

201108003A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 24 年 (2012) 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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

鈴木 和 男

平成 24 年 (2012) 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：千葉大学大学院医学研究院 特任教授
鈴木 和男

研究分担者

大野 尚仁：東京薬科大学薬学部 教授
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
亀岡 洋祐：(独)医薬基盤研究所 主任研究員
宇野賀津子：(財)ルイ・パストゥール医学研究センター基礎研究部
インターフェロン・生体防御研究室 室長
高橋 啓：東邦大学医療センター大橋病院 教授
野島 博：大阪大学微生物病研究所 教授
平橋 淳一：東京大学医学部附属病院 助教
武曾 恵理：(財)田附興風会医学研究所北野病院 副院長・部長
佐地 勉：東邦大学医療センター大森病院 教授
有村 義宏：杏林大学医学部第一内科学教室 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 特任教授
湯村 和子：自治医科大学 教授
藤元 昭一：宮崎大学 教授
埴 晴雄：新潟大学大学院医歯学総合研究科 講師
山縣 邦弘：筑波大学大学院 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：大島正道（国立感染症研究所室長）、本間栄（東邦大大学医療センター大森病院教授）、中島裕史（千葉大学大学院医学研究院教授）、王 碧昭（筑波大学教授）、新井孝夫（東京理科大学教授）、濱野慶朋（自治医科大准教授）、小野孝彦（市立島田市民病院部長）、三浦典子（東京薬科大講師）、猪原登志子（京都大学医学部附属病院探索医療センター研究員）、吉原堅（杏林大学医学部講師）、池田啓（千葉大学医学研究院助教）、大原関利章（東邦大医療センター大橋病院助教）、鈴木章一（佐賀大学医学部助教）、
アドバイザー：直江史郎（桐蔭横浜大、教授）、岡崎富男（呉共済病院看護専門学校校長）、橋本博史（順天堂大学医学部名誉教授）、中山俊憲（千葉大学大学院医学研究院教授）、David Jayne（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

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、河内正治、小浦美奈子、大島正道、松田純一郎、鈴木和男	13
--	----

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) C5 欠損マウスを用いた CAWS 血管炎誘発メカニズムの解析 大野尚仁	18
--	----

2-2) MPO-ANCA 関連血管炎患者の IFN システム不全と易感染性 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子	23
--	----

2-3) 自己免疫疾患患者の血液細胞に見られる変動遺伝子群の包括的理解 野島 博	28
---	----

3) モデルマウスによる *in vivo* の評価法に関する研究

3-1) 川崎病類似マウス血管炎モデルを用いたヒト monovalent-hScFv の病理組織学的評価 高橋 啓、大原関利章、横内幸、山田仁美、佐治勉、三浦典子、大野尚仁、亀岡洋祐、 長尾朋和、富沢和夫、鈴木和男	32
---	----

3-2) 臓器炎におけるサイトカイン、ケモカインの産生と作用に関する検討 -細胞外基質の変化と DAMPS としてのヘム蛋白- 埜 晴雄	35
--	----

3-3) ザイモザン誘発性肺炎におけるミエロペルオキシダーゼ欠損の影響 荒谷康昭	38
---	----

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) 免疫グロブリン大量療法の対象となる病理所見を呈する MPO-ANCA 陽性 MPA の 糸球体病変を指標とする組織分類の我が国における評価 武曾恵理、遠藤知美、垣田浩子、立石悠、古宮俊幸、岩崎由加子、猪原登志子、 板橋美津世	43
--	----

1-2) 急性期川崎病血管炎における免疫グロブリン投与前後のアディポサイトカイン プロファイル 佐地勉、監物靖、高月晋一、嶋田博光、直井和之、中山智孝、松裏裕行、高橋 啓、 川合眞一	47
--	----

1-3) 間質障害を主体とする ANCA 関連腎炎に対する病理学的考察 今井圓裕、野中慶佑、尾崎武徳、丸山彰一、松尾清一	51
---	----

1-4) ANCA 関連血管炎の再燃時治療における γ グロブリン療法の代替療法について 山縣邦弘、臼井俊明、樋渡昭、臼井丈一、甲斐平康、森戸直記、斎藤知栄、楊景堯、 鶴岡秀一	54
---	----

1-5) Churg-Strauss 症候群における免疫グロブリン大量静注療法の評価 湯村和子、濱野慶朋	56
---	----

2) 臨床研究および疫学	
2-1) 多発性筋炎(PM)・皮膚筋炎(DM)に対するガンマグロブリン大量療法 (IVIG) 小林茂人	60
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	62
2-3) ANCA 関連血管炎 158 例の臨床像と予後の推移 有村義宏、吉原堅、駒形嘉紀、要伸也、山田 明	66
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、川畑 仁人、有田 誠、鈴木 和男	72
III. 班会議資料	77
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	82
V. 研究成果の刊行物・別刷	99

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 — 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。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て、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。今年度は、26 クローンを新たに加えた 204 クローンの配列解析を精査し組換えタンパクの内容を確定するとともに精製した。昨年度、ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj に投与し炎症抑制効果を確認できたが、エンドトキシンの除去は必須であったため、。標品からのエンドトキシンの除去について検討した。前臨床試験に向けた安全な大規模バッチの人工ガンマグロブリンの作成を可能とすることができた。また、臨床分科会では、IVIg 治療成績および病態解析を行った。

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、これまでに、本研究班により開発された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が血管炎マウスモデルにおいてにて治療効果が確認されている。抗体分子内の可変領域である scFv で治療効果があり、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。昨年度までに、VH と CH1 および hinge を含む VH-CH1-h フラグメントを再構築のライブラリーを再クローニングし、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からその配列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。今年度は組み換えタンパクの内容を確定するため、配列解析データを精査してクローンの内容の確

定を目指した。また、昨年度、投与により炎症抑制効果を確認できたが、エンドトキシンの除去は必須であったため、標品からのエンドトキシンの除去について検討した。

B. 研究方法

重鎖 Fab の単鎖フラグメント設計：大腸菌での発現ベクター 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確認した。クローンの配列データを再度精査し、VH-CH1-hinge 組み換えタンパクの内容を確定した。

エンドトキシン除去法の検討：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、アルカリ変性法を処理条件を変え、エンドトキシン吸着除去剤 ET クリーンによる吸着法による除去、エンドトキシン除去用フィルター PosidyneELD フィルターによるキャプチャー法の 3 種類の方法および効果が比較的高いアルカリ変性法とエンドクリーンによる吸着除去法の組み合わせによる除去を試みた。

