伝子導入を行うにあたり、pCAGGS-GM-CSF を作成し、遺伝子導入によるマウスに対する影響を検討した。Hydrodynamic 法にて C57BL/6 マウスに GM-CSF 遺伝子を導入し血中での GM-CSF 濃度を測定したところ、投与翌日に  $110 \pm 100$  ng/ml の GM-CSF が確認され、その後7日目においても高濃度の GM-CSF が産生されていることが明らかになった (Fig. 1)。また、遺伝子導入後7日目のマウスの脾臓細胞に

おけるサイトカイン産生及び各種免疫臓器の細胞数変化を検討したところ、GM-CSF 遺伝子導入群において TNF- $\alpha$  と IL-6 の産生上昇し (Fig. 2A, B), 各種免疫臓器の細胞数の著しい増加が確認された (Fig3A, B, C).

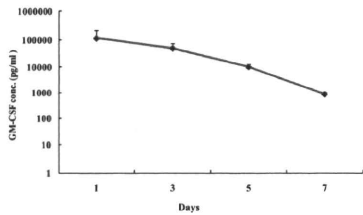


Figure 1. Kinetics of blood concentration of GM-CSF produced by hydrodynamic-based gene transfer pCAGGS-GM-CSF

Aliquot of 10 $\mu$ g pCAGGS-GM-CSF was transferred by hydrodynamic-based gene transfer method, and blood were collected from tail vein. Each blood was clotted and then resulting serum was applied for GM-CSF measurement. The results shown represent the mean $\pm$ S.D.

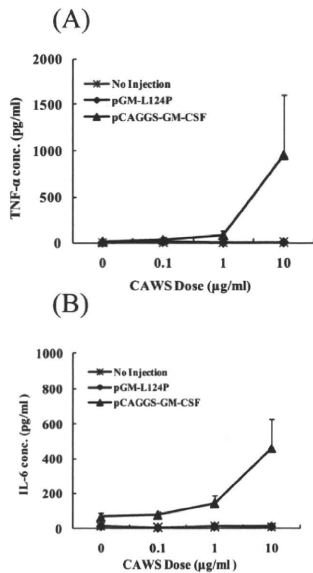


Figure 2. Examination of TNF- $\alpha$  and IL-6 production from splenocytes of C57BL/6 mice administered pCAGGS-GM-CSF

C57BL/6 mice were administered each plasmid by hydrodynamic-based gene transfer method. After 7 days, we prepared splenocytes from mice administered plasmid. These splenocytes were cultured in the presence of CAWS (0, 0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml) for 48 h. After 48 h, TNF- $\alpha$  (A) and IL-6 (B) concentration in culture supernatant were measured by ELISA. The results shown represent the mean $\pm$ S.D. \* $P$ <0.05 and \*\* $P$ <0.01 compared with control plasmid (pGM-L124P) using Student's t-test.

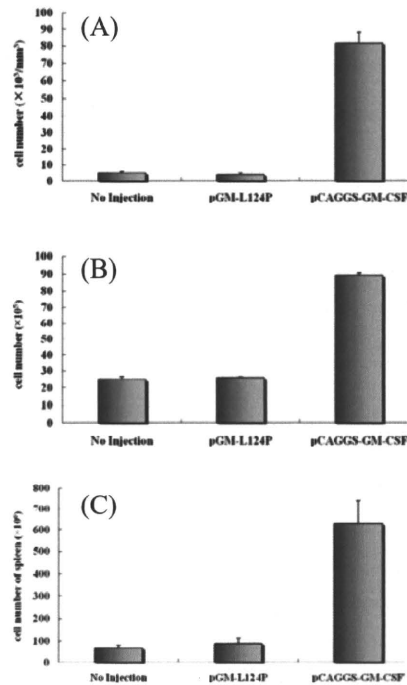


Figure 3 Examination of leukocyte number of lymphoid organs in C57BL/6 mice administered pCAGGS-GM-CSF C57BL/6 mice were administered each plasmid by hydrodynamic-based gene transfer method. After 7 days, we counted white blood (A) cell number and the number of leukocytes of spleen (B) and PEC (C) in plasmid administered mice with Turk's solution. The results shown represent the mean $\pm$ S.D. \* $P$ <0.05 and \*\* $P$ <0.01 compared with control plasmid (pGM-L124P) using Student's t-test.

## 2. GM-CSF 遺伝子導入マウスにおける急性致死活性の検討

CAWS の生物活性の1つである急性致死活性について GM-CSF 遺伝子導入マウスを用いて検討した. 5 週令雄性 C57BL/6 マウスに pCAGGS-GM-CSF を Hydrodynamic 法により 10  $\mu$ g 投与し, 1 週間後に CAWS を尾静脈投与した. コントロール群は pGM-L124P 及びリンゲル液を投与した. コントロール群に対して, GM-CSF 遺伝子導入群では CAWS の急性活性による致死率 (dead/total) が, リンゲル液: 0/6, pGM-L124P: 0/6, pCAGGS-GM-CSF: 9/9 と上昇した (Table 1, 2). また, GM-CSF の遺伝子導入により増悪した CAWS の急性致死はエピネフリン投与により抑制された (Table 3).

Table 1 Acute anaphylactoid reaction of CAWS in C57BL/6 mice administered pCAGGS-GM-CSF

	Dead/Total
No injection	0/6
Ringer	0/6
pGM-L124P(10 $\mu$ g)	0/6
pCAGGS-GM-CSF(10 $\mu$ g)	9/9

C57BL/6 mice were administered each plasmid by hydrodynamic-based gene transfer method. After 7 days, 1mg of CAWS was intravenously administered to C57BL/6 mice. Lethality was monitored 1 hour later.

