

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 (バッファー ; 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。

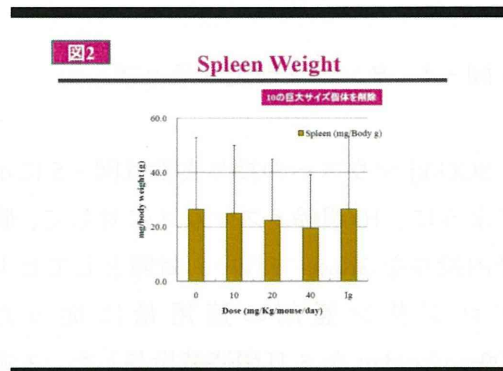


図-7 脾臓重量変化

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。

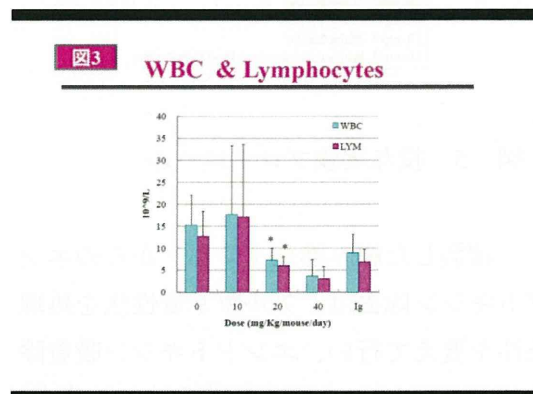


図-8 白血球およびリンパ球

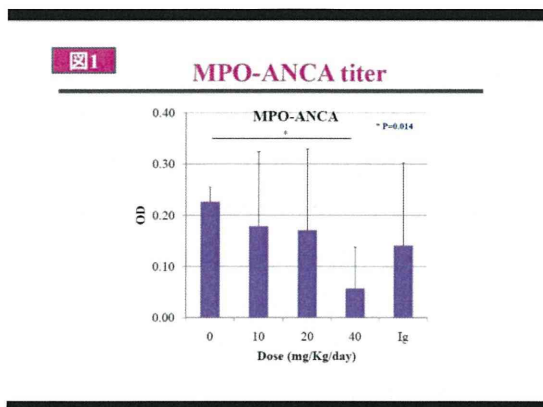


図-9 MPO-ANCA 抗体価の変化

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。

エンドキシンの除去処理の結果

エンドキシン除去処理方法	処理後エンドキシン量 (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	835,000U/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	1,280U/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が、これ以上の処理時間によっても 500 ユニット程度にとどまる結果であった。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が、完全除去には至らなかった。

#### D. 考案

本研究で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。

ET クリーンによるエンドトキシン吸着処理ではタンパクの吸着も避けられず、処理後のタンパク量の減少等の問題があるが、効率の良い除去方法なので、他の方法との組み合わせを変えるなどの改良でさらにエンドトキシンの混入を下げることも考えられる。

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、エンドトキシンを検出限界以下まで除去した人工ガンマグロブリンを作出できる可能性を示した。このことにより人工ガンマグロブリンの製剤への可能性を示すことができた。

## 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。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ができる。

## 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.

Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tanuma R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I. Large-scale analysis of *Macaca fascicularis* transcripts and inference of genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. *BMC Genomics.* 2008 Feb 24;9:90.

### 2. 学会発表

1. 東濃 篤徳, 坂手 龍一, 高橋 一朗, 足立 淳, 朝長 毅, 保富 康宏, 亀岡 洋祐、カニクイザル白血球における細胞外カルレティキュリンによる遺伝子発現の変化、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 横浜

2. 竹内 昌男, 東濃 篤徳, 竹内 喜久子, 牧野 初音, 田沼 玲子, 足立 淳, 高橋 一朗, 朝長 毅, 梅澤 明弘, 亀岡 洋祐、ヒト間葉系幹細胞株 (UE6E7T-3) の形質転換過程における mRNA 発現解析、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 横浜
3. 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-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
4. 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
5. 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
6. 長田直樹、亀岡洋祐、平田誠、田沼玲子、鈴木穰、菅野純夫、高橋一朗 カニクイザル骨髄、脾臓、膵臓由来 cDNA ライブラリーの解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 神戸
7. 亀岡洋祐、古谷昌弘、大島正道、平田誠、田沼玲子、長田直樹、高橋一朗、鈴木和男 人工ガンマグロブリンの多様性の検討、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 神戸
8. 亀岡洋祐、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男 MPO リーダーペプチドは活性制御に関与するかⅡ MPO 研究会 2008 年 10 月 東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
特記事項なし