IFN- α 産生能の測定；全血にセンダイウイルスを入れ、20 時間後に上清を回収し、IFN 活性をバイオアッセイ法にて測定し、産生能とした。また、全血中のプラズマサイトイド樹状細胞 (pDC) は CD3⁻, CD19⁻, CD14⁺, HLA-DR⁺, BDCA-2⁺細胞を FACS にて同定し、pDC とした。また血清中の IFN- α および β を ELISA およびビーズアレイ法にて測定した。また、LAMP-2 (lysosomal-associated protein -2)、Calprotectin (Neutrophil Extracellular Traps 中の抗真菌因子)、BPI (bacterial/ permeability increasing protein) は ELISA にて測定した。

モデルマウスの血管炎の評価：

病理評価：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、hScFv を 9, 4.5, 2.25 mg/kg を連続 5 日間腹腔内投与した。また、ヒト免疫グロブリン (hIG)400mg/kg を同様に投与する群を設けた。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、血管炎の広がりや炎症の程度を病理組織学的に検討した。

系統差と生存率および MCP-1 評価：CAWS 血管炎は、CAWS を腹腔内投与により 3 系統のマウス (A/J, AKR, DBA/2) に 5 日間連続投与して発症させた。投与終了日を day 0 として維持飼育し、生存率を比較した。day 42 にマウスを屠殺し、摘出した各臓器より組織切片を作成した。また、これらのマウスから脾臓細胞を調整し、各種 PAMPs で in vitro 刺激した後、上清を回収し、MCP-1 の産生を ELISA で測定した。

SCG/Kj マウスの治療評価：ANCA 血管炎/腎炎の自然発症モデルである SCG/Kj マウスに血管炎発症前 (7 週令) から EPA (5%混餌) を長期投与し生存率を観察した。

遺伝子解析：各血管炎患者を対象に各検体より採取した RNA を用いて DNA チップ解析 (Agilent, Hu44K) 解析を行った。本研究課題期間内は各病態で抽出される変動遺伝子群を用い、ネットワーク解析とパスウェイ解析を中心に行った。病態間で共通して認められる特定のパスウェイ内での変化や特異的に認められる変化について解析した。

2. 【臨床分科会】

CSS 症候群への VIg 療法

CSS 症候群の 1 症例に対して、IVIg 療法 (1 日免疫グロブリン製剤 (帝人) 20g/日を 5 日間連日投与した。保険適応になっている末梢神経障害の評価を神経伝導速度で評価し、他の病態・検査所見の変化もみた。

腎病理所見：対象：北野病院と東京女子医大病院で腎生検が施行され、5 年後の予後が確認されている顕微鏡的多発血管炎 (MPA) 症例 52 例 (平均年齢:64.5 歳(49-89)) 男女比：23:29。

解析法：腎病理所見を4カテゴリーに分類、腎生検時、半年、一年、5年後のCr, eGFR, 腎生存率を検索。腎機能の推移をeGFRで検討。腎生存率をKaplan Meier法で解析し、比較した。

【症例報告－1】名古屋大学医学部附属病院腎臓内科に平成23年度に入院したANCA関連患者5名の中から、腎生検を行った症例のうち、尿細管間質腎炎の病理型を示す2症例を検討した。**病歴から臨床像を解析**：対象は1983年1月から2010年12月の間に杏林大学第一内科(腎臓・リウマチ膠原病内科)に入院し、初期寛解導入療法を行ったAAV158例。病歴から臨床像を解析し、予後に関しては、MPO-ANCAの保険収載年(1998年)、急速進行性腎炎(RPGN)の診療指針刊行(2002年)年の2時期を区切りに3期に分け検討した(I期:1983年～1998年、II期:1999年～2002年、III期:2003年～2010年)。死亡例は治療開始1年以内の死亡、透析導入例は治療開始1年以内の透析導入とした。

国際比較解析：AAV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、肉芽腫性多発血管炎(GPA)、Churg-Strauss症候群(CSS)の3症候群とし、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2国間の比較研究の調査対象期間は2005年1月～2009年12月の5年間である。

急性期川崎病へのIVIg治療時の血清中 Resistin, High-molecular weight HMW adiponectin, leptin, visfatin：急性期川崎病(KD)56例、健常小児対照(HC)：30例、急性感染症対照(FC)31例、全：117例。

(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、個人情報情報はコード化し、ネットワークでの個人情報交換はしないなど、プラーク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

1. 【基礎分科会】

エンドトキシン除去：有効クローン数に増やした204クローンのミックスバッチ培養から菌体タンパクを抽出して、タンパク精製を行い、エンドトキシン除去試験用の標品を作成した。精製されたVH-CH1-hinge組換えタンパクは、アルカリグアニジン溶液によるアルカリ加水分解処理では、バッファー交換作業のみで約3分の1に低下し、処理時間を3時間、12時間、24時間と長くすることにより最終的には700ユニット程度まで低下させることができた。エンドトキシン吸着剤ETクリーンによる吸着除去では1回の吸着処理で267ユニットまで低下させることができた。アルカリ処理による加水分解とその後のETクリーンによる吸着の組み合わせ

では最終的にタンパク 1mg あたり 21 ユニットとかなりの程度に除去できた。

in vitro 評価：その 1 = 急性期の MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能：急性期の MPO-ANCA 腎炎患者の IFN- α 産生能は、健常人に比較して大きく低下していた。健常人の平均は 10401 \pm 917 IU/ml、MPO-ANCA 腎炎患者の平均は 4784 \pm 896 IU/ml、PR3-ANCA 腎炎患者では 7591 \pm 2938 IU/ml で、健常人に比較して MPO-ANCA 腎炎患者では有意に低下していた。また、健常人では 4000 IU/ml 以下を示す人は 5.4%であったが、MPO-ANCA 腎炎患者では 60.4%、PR3-ANCA 腎炎患者では 50.0%であり、これら患者の IFN 産生能は高頻度で低値を示した。

その 2 = MPO-ANCA 腎炎患者のプラズマサイトイド樹状細胞数：主たる IFN- α 産生細胞である pDC 数について検討した結果、MPO-ANCA 腎炎患者のうち、約半数の患者 pDC 数は、図 3 に示すように健常人に比べて大きく低下していた。症例は少ないが PR3-ANCA 腎炎患者の pDC 数も大きく減少していた。

その 3 = 血中 IFN：IFN- α 産生能の低値群においては血中 IFN- β が検出された。健常人ではほとんど血漿中には、IFN- α / β は検出されなかったことから、MPO-ANCA 腎炎患者では、IFN システムの制御不全が推察された。