Table 2 Acute anaphylactoid reaction of CAWS in C3H/HeJ mice administered pCAGGS-GM-CSF

	Dead/Total		
	CAWS(/mouse) 0.1mg	0.05mg	0.01mg
No injection	5/6	1/6	0/6
Ringer	6/6	1/6	0/6
pGM-L124P(10 $\mu$ g)	5/6	1/6	0/6
pCAGGS-GM-CSF(10 $\mu$ g)	6/6	6/6	1/6

C3H/HeJ mice were administered each plasmid by hydrodynamic-based gene transfer method. After 7 days, CAWS (0.1, 0.05, 0.01mg) was intravenously administered to C3H/HeJ mice. Lethality was monitored 1 hour later.

Table 3 Effect of epinephrine of acute anaphylactoid reaction of CAWS in C57BL/6 mice administered pCAGGS-GM-CSF

	Dead/Total
CAWS	6/6
CAWS + Epinephrine	0/6

C57BL/6 mice were administered pCAGGS-GM-CSF by hydrodynamic-based gene transfer method. After 7 days, 1mg of CAWS was intravenously administered to C57BL/6 mice. After 5min, 0.1 mg of epinephrine was administered by subcutaneous injection. Lethality was monitored 1 hour later.

### 3. GM-CSF 遺伝子導入マウスにおける CAWS 血管炎の検討

CAWS 血管炎における GM-CSF の遺伝子導入による影響について検討した。4 週令雄性 C57BL/6 マウスに pCAGGS-GM-CSF を Hydrodynamic 法により 10  $\mu$ g 投与し、1 週間後から CAWS を腹腔内投与により 5 日間連続投与した。最終投与日より 28 日後に屠殺、大動脈起始部の組織切片を作成し血管炎を観察した。コントロール群はリンゲル液を投与した。GM-CSF 遺伝子導入群とコントロール群のいずれも大動脈が著しく肥厚

しており、明確な差が認められなかった (Fig. 3A, B).

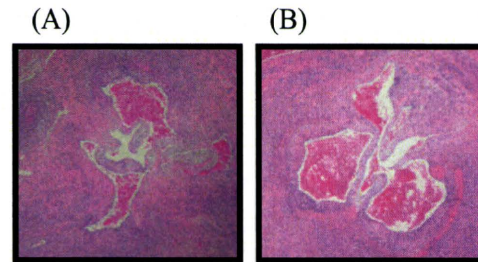


Figure 3. Histological analysis of CAWS-induced vasculitis in C57BL/6 mice administered pCAGGS-GM-CSF

Ringer solution (A) or pCAGGS-GM-CSF (B) was administered to C57BL/6 mice by hydrodynamic-based gene transfer method. After 7 days, CAWS (4 mg/mouse) was i.p. administered to C57BL/6 mice for five consecutive days. At 28 days after CAWS injections, mice were sacrificed and stained by Hematoxylin-Eosin.

### D. 考案

CAWS血管炎はマウス冠状動脈起始部に高率に炎症症状を発症するため、川崎病の病態モデルとして有用であると考えられている。これまでのCAWSに関する研究により、CAWSの構造活性相関、血管炎感受性の系統差、急性致死活性の解析など多くの結果を報告してきた。最も重症なCAWS血管炎を発症するDBA/2マウスではGM-CSFの産生能が、CAWS血管炎に抵抗性のCBA/JマウスではIL-10の産生能が亢進していることをすでに明らかにしており、GM-CSFは増悪因子として、IL-10は抑制性因子として働くと考えられる。これまでの検討でIL-10をコードしたプラスミドを用いた実験により、IL-10がCAWS血管炎の抑制因子として働くことを明らかにした。そこで本研究ではCAWSの活性の一つである急性致死活性やCAWS血管炎に対してGM-CSFがどのような影響を与えるかについて検討した。

その結果、CAWSの急性致死活性においては、GM-CSFが増悪因子として働くこと

が明らかになった。CAWSの致死活性は急性のアナフィラキシー様ショックと考えられており、そのメカニズムとしてCAWSは肥満細胞・好塩基球、マクロファージ・好中球、血小板などに作用し、それぞれPAF・ヒスタミンの遊離、炎症性サイトカインの産生、血小板の活性化などを誘発する。またCAWSのmannan部分を介してlectin pathwayにより補体経路の活性化を促し、アナフィラトキシン(C3a, C5a)を産生する。これらの反応による様々なケミカルメディエーター産生(PAF, ヒスタミン, プロスタグランジン, ロイコトリエンなど)が複雑に関与し、循環不全並びに呼吸不全によって死に至ると考えられる。このようなメカニズムにおいてGM-CSFはマクロファージ, 好中球, 好塩基球などの分化誘導を引き起こし, CAWS急性毒性の感受性を増強したと考えられた。一方, GM-CSFを遺伝子導入したマウスの脾臓細胞は*in vitro*でのCAWS刺激によるIL-6やTNF- $\alpha$ の炎症性サイトカイン産生が亢進していた。これらのことから, 遺伝子導入によりCAWS血管炎は増悪するのではないかと予想されたが, GM-CSFとCAWS血管炎の関係は本研究において明らかにならなかった。GM-CSFのCAWS血管炎に対する影響を検討するためには, CAWSの投与量, 投与ルート, 遺伝子導入のタイミングや回数についてさらに詳細に検討する必要があると考えられた。

#### E. 結論

本研究では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た。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。今後さらに検討を加えたい。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ohno N, Miura NN, Ishibashi K, Hida TH, Adachi Y, Hirata. A Murine Model of Coronary Arteritis Induced by Fungal PAMPs, CAWS, for Drug Development. International Conference on Early Disease Detection and Prevention EDDP,33-36
2. Kei Takahashi, Toshiaki Oharaseki, Yuki Yokouchi, Noriko N. Miura, Naohito Ohno, Akiko I. Okawara, Hisao Murata, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki. Administration of human immunoglobulin suppresses development of murine systemic vasculitis induced with *Candida albicans* water-soluble fraction: an animal model of Kawasaki disease. *Modern Rheumatology*, 20(2), 160-7(2010)

##### 2. 学会発表

##### 国際会議

1. Noriko N Miura, Yoshiyuki Adachi, Ken-ichi Ishibashi, Haruo Hanawa, Yoshihisa Aizawa, Kazuo Suzuki, and

Naohito Ohno Interleukin-10 is a negative regulatory factor of vasculitis induced by fungal PAMPs, CAWS 14TH INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY 2010/8/22 Kobe, Japan