## 人工ガンマグロブリン開発のための *in vitro* 評価法の確立と *in vivo* 評価のための血管炎モデルマウスの開発

研究分担者 大野 尚仁 東京薬科大学 教授

**研究要旨：**臨床において有用性の高い免疫グロブリン製剤（IVIg）は、その需要や安全性を確保するためにも人工化が望まれている。人工ガンマグロブリンの開発と臨床応用には、*in vitro* での評価法の確立と作用機序の解明や動物モデルでの解析が必要である。そこで本研究では、まず①IVIgを用いて *in vitro* での評価法の確立を目指し、固相化IVIgによるヒト末梢血単核球（Peripheral Blood Mononuclear Cell：PBMC）のサイトカイン産生への影響を検討した。また、②IVIgの完全分子型、不完全分子型の活性の比較、③各種PAMPs（pathogen-associated microbial patterns）刺激によるPBMCからのサイトカイン誘導に対するIVIgの作用について検討した。一方、血管炎モデルマウスの開発に関して、CAWS血管炎の発症メカニズムを解析するため、④GM-CSF遺伝子導入を施したマウス、または⑤補体C5欠損マウス（A/J, AKR/N）を用いて、CAWS血管炎感受性を比較検討した。その結果、固相化法を用いることにより、IVIgの活性を*in vitro*で評価することができることが明らかとなった。また、GM-CSFは今回の投与プロトコールでは、CAWS血管炎の発症に影響を与えなかった。一方で、補体C5欠損マウスは、いずれも重症な血管炎を発症したが、その重症度は異なることから、C5欠損はCAWS血管炎を悪化させる因子の一つであるが、その発症にはその他複数の因子が関与していることが示唆された。

### A. 研究目的

免疫グロブリン製剤（IVIg）による治療は、無・低ガンマグロブリン血症、重症感染症、発性血小板減少性紫斑病、ギランバレー症候群、川崎病の急性期疾患に使用されており、なくてはならない製剤である。その需要や安全性を確保するためにも人工化が望まれている。人工ガンマグロブリンの開発と臨床応用には、*in vitro* での評価法の確立と作用機序の解明、動物モデルでの薬効評価が必要であるが、IVIgの作用機序もまだ不明な点が多い。そこで本研究では、

IVIgを用いて *in vitro* 評価法の確立を目指し、ヒトPBMCに与える影響と、PAMPs刺激ヒトPBMCに対するサイトカイン産生の抑制効果を検討した。さらにIVIgの治療モデルとしてのCAWS血管炎の発症メカニズムについてGM-CSF、補体C5という2つの観点から検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 免疫グロブリン製剤の固相化

IVIgを希釈し、プレート（96well Multi Well Plate 96FII）に各125 $\mu$ l添加後、1晩

4°Cで incubate した。注射用水 200  $\mu$ l を用いて 6 回洗い流した後、プレートに吸着されているものを固相化 IVIg とした。

## 2. ヒト PBMC の培養

$1 \times 10^6$  cells / ml に調整した ヒト PBMC を、固相化 IVIg に添加，または PBMC を入れた well に IVIg, F(ab')<sub>2</sub> を添加し，37°C 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 8h-72h 培養後，上清を回収した。PAMPs を用いる系では 30 分 preincubate した PBMC に PAMPs を添加し，さらに 8h 培養した後，上清を回収した。

3. 遺伝子導入には GM-CSF cDNA を組み込んだ pCAGGS-GM-CSF を用いた。これらの遺伝子を Hydrodynamic 法によりマウスに投与し，血中 GM-CSF 濃度が高値となったマウスに CAWS を投与した。

4. 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。

上記の実験は，本学ヒト並びに動物実験規定に則り行った。

## C. 研究結果

(1) ヒト PBMC in vitro 培養系での固相化 IVIg によるサイトカイン産生誘導

固相化 IVIg と IVIg の液相添加での PBMC からのサイトカイン誘導能を比較した。その結果，IVIg の液相での添加と比較して固相化 IVIg は PBMC からの IL-8 産生を著しく増加させた。TNF- $\alpha$  は，PBMC への IVIg 液相添加では誘導されなかったが，固相化 IVIg では強く誘導された (Fig. 1)。