その 4 = 血中 LAMP-2、Calprotectin、BPI：MPO-ANCA 腎炎患者の多くににおいて、血中に IFN が検出されたこと、また pDC 数の極端な減少の一因として、先行する感染との関連が推察された。そこで、LAMP-2 (lysosomal-associated protein-2)、Calprotectin (Neutrophil Extracellular Traps 中の抗真菌因子)、BPI (bacterial/permeability increasing protein) を ELISA 法で検討した。その結果、MPO-ANCA 腎炎患者で LAMP-2、Calprotectin が有意に高値であった。また一部患者では BPI が高値を示した。このことは、多くの MPO-ANCA 腎炎患者において、先行して感染が認められた可能性が示唆された。

モデル動物 CAWS 血管炎の病理評価：

hScFv4.5mg/kg 投与群では未治療群と比較して汎血管炎の発生頻度、炎症範囲、炎症程度は抑制傾向を示した。2.25mg/kg 投与群では抑制傾向は得られなかった。一方、9mg/kg 投与群では屠殺前に死亡例が生じた (図 1)。

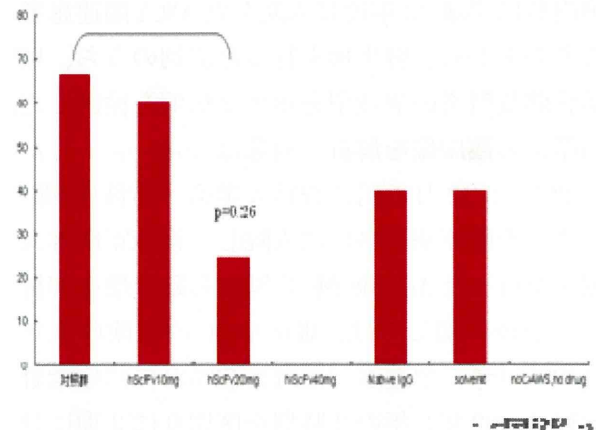


図 1. hScFv 投与による治療効果

発症機序解析— 1. C5 欠損マウスにおける CAWS 血管炎：CAWS を投与した A/J, AKR, DBA/2 の 3 系統のマウスを最終投与日から 42 日後に屠殺、大動脈起始部周辺の臓器切片を作成し HE、または EVG 染色した結果、3 系統のマウスは大動脈組織へ炎症性細胞浸潤や血管壁肥厚を伴う血管炎を発症した。また EVG 染色より、3 系統ともに大動脈弁周辺に線維化が生じていることが確認された。これらのことから A/J および AKR は DBA/2 と同様、CAWS 血管炎を発症することが明らかとなった。

発症機序解析— 2. C5 欠損マウスの CAWS 血管炎による致死の検討：C5 欠損マウス (A/J, AKR) における CAWS 血管炎による致死を DBA/2 と比較した。DBA/2 マウスは、ほぼ全例が死亡した。このように C5 欠損マウス間でも生存日数に差が見られたことから、CAWS 投与による致死は多遺伝子により起こる現象であり、その一因子として C5 が関与している可能性が示唆された。

発症機序解析— 3. CAWS 刺激による MCP-1 産生：炎症反応にはケモカインや接着分子が重要な役割を果たすが、MCP-1 が川崎病の急性期に

血中増加し、組織においても発現が増強しているとの報告がある。そこで CAWS 血管炎における MCP-1 の産生について検討した結果、C5 欠損マウスは C5 を有するマウスと比較して CAWS 刺激による MCP-1 の産生が高い傾向にあった。MCP-1 産生の亢進は単球をより強く炎症部位へ遊走させ血管炎発症において増悪因子となっていると考えられた。

他のモデル 1 : T 細胞の寿命に影響し、サイトカイン産生にも影響があると報告されているオステオポンチンは、コラーゲンやファイブロンネクチンなどの細胞外基質と異なり、心筋炎の発症直前から急激に上昇し、急性期には 1000 倍以上発現が増加した。また細胞外基質を分解する多くの MMP の発現は心筋炎発症初期から増加していた。MMP の中でも MMP-3、MMP-9 は IL-1 によって誘導された。MMP の阻害作用を持つ TIMP については、TIMP-1 は発症、IL-1 刺激によって増加していたが、TIMP-3 は発症や IL-1 刺激によりむしろ低下した。細胞外基質の分解を阻害する SLPI による治療は、ラット心筋炎の心体重比、心筋炎面積率を有意に改善させた。TLR4KO マウスの腹腔マクロファージはヘムによる IL-1 誘導がほとんどみられず、ヘムの刺激は TLR4 を介すると考えられた。また、ヘムだけでなく、ヘモグロビン、ミオグロビン自体でもマクロファージ細胞株は強力に IL-1 発現が誘導された。しかし、HEK 細胞を用いた炎症促進蛋白誘導経路の検討では、どの遺伝子導入 HEK 細胞でも IL-8 は強い誘導は示さず、その反応経路はスカベンジャー受容体など、他の分子が関わっている可能性が想定された。

他のモデル 2 : 野生型マウスにザイモザンを経鼻投与すると、投与後 6 日目まではほぼ同程度の軽度の肺炎しか観察されなかった。一方、MPO-KO マウスの炎症は、投与後 1 日目ですでに野生型マウスよりも進行し、6 日目には肺胞のほとんどすべての領域が炎症細胞で充満した重篤な炎症の発症が観察された。投与後 6 日目の MPO-KO マウス肺からは野性型マウス肺の 5 倍量の細胞が回収された。

その 8 割以上が好中球であった。以上より、MPO-KO マウスの方が野生型マウスより、ザイモザンで誘発される好中球性肺炎が早期に重篤になることが明らかとなった。MIP-2 は好中球の炎症患部への遊走を促進する。ザイモザン投与後 6 時間の肺組織中の MIP-2 量は、MPO-KO マウスの方が野生型マウスよりも 3 倍高値を示した。MIP-2 が真に MPO-KO マウスにおける好中球の浸潤に関わっているかを知るために、MIP-2 抗体を投与し中和した結果、好中球の集積が有意に減少したことから MIP-2 は炎症初期の好中球の集積に関与していることが明らかになった。MIP-2 の産生源を明らかにするために、ザイモザン投与後 6 時間後に肺胞洗浄によって肺胞に集積した細胞を回収し MIP-2 の細胞内染色を行った。その結果、肺胞マクロファージと好中球が MIP-2 を産生していることが判明した。さらに、野性型および MPO-KO マウスの大腿骨髄から単離した好中球に培養下でザイモザンを添加して 6 時間培養し、培地に分泌された MIP-2 量は、MPO-KO マウス好中球が野性型よりもおよそ 3 倍高値を示した。一方、単離した肺胞マクロファージにザイモザンを添加して 6 時間培養しても MIP-2 の産生が認められたが、野生型と MPO-KO との間に産生量の違いはなかった。培養前後の細胞のミトコンドリア呼吸量に相違は認められなかったことから、MIP-2 産生量の違いが細胞死によるのではないことが確認できた。さらに、MPO の組換え標品を培養液中に添加すると部分的ではあるが有意に MIP-2 の産生が抑制された。以上の結果から、好中球の MPO 欠損は、単に殺菌能の低下による炎症の誘発を導くだけでなく、菌体成分による炎症の誘発も助長することが示された。