#### 国内会議

1. 村上央、三浦典子、安達禎之、石橋健一、塙晴雄、相澤義房、鈴木和男、大野尚仁  
CAWS に対する GM-CSF 遺伝子導入マウスの応答性 第 54 回日本薬学会関東支部大会 2010 年 10 月 2-3 日 東京
  2. 村上央、三浦典子、安達禎之、石橋健一、塙晴雄、相澤義房、鈴木和男、大野尚仁  
GM-CSF 遺伝子導入マウスの CAWS 急性致死毒性 第 16 回 MPO 研究会 2011 年 1 月 28-29 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得 特になし
  2. 実用新案登録 特になし
  3. その他 特になし

## 人工ガンマグロブリンの評価法の確立

研究分担者 宇野賀津子

所属 (財) ルイ・パストゥール医学研究センター 室長

(研究協力者 武曾恵理 (財) 田附興風会北野病院医学研究所・腎臓内科

猪原登志子 京都大学・探索医療センター

亀岡洋祐 独立行政法人医薬基盤研究所・難病資源研究室

大野尚仁 東京薬科大学・薬学部・免疫

鈴木和男 千葉大学院医学研究科・免疫発生学・炎症制御学

研究要旨：人工化した免疫グロブリンの開発が軌道に乗りつつある。産生された人工 $\gamma$ グロブリンの *in vitro* 評価法は、製品の開発に必須である。今回、去年度に提案した全血を用い、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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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。

### A. 研究目的

MPO-ANCA 腎炎や川崎病などの治療に大量 $\gamma$ グロブリン療法が有効である事が報告されている。しかしながら現行の $\gamma$ グロブリン製剤は血液製剤であるがため、多くの問題を抱えていて、これら問題の解決のために、人工 $\gamma$ グロブリン製剤の開発に期待がもたれている。しかしながら $\gamma$ グロブリン製剤は特定の抗原に対する単一の製剤ではなく、多様なクローンの抗体が混合した製剤である。従って、その開発にあたっては、適切なクローンの選択のためにも、有効な *in vitro* 評価系が必須である。そこで、前回私たちが提案した、*in vitro* 評価系で人工 $\gamma$ グロブリン製剤であるモノバレント hScFv の評価を行った。また併せて、健常人のみならず、IVIg 療法の対象である患者血液を用いて、モノバレント hScFv の *in vitro* 評価を行った。

### B. 研究方法

健常人および、寛解期にある MPO-ANCA 腎炎患者から静脈血をへパリン採血し、採取した血液をそのままイーグル MEM にて、4 倍に希釈した。その後、25  $\mu$ g/ml の PHA を添加 96 穴プレートに 200  $\mu$ l づつ入れた。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。また、対照群として $\gamma$ グロブリン製剤（献血グロベニン-I ニチヤク）を 0.02, 0.2, 2mg/ml に希釈し同様に固相化した。また一部の検体にはモノバレント hScFv をを培養液に 0.008, 0.04 mg/ml となるように添加、 $\gamma$ グロブリン製剤は 0.2, 2mg/ml となるように希釈添加し、CO<sub>2</sub> 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- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$ )を用いて測定した。

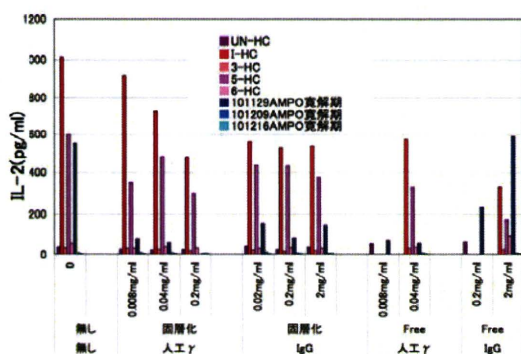
### C. 研究結果

PHA 20 時間刺激により多くの人で IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  の産生が認められた。IL-12p70 は測定限界大半が以下であったので、評価から除外した。

#### C-1 IL-2 産生への影響

Th1 サイトカインである IL-2 の産生に対しては、図 1 に示すように、モノバレント hScFv、 $\gamma$  グロブリン製剤共に、固相化条件、浮遊添加条件共に、IL-2 産生の抑制が認められた。

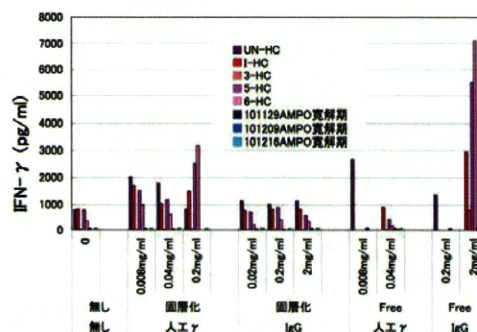
図 1,  $\gamma$  グロブリン製剤の IL-2 産生への影響



#### C-2 IFN- $\gamma$ 産生への影響

Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  の産生に対しては、図 2 に示すように、モノバレント hScFv では固相化条件では亢進、浮遊添加条件では、抑制が認められた。またその作用には個人差が認められた。一方、 $\gamma$  グロブリン製剤では、浮遊添加条件で特に亢進するケースが認められた。以前の試験では、10mg/ml の  $\gamma$  グロブリン製剤の添加により抑制が認められたので、今後より高濃度で、抑制されるかどうかの、検証が必要であろう。

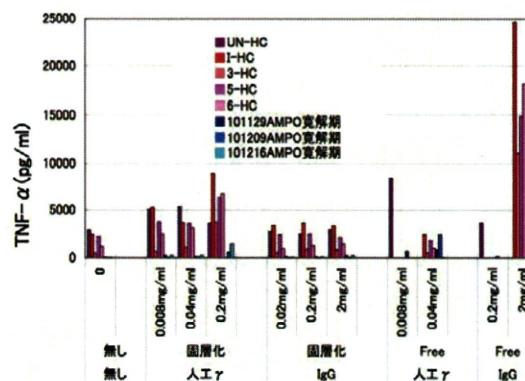
図 2,  $\gamma$  グロブリン製剤の IFN- $\gamma$  産生への影響