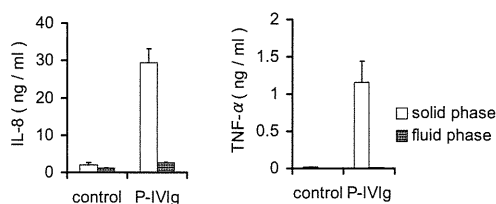


Fig. 1 Production of IL-8 and TNF- $\alpha$  from PBMC cultured with solid phase IVIg or fluid phase IVIg

(2) 固相化 IVIg のサイトカイン誘導活性における Fc 領域の関与

固相化 IVIg のサイトカイン誘導活性に IgG の Fc が関与しているかを検討するために，F(ab')<sub>2</sub> を IVIg と同様に 96well プレートに吸着させ，各 well に PBMC を添加後 8h 培養し，回収した上清中の IL-8 と TNF- $\alpha$  の濃度を測定した。

その結果，固相化 IVIg が IL-8 と TNF- $\alpha$  の産生を誘導するのに対し，固相化 F(ab')<sub>2</sub> はどちらの産生も誘導しなかった (Fig. 2)。

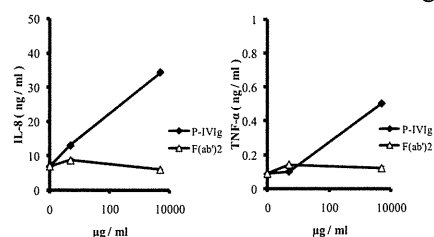


Fig. 2 Production of IL-8 and TNF- $\alpha$  from PBMC cultured with solid phase IVIg or F(ab')<sub>2</sub>

(3) PAMPs 誘導サイトカイン産生への IVIg の影響

TLR リガンド関連の各種 PAMPs (LPS, Pam3, Poly I:C) 用いて，PAMPs 誘導サイトカイン産生に対する IVIg の影響を検討した。PBMC に，IVIg, F(ab')<sub>2</sub> を添加し，30min 培養後，各 PAMPs で刺激し，8h 後に上清を回収し ELISA 法にて IL-8 の濃度を測定した。その結果，全ての PAMPs による IL-8 の産生誘導に対して IVIg は有意な影響

を与えなかった。2000  $\mu$ g/ml の F(ab')<sub>2</sub> を添加すると Pam3, Poly I:C 誘導 IL-8 産生を有意に抑制したが, LPS 誘導の IL-8 産生は抑制しなかった。(Fig. 3).

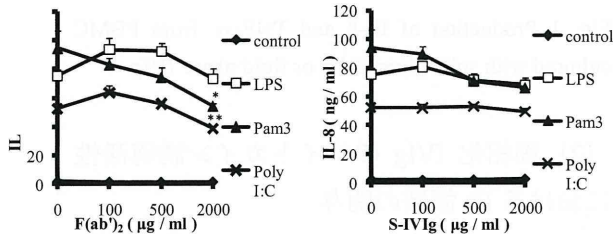


Fig. 3 Production of L-8 from PBMC cultured with IVIg and variety of PAMPs

#### (4)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。C57BL/6 マウスに pCAGGS-GM-CSF を Hydrodynamic 法により投与し, 1 週間後から CAWS を 5 日間連続腹腔内投与した。最終投与日より 28 日後に屠殺,組織切片を作成し血管炎を観察した。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. 4A, B).

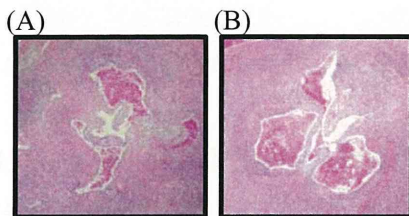


Fig. 4. Histological analysis of CAWS-induced vasculitis in C57BL/6 mice administered pCAGGS-GM-CSF

Ringer solution (A) or pCAGGS-GM-CSF (B) was administrated 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.