病態関連の遺伝子解析 : 患者末梢血液細胞を用いてトランスクリプトーム解析を進めた。この 3 カ年は疾患および疾病に特化したインジェヌイティ社製のネットワークシステムを用いて再解析を行った。その結果、すべての血管炎において補体系因子の mRNA レベルが異常に増加していることが新たに判明した。補体系は 20 以上のタンパク質とタンパク質断片からなるが、血

管炎の病態依存的に mRNA 量が増加している補体系因子が異なるという興味深い事実も明らかとなった。たとえば Churg-Strauss 症候群では FCN1, MCP, C2a, C5AR が亢進し、MPA では FCN1, MCP, C5A が、高安病では FCN1, MCP のみが亢進した。高安病については患部を抗 FCN1 抗体で免疫染色し強いシグナルが得られることを確認した。一方、川崎病のモデルである CAWS によって DBA/2 系マウスに惹起された血管炎では FCN1 とともに大半の補体系副経路因子の mRNA レベルが異常に増加していた。それとは逆に下流の C7 の mRNA レベルが異常に減少しているという特徴も示した。血管炎とは離れるが、他の自己免疫疾患の例としてベーチェット病を解析したところ大半の患者で下流の C5, C7, C9 の mRNA レベルは増加していたが C6, C8 は減少していた。また IgA 腎症では C7 の mRNA レベルが増加していた。

2. 【臨床分科会】

IVIG 治療成績：症例は 34 歳男性。主訴は、呼吸器症状であり、呼吸器内科に入院した。好酸球増加 ($7400/\mu\text{l}$)、炎症反応上昇 (CRP 12mg/dl)、MPO-ANCA (916mg/dl) 上昇、CT で両肺野スリガラス影を認め CSS と診断された。同時期に腹痛もあり、血管炎による潰瘍を確認された。副腎皮質ステロイド (PSL : 20mg/日) 投与で呼吸器症状などは改善したが、紫斑、蛋白尿 (0.25g/日)、血尿 (多数/毎視野)、末梢神経伝導速度低下 (NCV : 39.4m/s , 基準値 $41.0\text{--}61.0\text{m/s}$) を伴う左上肢、両足底・足趾のしびれが出現し、精査目的で当科転科となった。腎障害精査も含め、腎臓内科に転科した。腎生検で糸球体に軽度のメサンギウム増殖を認めたが、半月体形成性腎炎の所見はなかった。尿細管間質に著明な好酸球の浸潤を認めた。腎障害は、尿蛋白はほぼ消失、血尿のみとなっていた。臨床経過は、PSL (40mg/日) 4 週間投与で腎炎は改善したが、多発性単神経炎が遷延し、免疫グロブリン大量静注療法 (IVIG : 20g/日 , 6 時間, 5 日間) を 2

クール施行した。喘息や好酸球増多、紫斑も、副腎皮質ステロイド治療にて軽快していたが、末梢神経障害も残っているため、1 クール目の IVIg 療法を施行した。神経学的症状、NCV (42.7m/s) が改善した。その後、再燃の兆候と思われる CRP の上昇、好酸球野増多が見られたが、副腎皮質ステロイドを増量することなく、2 クール目の IVIG 療法施行し改善した。

組織病変の解析：組織病変の解析法から得られた所見から、各カテゴリーを割り出した。各カテゴリーは Focal 18 例、crescentic, 6 例、mixed 14 例、sclerotic 14 例であった。予後の解析では、Focal, sclerotic group は報告と一致した傾向であったが、mixed が米国に比し良好であった。一方、cellular は症例数が比較的少なく、一定の結果が出ていない。

症例報告—1：症例は 60 代男性。間質性肺炎 (NSIP 疑い) へのプレドニン (PSL) 5mg による維持療法中、発熱、炎症反応上昇を呈した。感染症を疑い治療するも改善なく、精査加療目的に当院紹介。中等度血尿、蛋白尿を伴う sCr 上昇、および MPO-ANCA 陽性 (140EU) から、ANCA 関連腎炎による RPGN と判断。腎生検組織上は、糸球体に半月体形成を認めず、間質の繊維化と炎症細胞の浸潤、尿細管萎縮が主病変であった。血管炎所見は認めず、間質性腎炎と診断した。両症例ともにメチルプレドニゾロンパルス療法および PSL による後療法により腎機能改善をみた。

症例報告—2：44 歳時結膜炎、関節痛が出現。45 歳時血蛋白尿を指摘。その数ヶ月後に発熱、鼻出血、血痰、急速進行性糸球体腎炎 (以下 RPGN) を呈し当院に紹介入院となる。精査の結果、PR3-ANCA 陽性、腎生検で pauci-immune 型半月体形成性腎炎であり、ANCA 陽性 RPGN と診断した (鼻粘膜生検、腎生検ともに肉芽腫は検出されず)。ステロイドパルス療法 2 回で寛解導入した。48 歳時 ANCA 陽転化、経口エンドキサン、アザチオプリンを追加するも ANCA 陰転化せず、ミゾリビ

ンに変更し ANCA 陰転化を導く。50 歳時 ANCA 陽転化とともに関節痛出現、再燃と判定した。経口ステロイド増量、経口エンドキサンで寛解導入した。以降経口ステロイドを漸減し 52 歳時より経口ステロイド+ミゾリビンで寛解維持療法を行う。53 歳時 RPGN 進展したため経口ステロイドを一時増量した。54 歳時 ANCA 陽転化するもミゾリビン再開で陰転化した。56 歳時血清 CRP 陽性とともに多発肺結節が出現し（経気管支鏡的肺生検で初めて肉芽腫を確認した）、GPA (Wegener 肉芽腫症) と確定診断するとともに再燃と判定した。ステロイドパルス 1 回、エンドキサンプルス 6 回で寛解導入した。経口ステロイド漸減も 2011 年 1 月 ANCA 陽転化した。同年 3 月発熱、血清 CRP 上昇、RPGN は進展し、血液透析導入となった。現在、ANCA 陰転化せず、寛解維持目的に経口ステロイド、ミゾリビンの投与調整中である。