#### C-3 TNF- $\alpha$ 産生への影響

Th1 サイトカインである TNF- $\alpha$  の産生に対しては、図 3 に示すように、モノバレント hScFv においては固相化条件では亢進、浮遊添加条件では、抑制が認められた。またその作用には個人差が認められた。一方、 $\gamma$  グロブリン製剤では、浮遊添加条件下で大半の症例では、大きく亢進するとの、結果が得られた。今後より高濃度で、抑制されるかどうかの、検証が必要であると考えられた。

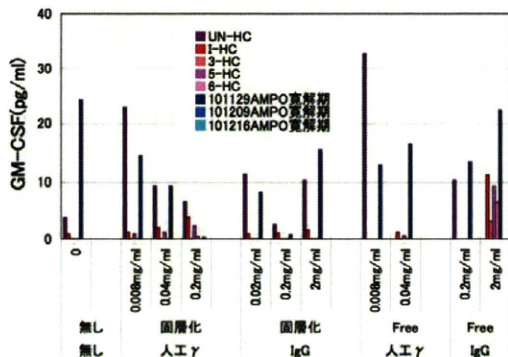
図 3,  $\gamma$  グロブリン製剤の TNF- $\alpha$  産生への影響



#### C-4 GM-CSF 産生への影響

GM-CSF 産生については抑制するケースと亢進する症例が認められた。特に MPO-ANCA 寛解期の一症例では全ての  $\gamma$  グロブリンで抑制が認められたものの、健常人症例では、むしろ亢進していた。

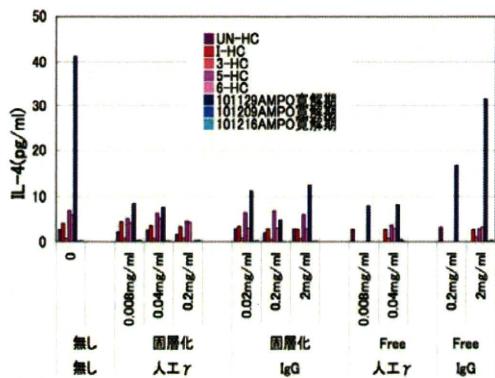
図 4,  $\gamma$  グロブリン製剤の GM-CSF 産生への影響



### C-5 IL-4 産生への影響

Th2 サイトカインである IL-4 の産生に対しては、図 5 に示すように、モノバレント hScFv、 $\gamma$  グロブリン製剤共に、固相化条件、浮遊添加条件共に、IL-4 産生の抑制が認められた。特に MPO-ANCA 腎炎の一症例においては抑制が顕著であった。またグロブリン製剤に比べて、モノバレント hScFv では、より低い濃度でより強い抑制が認められた。

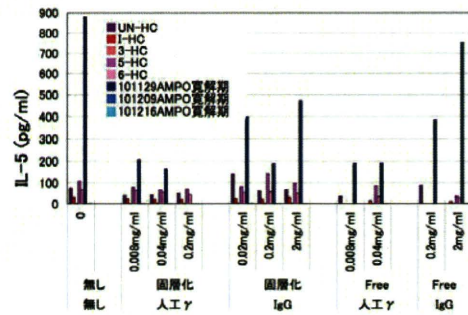
図 5,  $\gamma$  グロブリン製剤の IL-4 産生への影響



### C-6 IL-5 産生への影響

Th2 サイトカインである IL-5 の産生に対しては、図 6 に示すように、モノバレント hScFv、 $\gamma$  グロブリン製剤共に、固相化条件、浮遊添加条件共に、IL-5 産生の抑制が認められた。特に MPO-ANCA 腎炎の一症例におい

図 6,  $\gamma$  グロブリン製剤の GM-CSF 産生への影響

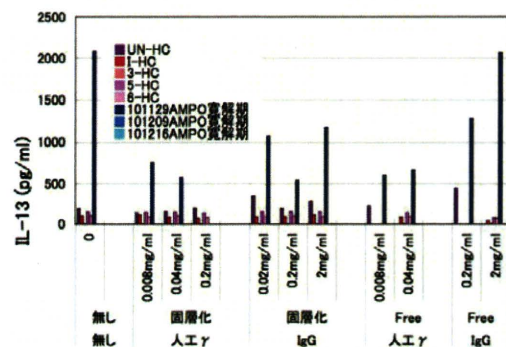


ては抑制が顕著であった。またグロブリン製剤に比べて、モノバレント hScFv では、より低い濃度でより強い抑制が認められた。

### C-7 IL-13 産生への影響

Th2 サイトカインである IL-13 の産生に対しては、ほぼ IL-4, IL-5 と同様の傾向が認められた。モノバレント hScFv、 $\gamma$  グロブリン製剤共に、固相化条件、浮遊添加条件共に、図 7 に示すように、IL-13 産生の抑制が認められた。特に MPO-ANCA 腎炎の一症例においては抑制が顕著であった。またグロブリン製剤に比べて、モノバレント hScFv では、より低い濃度でより強い抑制が認められた。

図 7,  $\gamma$  グロブリン製剤の IL-13 産生への影響

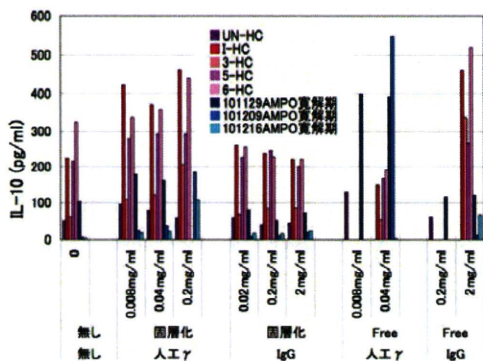


### C-8 IL-10 産生への影響

抑制性サイトカインである IL-10 の産生に対しては、固相化条件、浮遊添加条件で、

モノバレント hScFv、 $\gamma$ グロブリン製剤共に、亢進する傾向が認められた。特に MPO-ANCA 腎炎寛解期の症例では亢進傾向は顕著であった。

図 8,  $\gamma$ グロブリン製剤の IL-10 産生への影響



#### D. 考案

今回の結果は、IL-2 の産生に対しては、モノバレント hScFv は  $\gamma$ 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- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  に対しては抑制効果はほとんど認められなかった。但し、 $\gamma$ グロブリン製剤についても同様の傾向であったので、もう少し高濃度の製剤を使うことが出来れば、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  $\gamma$ 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をしめした。