#### (5) C5 欠損マウスにおける CAWS 血管炎

これまでの研究により DBA/2 は重症の血管炎が誘発されることが明らかとなっている。そこでその他の C5 欠損マウス (A/J, AKR) に CAWS 血管炎を誘発し, 大動脈起始部周辺の臓器切片を作成し, HE または EVG 染色して, DBA/2 の CAWS 血管炎と比較した (Fig. 5)。その結果, いずれの系統のマウスも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。

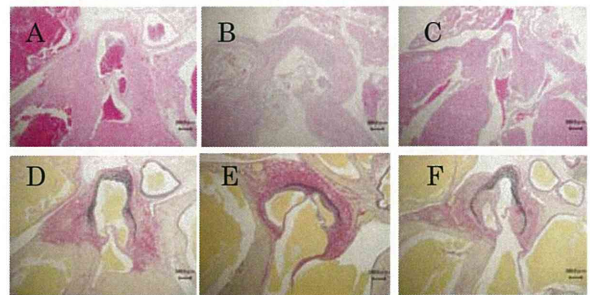


Fig.5 Histological observation of coronary arteritis.

CAWS (4 mg/mouse) was administered i.p. to A/J (A, D), AKR (B, E), and DBA/2 (C, F) mice for five consecutive days. After 4 weeks, mice were sacrificed and prepared section using Hmatoxylin-Esin (A-C) or with Elastica-van-Gieson (E-F) stain.

#### (6) 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)の致死性 CAWS 血管炎の発症について DBA/2 と比較した。

投与量が 4mg x5 回するとき, A/J では投与終了後 28 日目から死亡する個体が現れ始

め 80 日目で全ての個体が死亡した。AKR で 50%のマウスが生存していた。これらのことから A/J および AKR は DBA/2 と同様、CAWS 投与により致死的な血管炎を発症することが明らかになった (Fig6)。また 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、その一因として C5 が関与している可能性が示唆された。

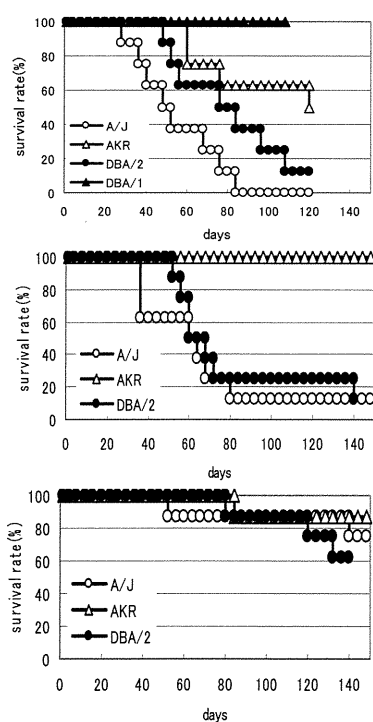


Fig.6 Survival ratio of CAWS administrated A/J, AKR, DBA/2 mice

Each 4 mg (A), 1 mg (B), or 0.25mg (C) of CAWS was intraperitoneally administrated to mice for five consecutive days. The last day of five consecutive days is defined day 0, and survival ratio was observed.

#### D. 考案

免疫グロブリン製剤 (IVIg) は感染症の予防や治療, IgG の置換療法その他, 様々な自己免疫疾患に使用されている。

IVIg 中の IgG 凝集体が ITP の改善や IFN-

γ 応答を抑制するという報告から, IgG 凝集体モデルの固相化免疫グロブリン製剤 (固相化 IVIg) を作成し, PBMC のサイトカイン産生に与える影響を解析した。

その結果, 固相化 IVIg はヒト PBMC からの IL-8 と TNF-α 産生を強く誘導した。一方, F(ab')<sub>2</sub> を固相化した場合には IL-8 と TNF-α 産生は誘導されなかった。これらの結果より, 固相化 IVIg はヒト PBMC からのサイトカイン産生を誘導する活性があり, その活性は IgG の Fc 部分に依存している可能性が示唆された。

IVIg が各種 PAMPs (LPS, Pam3, Poly I:C) 誘導のサイトカイン産生に与える影響について解析した結果, IVIg と F(ab')<sub>2</sub> は各 PAMPs の種類に依らず IL-8 と TNF-α 産生 (data not shown) を抑制した。IVIg と F(ab')<sub>2</sub> のサイトカイン抑制作用は同程度であったことから, その抑制作用は受容体や病原体の種類に依存しない可能性が示唆された。また, 自己免疫疾患には使用されていない F(ab')<sub>2</sub> も IVIg 同等の活性がある可能性が示唆された。