ANCA 関連血管炎の臨床像：平均年齢は 67.7 歳と高齢で、近年高齢化の傾向。男女比は 1:1.7 とやや女性に多く認められた。MPO-ANCA 単独陽性例が 91%と圧倒的に多く、MPO-AAV の診断では MPA が 87%と高率で、CSS が 8%、GPA が 3%で、MPO-ANCA 陽性の MPA が AAV の大多数を占めた。PR3-ANCA 単独陽性例を 8%認めたが、全例 GPA の診断であり、PR3-ANCA 陽性の MPA、CSS は認められなかった。これは欧米からの報告による疾患分類とは明らかに異なる分布であり、またこの傾向は RemIT-JAV の中間解析でも示されており、わが国の AAV の特徴と考えられる。【臨床症候】では、腎症候が 83%と最も高頻度で、腎症候が AAV 診断の契機となっている現状が推察されるが、腎症候を伴わない例が 17%みられることも留意すべきである。腎症候以外では、全身症状、胸部症候、神経症候が高頻度であった。腎症候では従来から RPGN が主症候と考えられているが、全例に腎生検は施行されておらず、偶発的な腎炎の合併や腎硬化症などの存在を完全には除外できないが、高齢者における新たな

検尿異常を認めた際には、AAV の可能性を考慮する必要があると思われる。【腎症合併例】では、非合併例に比べ BVAS が高値であった（表 1）。これは BVAS の評価項目として、腎症候が重視されているため当然の結果といえる。しかし、MPA の主要症候の一つである肺胞出血の合併頻度をみると、腎症合併例では非合併例に比べて有意に高率であり、より全身的な血管炎の活動性が高い傾向があると解釈できる。腎症合併例で MPO-ANCA の力価が有意に高値であった点も、より全身性の血管炎活動性が高い時期に腎炎の合併を来している結果と考えられる。【胸部症候】では肺胞出血を 21%に認めたが、間質性肺炎/肺線維症を合併する例が 41%と高率に認められ、神経障害の 80%は末梢神経障害があり、MPO-AAV では比較的高率に末梢神経障害の合併がみられることも明らかとなった。【予後】に関しては腎症非合併例では、腎症合併例と比べ、生命予後が良好であった。腎症合併例の中では RPGN を合併した例では特に予後が不良であった。MPO-AAV の治療の標的として腎症が重要であること、また RPGN の治療成績を向上させることが予後の改善に重要と考えられた。【年代別予後の比較】では、近年、生命予後の改善は明らかであった。これを RPGN 症例に関して解析してみると、生命予後の改善は、とりわけⅢ期で目覚ましかった。しかし、腎予後（透析導入率）でみるとⅡ期以降改善は乏しかった。【各病期での治療法の差異】Ⅰ期、Ⅱ期に比してⅢ期では経口ステロイド薬のみで治療された症例の割合が増加し、免疫抑制薬の併用例の割合は減少していた。死因に関しては、症例数が少ないがⅠ期、Ⅱ期に比べⅢ期には感染症の割合が 29%から 20%へ抑えられていた。これは、RPGN 診療指針に基づき、高齢者や腎機能障害の進行した症例において免疫抑制療法の強度が抑えられた結果、感染症死の抑制など生命予後の改善につながったと思われる。一方で、免疫抑制療法強度の抑制は、腎血管炎の抑制には不十分となっている可能性が考えられた。

表1. MPO-ANCA 関連血管炎の腎合併症の有無による臨床像の比較

	腎症合併例 (119 例)	腎症非合併例 (24 例)	
臨床所見			
年齢 (歳)	69.0 ± 11.1	65.0 ± 14.1	
男女比	44:75 (1:1.7)	9:15 (1:1.7)	
BVAS2003	21.2 ± 8.9	7.8 ± 7.7	<i>P</i> <0.0001
肺胞出血 (例)	30(25%)	1(4%)	<i>p</i> =0.003
再燃例 (例)	24(20%)	4(17%)	
検査所見			
Hb (g/dl)	9.2 ± 2.3	11.2 ± 1.9	<i>p</i> =0.0001
Cr (mg/dl)	4.1 ± 3.9	0.8 ± 0.3	<i>P</i> <0.0001
MPO-ANCA (EU)	438.4 ± 686.4	231.9 ± 226.5	<i>p</i> =0.009

疫学：宮崎地区で2005年から2009年の5年間でのAAV登録数は、MPA 69例 (80%)、GPA 8例 (9%)、CSS 9例 (10%) であり、pANCA/MPO陽性 72例(84%)、cANCA/PR3陽性 6例(7%)であった。一方、英国Norfolk地区ではMPA 15例 (30%)、GPA 33例 (66%)、CSS 2例 (4%) であり、pANCA/MPO陽性 15例(30%)、cANCA/PR3陽性 29例(58%)と、二国間に大きな差異を認めた。今回の調査対象地域で2005年から2009年の5年間でAAVを発症した患者は、宮崎86名とNorfolk 50名で、その発症頻度は、成人 (15歳以上) 人口100万人当り22.6 (95% C.I 19.1-26.2) 名と21.8 (95% C.I 12.6-30.9)と大差なかった。同様に成人100万人当たりの各疾患の発症頻度は宮崎とNorfolkで各々、MPA 18.2 (95% CI 14.3-22.0) vs. 6.5 (95%CI 1.9-11.2)、GPA 2.1 (95% CI 0.6-3.7) vs. 14.3 (95% CI 5.8-23.0)、CSS 2.4 (95% CI 0.3-4.4) vs. 0.9 (95% CI 0-1.9)と計算された。なお、65歳以上の高齢者では2~3倍高い頻度であった。AAVの臓器障害の比較結果を表3に示す。宮崎地区患者では、最も多いのは腎症で80%の症例で見られた。続いて肺病変で、37症例 (43%) に認

めた。一方、消化管出血例は少なかったが、MPAと考えられた症例にも難聴などのENT病変を伴う症例も散見された。一方、Norfolk地区患者では、腎、呼吸器、ENT病変のいずれもが60%以上の症例で見られていた。統計学的にはNorfolk地区と宮崎地区ではENTおよび呼吸器病変に有意さを認めた。臓器障害としての腎症は、MPAでは両国ともにほとんどの症例で見られていたが、宮崎地区ではGPA例では8例中の3例 (38%)、CSSでは9例中の1例 (11%) とともに合併率は低かった。なお、前回の後方視的研究 (2000年~2004年) では腎症合併例のみを宮崎では調査し、英国と比較していた。今回は腎症非合併例も含めた前方視的調査結果を比較した。両国間でAAV全体における腎症合併率に大差はないと考えられた。