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  $\gamma$ 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。

#### E. 結論

人末梢血全血を用い、PHA 刺激サイトカイン産生へ人工  $\gamma$ グロブリンを添加することによる、*in vitro* 評価系を確立した。またこの系を用いて人工  $\gamma$ グロブリンであるモノバレント hScFv の評価を行った。IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 の産生においては  $\gamma$ 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、抑制効果が認められた。一方、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\beta$  では、 $\gamma$ グロブリン製剤、人工  $\gamma$ グロブリン共に、産生の亢進が認められた。以前の実験では 10mg/ml の、 $\gamma$ グロブリンの添加では抑制作用が認められ、1mg/ml ではあまり効果がなかったとの結果を得ている。従って、さらに高濃度の人工  $\gamma$ グロブリン製剤の添加で抑制活性を認める可能性はあるが、今後人工  $\gamma$ グロブリンに含まれるクローンの選択の際の検討課題でもあろう。

IL-10 については、今回、特にモノバレント hScFv でむしろ産生が増大するという結果が得られた。IL-10 は免疫抑制性サイトカインであり、IVIg 適用の対象となる疾患においては、今回の結果はむしろ好ましい結果と考えることもできる。

この *in vitro* 評価系は、患者特性、個人特性も反映されることが明らかにされた。また、今後、構成の異なる人工  $\gamma$ グロブリンの評価にも使用可能であり、モノバレント hScFv に含まれるクローンの選択にも有用な評価系である可能性が示された。この測定系は、必要とする血液量は 0.5cc で可能であるので、有用と考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

1. 宇野賀津子 私たちの身体を守るインターフェロンシステム Schneller 2011, No.77 新年冬号,12-17
2. 宇野賀津子 免疫とアンチエイジング アンチエイジング 総合臨床 2011 印刷中
3. Uno K, Okuno K, Kato T, Tada-Oikawa S, Kan N, Saotome H, Yagi K, Hamuro J Pre-operative Intracellular Glutathione Levels of Peripheral Monocytes as a Biomarker to Predict Survival of Colorectal Cancer Patients. Cancer Immunol Immunother. 2010 Oct;59(10):1457-65.
4. Tominaga M, Uno K, Yagi K, Fukui M, Hasegawa G, Yoshikawa T, Nakamura N. Association between capacity of interferon-alpha production and metabolic parameters. J Interferon Cytokine Res. 2010 Jun;30(6):451-4.
5. Uno K, Yagi K, Tanigawa M, Murata K, Fujita S, Yoshikawa T, AGEING EFFECTS ON HUMAN TYPE I IFN SYSTEM IN HEALTHY SUBJECTS, 2010, Cytokine, 52 p.58
6. 宇野賀津子 インターフェロン- $\alpha, \beta, \gamma$  日本臨床 63 巻増刊号 8 広範囲血液・尿化学検査 免疫学検査—その数値をどう読むか— [第7版] p96-101, 2010

2. 学会発表  
国際会議

1. Uno K, Yagi K, Tanigawa M, Murata K, Fujita S, Yoshikawa T AGEING EFFECTS ON HUMAN TYPE I IFN SYSTEM IN HEALTHY SUBJECTS, 2010.10.2-2010.10.9 Chicago
2. Uno K, Yagi K, Muso E, Tominaga M, Ihara T, Tanigawa M, Hasegawa G, Fukui M, Murata K, Nakamura N, Yoshikawa T, Suzuki K, Fujita S Effect of age and diseases on Human Type I IFN System

- 2010.8.22-27 14th International Congress of Immunology, Kobe Japan
3. Ishikawa T, Kokura S, Sakamoto N, Funaki J, Adachi S, Matsumoto T, Matsuura Y, Okayama T, Yoshida N, Uchiyama K, Takagi T, Handa O, Konishi H, Wakabayashi N, Yagi N, Naito Y, Uno K, Yoshikawa T. Impact of adoptive T cell therapy on the cytokines production and the number of Treg in peripheral blood of patients with cancer. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society, 2010 Aug 26; Gifu.
4. Ishikawa T, Kokura S, Sakamoto N, Matsumoto T, Funaki J, Adachi S, Okayama T, Yoshida N, Uchiyama K, Takagi T, Handa O, Konishi H, Wakabayashi N, Yagi N, Tanigawa M, Uno K, Naito Y, Yoshikawa T. Adoptive T Cell Therapy Shifts the Secretion Ability of Cytokines to Th1 and Decreases the Number of Tregs in Patients with Cancer. 101st American Association for Cancer Research (AACR), 2010 Apr 19; Washington, DC, USA.