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-α の炎症性サイトカイン産生が亢進していた (data not shown)。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, 著しい差は認められなかった。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。

さらに, C5 欠損マウスを用いて CAWS 血管炎発症への C5 の影響について検討し



た. C5 欠損マウスではアナフィラトキシン C5a が産生されない. C5a は強力な炎症メディエータであり, 白血球の遊走活性も示すので, 血管炎は減弱傾向を示すと予測されたが, いずれの C5 欠損マウスでも血管炎は増悪傾向を示した. これらのことから, 本モデルにおいて C5 欠損は増悪因子であることが更に強く示唆された.

#### E. 結論

本研究により, IVIg の *in vitro* での活性を測定する方法を開発することができた. これらの活性は SyIg の活性を既存の生物製剤の活性と比較検討するための重要な評価法の一つであると考えられる.

また本研究により, DBA/2 に加え, A/J および AKR も CAWS 血管炎を発症して死亡することが明らかとなった.

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. 川崎病患児には IVIg 治療が施され効果が認められている. SyIg の効果を評価するためにも CAWS 血管炎の病態や, その発症メカニズムを詳細に解析することは大切であり, さらに, 川崎病の発症メカニズムや治療を考える上でも大変重要であると考えている. 今後も研究を継続したいと考えている.

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. N. N-Miura, M. Komai, Y. Adachi, N. Osada, Y. Kameoka, K. Suzuki, **N. Ohno**, 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*. 2009 Sep 1;183(5):3417-24.