急性期川崎病の IVIG 治療：Adipocytokineのうち、Resistin は急性期で増加し、熱性疾患よりも高値である。Resistin levelはKD群で、HC,FC群より有意に高値であった。一方、HMW adiponectinは熱性疾患でKDと手低下し、leptin, visfatinは有意な高値を示さなかった。この上昇したResistinは、IVIG後に有意に低下し、またIVIG無反応群で有意に高かった。そして、多変量モデルではCRP値と最も良い相関を示した。他の3つのAdipocytokineは有意な変化を示さなかった。

他の治療—EPA治療：症例1：80歳女性、重症大動脈狭窄症(AS)の経過観察中にANCA関連腎炎による急速進行性糸球体腎炎を合併した。ステロイドや免疫抑制薬の前にEPAとアスピリンの併用療法 (EPA1800mg/day, Aspirin 100mg/day)から開始しステロイドや免疫抑制薬を使用せずに寛解導入に成功した。症例2：75歳男性、持続する咳と発熱で間質性肺炎と血尿、急速進行性の腎機能障害を呈した症例。腎生検による病理所見は間質細胞浸潤を伴う半月体形成性糸球体腎炎。以上から間質性肺炎を認める顕微鏡的多発血管炎と診断。CRP陰転化後、経口PSL 25 mgで退院し漸減、経口PSL

5mg+EPA2700mg+Aspirin200mg/day により寛解を維持に成功した。症例 3. : 79 歳女性、持続する発熱、炎症反応高値、腎生検を施行した。糸球体に細胞性半月体、小葉間動脈の壊死性血管炎像を認め、PSL 30mg/日内服後mステロイドパルス療法後 PSL 30 mg 内服で寛解導入療法に成功し、PSL 5mg+EPA 1800mg+Aspirin 100mg で約 3 年間寛解維持されている。

関連疾患への IVIG 治療：多発性筋炎・皮膚筋炎 (PM/DM) はともに特発性炎症性筋炎 (idiopathic inflammatory myositis:IIM)の疾患範疇に属し、前者は皮膚病変がなく、筋線維に CD8+T 細胞が集積し、後者は皮膚病変があり、筋鞘の毛細血管に対して補体の活性化を認める。臨床症状は、ともに骨格筋の障害が主体で、体幹に近い上腕、大腿がより障害を受け易く、この部位の筋力低下を認める。座位から立位の動作の障害を認める。時に心筋の障害を認め、心筋に patchy な病変を認め、troponin T の上昇を認め、不整脈などを起こす。特に、DM では、間質性肺炎を合併し、間質性肺炎にて急激な不幸な転帰を伴うこともある。筋肉の障害、皮膚症状、間質性肺炎は早期に治療を行わなければ、非可逆的な障害になり、炎症が消退した後も、筋力低下が残存することもあり、日常生活に支障をきたす。治療は、ステロイド大量療法、免疫抑制剤 (MTX, cyclophosphamide, cyclosporine A、最近では、rituximab の有効性が報告されている。IVIG は、1993 年 Dalakas MC らによる double-blind, placebo-control trials によって、その有効性が証明された (N Engl J Med 1993;329:1993-2000)。平成 22 年 10 月に保険適用が承認された製剤は、献血ヴェノグロブリン IH 静注 (ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン) で、適用は、多発性筋炎・皮膚筋炎における筋力低下の改善 (ステロイド剤が効果不十分な場合に限る) であり、成人 1 日 400mg/kg を 5 日間点滴する。

D. 考案

1. 【基礎分科会】人工ガンマグロブリンの作製と評価

クローンの検証：構築した人工ガンマグロブリン VH-CH1-h フラグメントクローンを精査し、塩基配列とアミノ酸配列を確定し、26 個の新たな有効クローンを加え 204 クローンに増やすことができた。安全性の観点から、エンドトキシンの除去方法を検討し、タンパク 1mg あたり 21 エンドトキシンユニットまで混入量を低下させることができた。精製された人工ガンマグロブリン VH-CH1-h フラグメントはアルカリ処理には抵抗性を示し、24 時間処理によってもウエスタンブロットによる解析では分解物は認められなかった。効率の良い除去方法であり、エンドトキシンの混入を下げられたことから、人工ガンマグロブリンの製剤への可能性が得られた。

評価法：IFN- α 産生能および、IFN の主たる産生細胞である pDC 数が過半数の患者で大きく低下し、寛解後も長期にわたり続く場合が多かったことは、MPO-ANCA 腎炎患者の易感染性の一因に IFN システム不全との関連性が考えられた。また、IFN- α 産生能の低値群に特に血中に IFN- α/β が認められたことは、MPO-ANCA 腎炎患者では、IFN システムの調節不全の可能性も示唆された。この不全要因は、感染に関連した因子である LAMP-2、Calprotectin が、MPO-ANCA 腎炎患者で有意に高値であり、腎炎発症に先行して、感染があった可能性が示唆された。

モデル動物での評価：C5 は増悪因子であることが強く示唆されたことは、CAWS 血管炎で急性期に損傷した血管壁の修復に関与している可能性も考えられた。

2. 【臨床分科会】

IVIG 治療：血管炎によると思われる末梢神経障害は、1クール目の IVIg 療法で改善、再燃の兆候と考えられる好酸球の増多、CRP の上昇を副腎皮質ステロイドの投与量を増量することな

く、2クール目のIVIg療法の施行で改善した。今まで、川崎病以外の血管炎で、IVIg療法を保険適応で使用することはできなかったが、Churg-Strauss 症候群で保険適応になり、血管炎の病態での改善を見ることができるようになった。IVIg 両方は血管炎の治療の1つとして選択できる可能性が高い。血管炎の治療と同様に、IVIgは既存の治療に対して治療抵抗性の病態の症例に必要である。また、ステロイドの減量が必要な症例に有効であり、ステロイド量の減量(steroid sparing effect)が見込まれるなどの利点が考えられる。

腎病理解析：MPAが中心の我が国の症例における予後との関連性の評価で、focalは最も予後良好で、scleroticは当初から腎機能低下しており腎死も多いのは上記評価同様であったが、mixedに関してはより予後が良好であった。Cellular症例が少ないのは、発見がやや遅い可能性もある。さらにカテゴリーは糸球体のみの所見で分類することが特徴であるが、従来より尿細管間質病変の重症度が予後を左右することも言われていることであり、それらの結果に比し、このカテゴリー法がより有用であるかどうかは、今後の症例の蓄積を待つべきと考えられる。