国内会議

1. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、鈴木和男 ヒトのサイトカイン産生能と疾患特性、個人特性の検討 第16回MPO研究会 2011.1.28-29 東北大学
2. 亀岡洋祐、小浦美奈子、内田敬子、竹内喜久子、松田潤一郎、長尾朋和、宇野賀津子、大野尚仁、鈴木和男 ヒト monovalent-hScFv の評価検討 第16回MPO研究会 2011.1.28-29 東北大学
3. 工藤大介、石井恵子、青柳哲史、久志本成樹、賀来満夫、宇野賀津子、川上和義 NKT 細胞活性化が関与する劇症型 ARDS モデルマウスの免疫病態解析と治療法

- 開発の試み 第 16 回 MPO 研究会  
2011.1.28-29 東北大学
4. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、大野尚仁、三浦典子、亀岡洋祐、鈴木和男 ヒトのサイトカインシステムの検討とその測定系を用いた人工γグロブリンの評価法の確立 平成22年度厚生労働科学研究補助金政策創薬総合研究推進事業 研究成果等普及啓発事業による「成果発表会」ガンマグロブリンの人工化とその応答機構の解析による安全性評価-免疫グロブリンによる血管炎治療と免疫グロブリンの合成とその評価法- 2011. 1. 14 東京大学医学部附属病院
  5. 武曾恵理、立石悠、垣田法子、古宮俊幸、岩崎由加子、猪原登志子、佐藤有紀、米本智美、米倉由利子、塚本達雄、宇野賀津子、鈴木和男 ANCA 陽性で全身血管炎を呈さない腎生検症例の解析 第 2 回「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」班会議 2011. 1. 15 東京大学医学部附属病院
  6. 岡嶋 学、古倉 聡、石川 剛、坂元直行、谷川真理、松本次弘、舟木 準、足立聡子、岡山哲也、吉田直久、内山和彦、高木智久、半田 修、小西英幸、若林直樹、八木信明、内藤裕二、宇野賀津子、吉川敏一。活性化リンパ球療法の末梢血サイトカイン産生能と末梢血 Treg への影響。第 23 回日本バイオセラピー学会学術集会総会。2010 年 12 月 9 日；大阪。
  7. 宇野賀津子、谷川真理、吉川敏一、藤田哲也 健康人、癌からの長期生存者、末期癌患者の IFN- $\alpha$  産生能の個人史の比較(Comparison of IFN-alpha production in healthy subjects, long term cancer survivors and non-survivors) 第 69 回日本癌学会学術総会
  8. 宇野賀津子 ヒト IFN システム不全と感染抵抗性、癌抵抗性 シンポジウム「私たちの身体を守るインターフェロンシステム」第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2010.6.25-26
  9. 高橋珠紀、室 繁郎、寺田邦彦、宇野賀津子、星野勇馬、小川恵美子、成石浩司、高柴正悟、三嶋理晃 血清歯周病抗体価と COPD (慢性閉塞性肺疾患) 増悪との関連性 第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2010. 6. 25-26
  10. 宇野賀津子 未病先防: インターフェロン・サイトカインシステム測定の有用性 シンポジウム「免疫と老化の最前線」第 10 回抗加齢医学会総会 2010. 6. 11-13 京都
  11. 富永真澄、宇野賀津子、八木克己、福井道明、長谷川剛二、吉川敏一、中村直登 IFN- $\alpha$  産生能と代謝因子 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2010 年 5 月 27-29 日；岡山
  12. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、土橋康成、鈴木和男 サイトカイン・ケモカインパネル測定と、疾患プロファイル 第 1 回「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班会議 2010. 5. 14-15 横浜開港記念会館
  13. 武曾恵理、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 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 第 1 回「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班会議 2010. 5. 14-15 横浜開港記念会

館

14. Uno K, Mso E, Ito-Ihara T, Suzuki K  
Comparison of Type I IFN Systems amongst healthy subjects, MPO-ANCA nephritis patients, and IgA nephritis patients 第2回「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」班会議（千葉）  
2010.1.15-16
15. Muso E, Uno K, Iwasaki Y, Tateishi, Komiya T, Ihara T, Suzuki K 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-第2回「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」班会議（千葉） 2010.1.15-16

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

## 難治性血管炎の遺伝子解析

分担研究者 野島 博 大阪大学微生物病研究所 教授

### 研究要旨：

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。

### A. 研究目的

IVIG 治療の有効性の仕組みを解明するため、IVIG 治療が有効である可能性のある自己免疫疾患患者の血液細胞（主として白血球）で転写誘導（抑制）されている遺伝子群を包括的に単離し、疾患発症に深く関わっている遺伝子を見出すことを目的とする。その有効な活用法として、パスウェイ解析や統計解析の手法を試みる。さらに単離した遺伝子（mRNA）の転写レベルを個々の患者で調べることと並行して、遺伝子産物であるタンパク質の発現量を迅速に検査・診断できる技術を新たに開発することも目的とする。確定診断の難しい血管炎において、mRNA とタンパク質の発現パターンを組み合わせるタイプの新規な診断マーカーとして用いる可能性も探る。

### B. 研究方法

健常人および慢性糸球体腎炎（IgA 腎症および非 IgA 腎症）患者の血液細胞（主として白血球）から PaxGene を用いて RNA を精製する。その品質は分析機器として Bioanalyzer、試薬キットとして Agilent RNA 6000 Nano Kit を用いて実験前に確認した。これをプローブとしてアジレント社の DNA マイクロアレイ（Hu44K）をスクリーニングする。集めたデータは Ingenuity 社の Ingenuity pathway analysis (IPA) ソフトウェア、NextBio 社の NextBio ソフトウェア、Ajilent 社の GeneSpringGX ソフトウェアを用いて解析した。結果の普遍性を担保するため、以下の 2 ケ所の独立した病院から患者血液を集めて解析し結果を比較して共通に観察される事象を抽出することにした。（1）武曾恵理医師：（財）田附興風会医学研究所北野病院、（2）長澤康行医師： 阪大医学部付属病院

(倫理面への配慮)

部局で倫理委員会の承認を受けるとともに、健常人および患者の血液採取は全て書面によるインフォームド・コンセントをとることで倫理面に配慮した。本研究計画では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訳ではないので、いわゆるゲノム倫理面の問題はないと考えられ、実際にゲノム倫理委員会でもそのような判断がなされたが、念のため規則に準じた扱いをした。また、これとは別に阪大の「ヒトゲノム研究審査」を申請して許可を得た。

### C. 研究結果

#### 慢性糸球体腎炎特異的遺伝子群の同定

ヒトゲノムで転写されている4万個以上の遺伝子(mRNA)のうち、健常人に比べて慢性糸球体腎炎(IgA腎症および非IgA腎症)患者の白血球で大量に転写されている遺伝子を抜き出して表示した(図1)。中でも注目すべきはIgA腎症か非IgA腎症にかかわらずほとんどすべての患者で転写誘導されている以下の5つの遺伝子である。