2. K. Inoue, H. Takano, E Koike, R. Yanagisawa, T. Oda, H. Tamura, Y. Adachi, K. Ishibashi, **N. Ohno**, *Candida* soluble cell wall beta-glucan facilitates ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice: Possible role of antigen-presenting cells, *Respir Res*. 2009 Jul 21;10:68.
3. T. H-Hida, H. Kawaminami, K. Ishibashi, N. N-Miura, Y. Adachi, T. Yadomae, **N. Ohno**, Effect of GM-CSF on cytokine induction by soluble beta-glucan SCG *in vitro* in beta-glucan-treated mice, *Microbiol Immunol*. 2009 Jul;53(7):391-402.
4. A. Miyazato, K. Nakamura, N. Yamamoto, H. M. Mora-Montes, M. Tanaka, Y. Abe, D. Tanno, K. Inden, X. Gang, K. Ishii, K. Takeda, S. Akira, S. Saijo, Y. Iwakura, Y. Adachi, **N. Ohno**, K. Mitsutake, N. A. Gow, M. Kaku, K. Kawakami, Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by Deoxynucleic acids from *Candida albicans*, *Infect Immun*. 2009 Jul;77(7):3056-64.
5. T. H-Hida, K. Ishibashi, N. N-Miura, Y. Adachi, Y. Shirasu, **N. Ohno**, Cytokine induction by a linear 1,3-glucan, curdlan-oligo, in mouse leukocytes *in vitro*, *Inflamm Res*. 2009 Jan;58(1):9-14.
6. R. Tada, Y. Adachi, K. Ishibashi, **N. Ohno**, An unambiguous structural elucidation of a 1,3-beta-D-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments, *Carbohydr Res*. 2009 Feb 17;344(3):400-4.
7. **N. Ohno**, N. N-Miura, K. Ishibashi, T. H-Hida, Y. Adachi, N. 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
8. K. Takahashi, T. Oharaseki, Y. Yokouchi, N. N. Miura, **N. Ohno**, A. I. Okawara, H. Murata, S. Naoe, K. 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)
9. R. Tada, Y. Takano, H. Murakami, K. Ishibashi, N. Nagi-Miura, Y. Adachi, **N. Ohno**. Vasculitis and anaphylactoid shock in mice induced by the polysaccharide fraction secreted into culture supernatants by the fungus *Candida metapsilosis*. *Microbiol Immunol*, 55, 357-365(2011).
  10. K. Takahashi, T. Oharaseki, T. Nagao, Y. Yokouchi, H. Yamada, N. Nagi-Miura, **N. Ohno**, T. Saji, T. Okazaki and K. Suzuki. Mizoribine provides effective treatment of sequential histological change of arteritis and reduction of inflammatory cytokines and chemokines in an animal model of Kawasaki disease. *Pediatric Rheumatology*, online J. 9(1), 30(2011).
2. 学会発表
- 国際会議
1. N. N. Miura, M. Komai, Y. Adachi, Y. Kameoka, K. Suzuki, N. Ohno. Interleukin-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05/25-29, Tokyo, Japan
  2. Y. Takano, M. Arai, N. N. Miura, Y. Adachi, K. Suzuki, N. Ohno. Studies on immunotoxicity of water soluble polysaccharide complex fraction from culture supernatant of *Candida* spp., The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05/25-29, Tokyo, Japan
  3. Y. Takano, M. Kouchi, N. N. Miura, Y. Adachi, H. Hanzawa, Y. Aizawa, K. Suzuki, N. Ohno. Interleukin-10 gene transfer inhibits the induction of CAWS vasculitis in mouse, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05/25-29, Tokyo, Japan
  4. N. Hirata, K. Ishibashi, S. Hata, T. Usui, J. Yoshioka, Y. Adachi, N. N., Miura, K. Suzuki, S. Ohta, K. Nakazawa, N. Ohno. The model of aortitis-induced heart failure in DBA/2 mice developed by fugal PAMPs, CAWS, water-soluble polymer complex obtained from *Candida albicans*, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05/25-29, Tokyo, Japan
  5. A. Yamamoto, Y. Miura, N. N. Miura, K. Ishibashi, Y. Adachi, T. Nagao, K. Suzuki, N. Ohno. Analysis of cytokine production from PBMC by stimulation with solid phased intravenous immune globulin, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology: ISHAM2009, 2009/05/25-29, Tokyo, Japan
  6. N. Ohno, N. N. Miura, K. Ishibashi, Y. Adachi, N. Hirata. A Murine Model of Coronary Arteritis Induced by Fungal PAMPs, CAWS, for Drug Development, EDDP2010 Int. Conference on Early Disease Detection and Prevention, 2010/02/25-28, Munich, Germany
  7. N. N. Miura, Y. Adachi, K. Ishibashi, H. Hanawa, Y. Aizawa, K. Suzuki, and N. 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
  8. T. Oharaseki, Y. Yokouchi, K. Sadamoto, N. Ohno, T. Saji, K. Suzuki, K. Takahashi. Anti-TNF- $\alpha$  therapy for murine systemic vasculitis induced by *Candida albicans* water-soluble fraction: an animal model of KD. 15th International Vasculitis & ANCA Workshop 2011/5/15 North Carolina, USA
  9. N. Nagi-Miura, H. Murakami, H. Hanawa, Y. Aizawa, Y. Adachi, K. Suzuki, N. Ohno. Involvement of GM-CSF in acute lethal shock induced by *Candida albicans* water-soluble fraction (CAWS) in mice. IUMS (International Union of

- Microbiological Societies) 2011 2011/9/6 Sapporo, Tokyo
10. N. Nagi-Miura, Y. Takano, Y. Adachi, K. Ishibashi, H. Hanawa, Y. Aizawa, K. Suzuki, N. Ohno. Interleukin-10 inhibit CAWS-vasculitis induced by extracellular mannoprotein- $\beta$ -glucan complex of *Candida albicans*. The 10th International Kawasaki Disease Symposium 2012/2/7 Kyoto, Japan
  11. N. Nagi-Miura, Y. Takano, R. Okuda, Y. Arai, Y. Ishimoto, S. Iiyama, H. Uchida, Y. Adachi, K. Ishibashi, H. Hanawa, Y. Aizawa, K. Suzuki, N. Ohno. The effect of Interleukin-10 to CAWS-vasculitis induced by extracellular mannoprotein- $\beta$ -glucan complex of *Candida albicans*. Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012 2012/3/28 Tokyo, Japan
- 大野尚仁 *Candida albicans* 由来の菌体外多糖画分 CAWS 投与によるマウス血管炎モデルの早期炎症応答における系統差 第 23 回 微生物シンポジウム 2011 年 9 月 2 日 千葉
7. 奥田遼, 三浦典子, 大野尚仁 CAWS 応答性における IL-6 の関与の解析 第 55 回 日本薬学会関東支部大会 2011 年 10 月 8 日 東京
  8. 三浦典子, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁 補体 C5 欠損マウスを用いた CAWS 血管炎の検討 第 55 回日本医真菌学会学術集会 2011 年 10 月 21-22 日 東京
  9. 三浦典子, 伊坂春香, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁 補体 C5 欠損マウスを用いた CAWS 血管炎発症の比較 第 17 回 MPO 研究会 2011 年 10 月 28-29 日 熊本