ANCA 関連血管炎の臨床像：平均年齢は67.7歳と高齢で、近年高齢化の傾向。男女比は1:1.7とやや女性に多く認められた。MPO-ANCA単独陽性例が91%と圧倒的に多く、MPO-AAVの診断ではMPAが87%と高率で、CSSが8%、GPAが3%で、MPO-ANCA陽性のMPAがAAVの大多数を占めた。PR3-ANCA単独陽性例を8%認めたが、全例GPAの診断であり、PR3-ANCA陽性のMPA、CSSは認められなかった。これは欧米からの報告による疾患分類とは明らかに異なる分布であり、またこの傾向はRemIT-JAVの中間解析でも示されており、わが国のAAVの特徴と考えられる。**【臨床症候】**では、腎症候が83%と最も高頻度で、腎症候がAAV診断の契機となっている現状が推察されるが、腎症候を伴わない例が17%みられる

ことも留意すべきである。腎症候以外では、全身症状、胸部症候、神経症候が高頻度であった。腎症候では従来からRPGNが主症候と考えられているが、全例に腎生検は施行されておらず、偶発的な腎炎の合併や腎硬化症などの存在を完全には除外できないが、高齢者における新たな検尿異常を認めた際には、AAVの可能性を考慮する必要があると思われる。**【腎症合併例】**では、非合併例に比べBVASが高値であった。これはBVASの評価項目として、腎症候が重視されているため当然の結果といえる。しかし、MPAの主要症候の一つである肺胞出血の合併頻度をみると、腎症合併例では非合併例に比べて有意に高率であり、より全身的な血管炎の活動性が高い傾向があると解釈できる。腎症合併例でMPO-ANCAの力価が有意に高値であった点も、より全身性の血管炎活動性が高い時期に腎炎の合併を来している結果と考えられる。**【胸部症候】**では肺胞出血を21%に認めたが、間質性肺炎/肺線維症を合併する例が41%と高率に認められ、神経障害の80%は末梢神経障害があり、MPO-AAVでは比較的高率に末梢神経障害の合併がみられることも明らかとなった。**【予後】**に関しては腎症非合併例では、腎症合併例と比べ、生命予後が良好であった。腎症合併例の中ではRPGNを合併した例では特に予後が不良であった。MPO-AAVの治療の標的として腎症が重要であること、またRPGNの治療成績を向上させることが予後の改善に重要と考えられた。**【年代別予後の比較】**では、近年、生命予後の改善は明らかであった。これをRPGN症例に関して解析してみると、生命予後の改善は、とりわけⅢ期で目覚ましかった。しかし、腎予後(透析導入率)でみるとⅡ期以降改善は乏しかった。**【各病期での治療法の差異】**Ⅰ期、Ⅱ期に比してⅢ期では経口ステロイド薬のみで治療された症例の割合が増加し、免疫抑制薬の併用例の割合は減少していた。死因に関しては、症例数が少ないがⅠ期、Ⅱ期に比べⅢ期には感染症の割合が29%から20%へ抑えられていた。これは、RPGN診療指針に基づき、

高齢者や腎機能障害の進行した症例において免疫抑制療法の強度が抑えられた結果、感染症死の抑制など生命予後の改善につながったと思われる。一方で、免疫抑制療法強度の抑制は、腎血管炎の抑制には不十分となっている可能性が考えられた。

再燃: ANCA 関連血管炎の生命・腎予後改善のため、その再燃の抑制は重要課題である。解析した難治・頻回再燃性症例のように、適切に ANCA 関連血管炎の再燃を判断し、その有効性および安全性を考慮した上で、複数の免疫抑制薬の投与方法を工夫することが大切である。また、本邦の ANCA 関連血管炎症例に適した免疫抑制療法の投与方法の検討、特に高齢者主体の免疫疾患への投与方法の検討が必要であり、現在、厚生労働省進行性腎障害研究班 RPGN 分科会で RPGN の再燃抑制による腎予後の改善を目的とし、ANCA 関連血管炎寛解維持療法に対するミゾリビンの臨床試験 (MARPGN study) を実施している。わが国における RPGN の特徴に合わせた独自の有効かつ安全な寛解維持療法の開発は急務であり、MARPGN study の成果に基づき、高齢化社会を背景に近年増加傾向にある RPGN 症例の治療プロトコルが確立されれば、高い社会的貢献に値すると思われる。

まれな病態の解析: MPO-ANCA 関連腎炎患者の 1%程度で間質障害主体の病変を示すとされている。尿所見が軽度で、腎機能が急速に悪化する際には、稀有な病態を考慮する必要があると考えた。糸球体炎からの波及ではなく、一次性に PTC 炎をきたし得る機序としては、MPO の抗原エピトープや IgG のアフィニティの違いが考えられているが明らかとはなっていない。間質毛細血管炎から始まり、壊死性半月体形成性糸球体腎炎に発展する例がある。ANCA 陽性の間質性腎炎では、糸球体炎への移行を念頭に置く必要がある。

新たな治療の試み: ANCA 血管炎は抗好中球細胞質抗体が好中球を活性化することが病因の一つと考えられており、ANCA の抗体価は臨床的に病

勢と必ずしも比例しないものの ANCA 血管炎の大きな要因であるとされる。また T 細胞の持続的活性化が本疾患の重症度と比例し、ANCA を産生する自己免疫機序に T 細胞が深く関わっている可能性が報告されている。本研究により EPA 投与は従来から報告されてきた抗炎症作用のみならず、自己免疫制御作用により自己抗体である MPO-ANCA 産生を抑制し病勢を制御する可能性が示された。

疫学: 前回の 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。そのため、2005 年以降は腎病変の有無に関わらず、宮崎地区では新規発症症例の全例調査を、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、AAV 症例の全ての前方視的調査を実施した。GPA 症例に関しては、宮崎地区で腎症を呈する症例の比率が Norfolk 地区に比べて低いと考えられた (38% vs. 90%, $p < 0.001$)。

E. 結論

基礎分科会—グロブリンと評価法: 人工ガンマグロブリンを構成するクローンの塩基及びアミノ酸配列の精査によって最終的に 204 クローンの VH-CH1-h フラグメントを構成することができた。

組換えタンパク精製におけるエンドトキシン混入は製剤化における大きな問題である。今年度の検討で最終的に組換えタンパク 1mg あたり 21 エンドトキシンユニットまで下げることができたが、さらに除去処理を改良する必要がある。昨年度報告した ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj での治療実験結果が示すように、ここで構築されたクローンライブラリーは有効なものであり、さらにエンドトキシンの完全除去ができれば人工ガンマグロブリンとして製剤を現実のものとする事ができる。