LRFN1 (leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 1), KRTAP8-1 (keratin-associated protein 8-1), SHANK1 (SH3 domain and ankyrin repeats 1), C7 (complement component C7)、SLC26A1 (solute carrier protein 26), SLC22A7。これらの機能は未知の部分が多く残されているが詳しく解析する価値のある遺伝子だと考えている。とくにSLC26AもSLC22A7も陰イオン輸送体として働いている点から腎機能に関与している可能性が高い。また補体全般が自己免疫疾患発症に果たす重要な役

割はすでに幾つか報告されているので、これも注目に値する。これらは抗体が市販されているので、入手してリユーコキャッチを用いた抗体検索も並行して進めている。

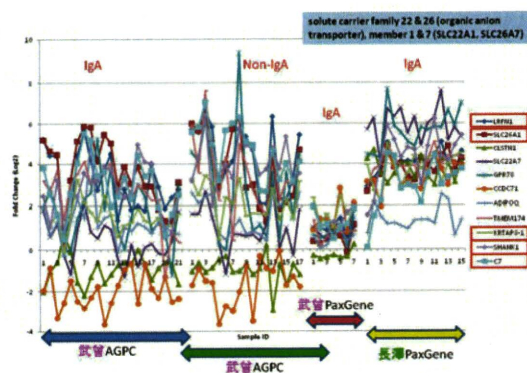


図1：慢性糸球体腎炎患者の白血球細胞でのみ転写誘導されている遺伝子の患者ごとの変動パターン。ほとんどの武曾患者サンプルと長沢患者サンプルで過剰発現している遺伝子を赤枠で囲ってある。今回はIgA腎症と非IgA腎症を明確に区別する遺伝子は同定できなかった。

#### スピアマンの順位相関係数

スピアマンの順位相関係数は統計処理法の一つで、データが正規分布するならばピアソンの相関係数  $r$  で検定すればいいが、正規分布しないなら Spearman の順位相関係数  $r_s$  で検定する。IgA腎症のみを集めて解析し、パラメータを図2に示した基準で設定し(signature 1)、ここの長沢サンプルと武曾サンプルの患者で Spearman の順位相関係数を計算して比較した。

#### スピアマンの順位相関係数(順序尺度)

- Signature genes 1 の抽出法
1. 全て(15)のケースサンプルで2倍以上増加する遺伝子、206個。
  2. 全て(15)のケースサンプルで、Processed Signalが -0.4から0.4にある遺伝子、182個。
  3. 全て(15)のケースサンプルで1/2以下に減少する遺伝子、232個。

計620個

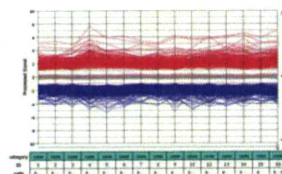


図2：Spearman の順位相関係数の計算基準。



この時、武曾サンプルのうち、ひとりだけ IgA 腎症ではないサンプルを混ぜてブラインドテストをした。結果、見事にひとつだけが他とは大きく外れて検出できた。この患者は紫斑病性腎炎が疑われており、IgA の沈着は強いが別疾患と考えられており活動性の低いものでは組織所見では区別がつかない。今回、これを血液の遺伝子検査で検出できたことは、慢性糸球体腎炎の診断が生体組織診断（バイオプシー）に頼らずにできることを示唆する。ただし、長沢サンプルと武曾サンプルの患者でずれている点は解決すべき問題である。いずれにせよ、この方面からの研究はもっと進展させる価値があると判断する。

### スピアマンの順位相関係数(順序尺度)

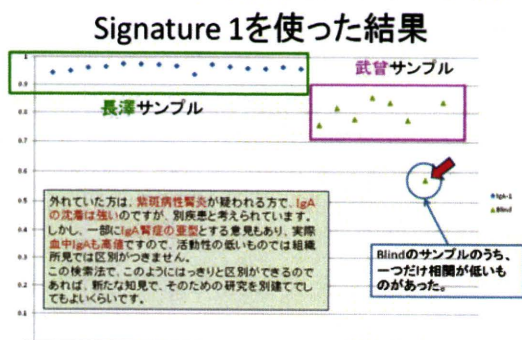


図 3: スピアマンの順位相関係数による IgA 腎症と非 IgA 腎症との識別。

### D. 考察

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。これらは抗体が市販されているので、入手してリューコキャッチを用いた抗体検索は価値あるものと考察した。

### E. 結論

上記の結果から、スピアマンの順位相関係

数は将来有望なツールとなる可能性があるので、サンプル数をもっと増やして、検討をする価値があると結論した。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Shigehisa A, Okuzaki D, Kasama T, Tohda H, Hirata A, Nojima H. Mug28, a Meiosis-specific Protein of *Schizosaccharomyces pombe*, Regulates Spore Wall Formation. *Mol Biol Cell*. 2010 Jun 15;21(12):1955-67. Epub 2010 Apr 21.
- (2) Okuzaki D, Kasama T, Hirata A, Ohtaka A, Kakegawa R, Nojima H. Spo5 phosphorylation is essential for its own timely degradation and for successful meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle*. 2010 Sep 7;9(18):3751-60.
- (3) Funato Y, Terabayashi T, Sakamoto R, Okuzaki D, Ichise H, Nojima H, Yoshida N, Miki H. Nucleoredoxin Sustains Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling by Retaining a Pool of Inactive Dishevelled Protein. *Curr. Biol.*, 2010 Nov 9;20(21):1945-52.
- (4) Aylon Y, Ofir-Rosenfeld, Y., Yabuta N, Lap, E. Nojima H, Lu, X. and Oren M. The Lats2 tumor suppressor augments p53-mediated apoptosis by promoting the nuclear proapoptotic function of ASPP1. *Genes Dev.*, 2010 Nov 1;24(21):2420-9.
- (5) Okuzaki D, Fukushima T, Tougan T, Ishii T., Kobayashi S, Yoshizaki K, Akita T, and Nojima H. Genopal<sup>TM</sup>: a novel hollow

fiber array for focused microarray analysis.  
DNA Res., 2010 Dec;17(6):369-79.