臨床分科会: 血管炎における IVIg 療法は、短

期的には副作用の少ない、副腎皮質ステロイドの減量効果にも期待できる療法と考えられる。現在使用される免疫グロブリン製剤は、採血により、直接ヒト免疫グロブリン抽出しなければならないことから、未知のウイルスなどの混入、精製の煩雑さなどに問題があり、人工免疫グロブリンの製造開発が期待される。さらに、このようなIVIg療法の適切な投与の時期、有用な血管炎の病態や検査異常の改善に関しては今後の検討が必要である。

尚、本件と関連して、2012年3月28-31日、東京・品川にて「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した。また、VCRC 国際会議(2011,11.5, シカゴ)に、鈴木和男、小林茂人の2名が招聘され参加した。

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)

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

国際特許出願中：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 河内 正治 (独) 国立国際医療研究センター

協力研究者 小浦美奈子²、大島正道³、松田潤一郎²、鈴木和男⁴

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. 国立感染症研究所・免疫部 室長
4. 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学

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。昨年度、得られた票品を用い ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj に投与し、炎症抑制効果を確認したが、一方ではエンドトキシンの微量な混入を除去することができずに投与実験を行ったため、エンドトキシン混入の影響を否定できなかった。製剤として利用するためにはエンドトキシンの完全除去は必須であり。今年度は得られたクローンの配列解析を精査し組換えタンパクの内容を確定するとともに、製剤として実現するために、精製票品からのエンドトキシンの除去について検討を行った。

今年度の研究により、前臨床試験に向けた安全な大規模バッチの人工ガンマグロブリンの作成を可能とすることができた。

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 抗体を用いたウェ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。今年度は組み換えタンパクの内容を確定するため、配列解析データを精査してクローンの内容の確定を目指した。

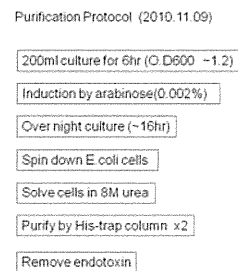
選択された有効クローンの混合バッチを作成し、大量培養を行って、精製 h ScFv の作成を行い、エンドトキシンが (XXX u/ml) 微量に検出されるものの、得られた票品を用いて ANCA 関連血管炎モデルマウス SCG/Kj に投与し治療実験を試みた。この研究班の分担研究者である宇野らにより、ヒト末梢血リンパ球におけるサイトカイン産生抑制実験も試みられ、ている。これらの投与実験において、微量ではあるがエンドトキシン混入の影響は否定できない。今年度は最終年度として安全な組換えタンパク精製票品を得る目的から、エンドトキシンの除去方法について検討を行った。

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 (前年度までの報告書参照)、健常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 により増幅した。大腸菌での発現ベクター 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、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の確認を行うことにより (特許申請のためクローン名は非表示)、クローンを確定した。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。今年度は得られているクローンの配列データを再度精査することにより、VH-CH1-hinge 組み換えタンパクの内容を確定した。

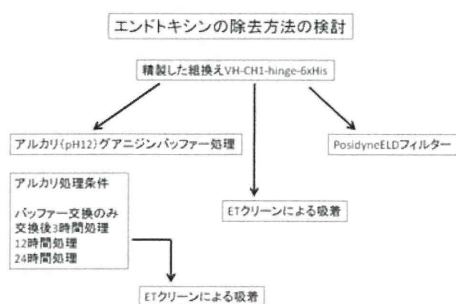
エンドトキシン除去の方法を検討するため、ガンマグロブリン VH-CH1-hinge のポリクローンミックスバッチの大量培養を行い、組み換えタンパク抽出精製を昨年度までと同様に図—1 に示す方法で行った。エンドトキシンの除去方法は



図—1 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図—2 に示すようにアルカリ変性法を処理条件を変えて行い、エンドトキシン吸着除去剤 ET クリーンによる吸着法による除去、エンドトキシン除去用フ

フィルターPosidyneELD フィルターによるキャプチャー法の 3 種類の方法を検討した。また効果が比較的高いアルカリ変性法とエンドクリーンによる吸着除去法の組み合わせによる除去を試みた。



図—2 エンドトキシン除去プロトコール

C. 研究結果

昨年度報告した人工ガンマグロブリン VH-CH1-hinge 組み換え体発現可能クローン 178 クローンをさらに精査し、塩基配列と、アミノ酸配列を確定するとともに、1000 クローンの配列データから発現の可能性のあるクローンを再解析したところ、178 クローンに加えて 26 クローンが使用可能であることが確認された。これを加えて最終的な有効クローン数は 204 クローンに増やすことができた。

エンドトキシン除去は

得られた 204 クロー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、タンパク精製を行い、エンドトキシン除去試験用の票品を作成した。エンドトキシン除去処理は 6 M グアニジン溶液を 20mM 水酸化ナトリウムで pH12 に調整したバッファーに、組換えタンパク溶液を置換し、置換

後の処理時間による効果を検討した。エンドトキシン吸着除去剤 ET クリーンによる吸着法は製品操作書に従って除去の処理を行った。エンドトキシン除去用フィルター PosidyneELD フィルターによる除去は組換えタンパク溶液をフィルターに通過させて除去処理を行った。効果が比較的高いアルカリ変性法とエンドクリーンによる吸着除去法の組み合わせは、アルカリグアニジン処理を 24 時間行った後、バッファー交換し ET クリーンによる吸着処理を行った。それぞれの条件による除去の結果を図—3 に示す。

エンドトキシンの除去処理の結果

エンドトキシン除去処理方法	処理後エンドトキシン量 (組換えタンパク1mgあたり)
未処理	2,900,000U/mg
PosidyneELDフィルター	1,410,000U/mg
アルカリグアニジン 交換のみ	836,000U/mg
アルカリグアニジン 3時間処理	6,410U/mg
アルカリグアニジン 12時間処理	1,260U/mg
アルカリグアニジン 24時間処理	781U/mg
ETクリーン吸着	267U/mg
ETクリーン吸着+ アルカリグアニジン24時間	21U/mg

図—3 エンドトキシン除去処理の結果

精製された VH-CH1-hinge 組換えタンパクは 6M グアニジンにより精製したものであってもタンパク 1mg あたり 3,000,000 ユニットの高い濃度のエンドトキシンを含んでいる。PosidyneELD フィルターによる処理では半量の 1,410,000 ユニットまでした下げることができなかった。アルカリグアニジン溶液によるアルカリ加水分解処理では、バッファー交換作業のみで約 3 分の 1 に低下し、処理時間を 3 時間、12 時間、24 時間と長くすることにより最終的には 700 ユニット程度まで低下させることができた