(6) Tougan T, Kasama T, Ohtaka A, Okuzaki D, Saito TT, Russell P, Nojima H. The Mek1 phosphorylation cascade plays a role in meiotic recombination of *Schizosaccharomyces pombe*. Cell Cycle., 2010 Dec 1;9(23):4688-4702.

3. その他  
なし

## 2. 学会発表

### 国際会議

Daisuke Okuzaki, Tatsunobu Fukushima, Takahiro Tougan, Tomonori Ishii, Shigeto Kobayashi, Kazuyuki Yoshizaki, Takashi Akita, Hiroshi Nojima: A novel Diagnostic markers for Takayasu Arteritis obtained by Genopal focused microarray based on Spearman rank correlation, The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 8, 2010.

### 国内会議

奥崎大介、野島博: A novel Diagnostic markers for Takayasu Arteritis obtained by GenopalTM focused microarray based on Spearman rank correlation: 第 33 回日本分子生物学会大会 (神戸ポートアイランド)平成 22 年 12 月 9 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許出願  
なし

2. 実用新案登録  
なし

## CAWS 誘発血管炎モデルにおける抗 TNF- $\alpha$ 製剤の血管炎抑制効果の検討

研究分担者 高橋 啓 東邦大学医療センター大橋病院病理診断科 教授  
(研究協力者 大原関利章、横内幸、山田仁美(大橋病理)、佐地勉(東邦大小児)、  
三浦典子、大野尚仁(東薬大)、長尾朋和、 富澤一夫、鈴木和男(千葉大)

**研究要旨：** CAWS 誘発マウス血管炎モデルに抗 TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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。

### A. 研究目的

CAWS 誘発マウス血管炎モデルに対して抗 TNF- $\alpha$  製剤投与による血管炎抑制作用を検討する。同時に炎症性サイトカインと血管炎との関連について検討する。

### B. 研究方法

C57BL/6N マウス(4 週齢、雄)に対し 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作製し、汎血管炎の発生頻度、血管炎の広がりや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。

### C. 研究結果

E 群では未治療群と比較して汎血管炎の

発生頻度、炎症の範囲、炎症の程度すべてが有意に抑制された(表 1, 2, 3)。一方、I 群では抑制効果を得ることは出来なかった。血管炎の組織像は、群間で明らかな差を見いだすことは困難であった。屠殺時に得た血漿中のサイトカインの内、IL-6、G-CSF は E 群で低値を、IL-10 は E 群で高値を示した。一方、TNF- $\alpha$  は未治療群、E 群間で差異を見出せなかった。

表 1 心基部における汎血管炎発生頻度

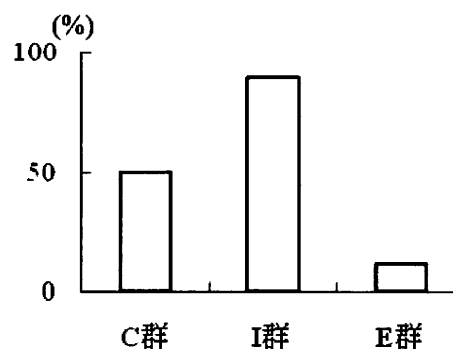


表2 炎症範囲

心基部を5区域に分けた時の1マウスあたりの炎症区域数

	mean	sd	
未治療	2.3	2.0	
I群	2.4	1.7	ns
E群	0.2	0.5	P<0.01

表3 炎症程度

各区域の炎症を0(炎症なし)~3(汎血管炎)に分類した時の1マウスあたりの累計スコア

	mean	sd	
未治療	6.1	6.5	
I群	6.8	5.1	ns
E群	0.4	1.0	p<0.01

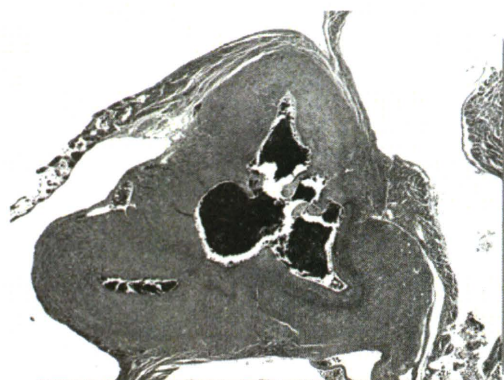


図1 血管炎病理組織像(未治療)

#### D. 考案

本マウス血管炎誘発モデルではCAWS投与後早期に血漿TNF- $\alpha$ が上昇することが明らかになっている。このTNF- $\alpha$ の作用を阻害することで血管炎の発生や炎症の進展を抑制しうることが示された。I群とE群とで効果に差が出たのは作用機序の差に起因する可能性がある。E群でいくつかの炎症性サイトカインの上昇が抑制されていたこと

は、TNF- $\alpha$ の作用を抑制することで汎血管炎に至る一連の炎症過程を阻害し得ることを示すと考えられた。今後、本薬剤が血管炎の初期像から汎血管炎完成に至るいずれの過程に作用しているのか、病理組織学的に検討したい。

#### E. 結論

本血管炎誘発モデルにおいて、TNF- $\alpha$ 製剤は血管炎発生に抑制的に働くことが確認された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kobayashi S, Fujimoto S, Takahashi K, Suzuki K: Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis, Large Vessel Vasculitis and Kawasaki Disease in Japan. *Kidney & Blood Pressure Research*. 33:442-55. 2010
2. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Miura NN, Ohno N, Okawara AI, Murata H, Naoe S, Suzuki K: Administration of human immunoglobulin suppresses development of murine systemic vasculitis induced with *Candida albicans* water-soluble fraction: an animal model of Kawasaki disease. *Mod Rheumatol* 20: 160-7, 2010
3. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Hiruta N, Naoe S: Kawasaki Disease as a Systemic Vasculitis in Childhood. *Ann Vasc Dis* 3: 173-81, 2010