#### 国内会議

1. 三浦典子, 高野雄介, 安達禎之, 塙晴雄, 相澤義房, 鈴木和男, 大野尚仁 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サイトカイン学会・学術集会 2009 年 6 月 24-25 日 京都
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 反応性 第 15 回 MPO 研究会 2009 年 11 月 7-8 日 栃木
3. 三浦典子, 高野雄介, 安達禎之, 大野尚仁 CAWS 血管炎マウスへの IL-10 遺伝子導入の影響 日本薬学会 130 年会 2010 年 3 月 28-30 日 岡山
4. 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
5. 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
6. 大村 崇, 三浦典子, 石橋健一, 安達禎之,

#### 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

## 人工 $\gamma$ グロブリンの評価法測定系の確立

研究分担者 宇野賀津子（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・免疫発生理学・炎症制御学

研究要旨：人工化した免疫グロブリンの開発にあたり、作成された人工 $\gamma$ グロブリンの *in vitro* 評価法は、より有効な製品の開発に必須である。その際、出来るだけ少ない採血量で患者検体を用いての効果の検証が出来ることが望ましく、このことは生物学的機序の解明にも必須である。そこで患者および健常人の全血を用い、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確立した。そしてモノバレント 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、Th2 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。この測定系はわずかな血液でも評価可能なことから、今後開発される人工 $\gamma$ グロブリンの評価に有用であると推察された。

### A. 研究目的

$\gamma$ グロブリン製剤は川崎病、MPO-ANCA 腎炎や感染症などの治療に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る。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。

また、*in vitro* 評価系では、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、の評価も必須である。その場合、出来るだけ少量の血液でできる評価系が望

ましい。そこで、全血を用いて、*in vitro* で出来る評価系の開発を試みた。

### B. 研究方法

#### B-1 個々人のサイトカイン産生能の測定

健常人および患者から静脈血をヘパリン採血し、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。そこに 25  $\mu$ g/ml の PHA を添加し、40 時間後に産生されたサイトカインを 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。20 時間後、40 時間後にそれぞれサイトカインを測定した。TNF- $\alpha$ 、IL-10 は 1 日目が最大、2 日、3 日と徐々に低下した。一方、IL-4I, L-5, IL-13 は 1 日目から 3

日目にかけて、右肩上がりに上昇した。サイトカイン産生の高低の個人傾向は、1日目でも2日目でも同様であった。IL-2, IL-12p70, GM-CSF は両日であり差はなかった。産生されたサイトカイン間で相関性をとってみると、IL-4/IL-5/IL-13 産生の間には0.9以上の強い相関性が認められ、TNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ の間にも0.83と強い相関性が認められたことから、この測定系は個人の免疫バランスを把握するのに、有用と考えられた。

### B-2 $\gamma$ グロブリン製剤評価のための実験系

健康人および患者から採取した全血に、25  $\mu$ g/mlのPHAを添加し、96穴皿に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、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

### C-1 健康人およびMPO-ANCA腎炎患者のサイトカイン産生能

全血をPHA刺激したときに産生されるサイトカイン量をbio-plexにより測定しそれぞれの平均値をもとめた。Th1/Th2バランスを表現するために、各サイトカインの平均値をもとめた。個々人の値から、平均値を引いた値をプロットし、そのパターンを

もとに分類した。結果の全容を図1に示す。

図1 健康人サイトカイン産生能

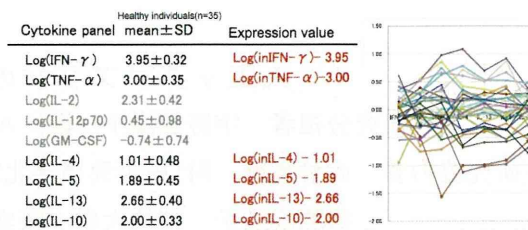
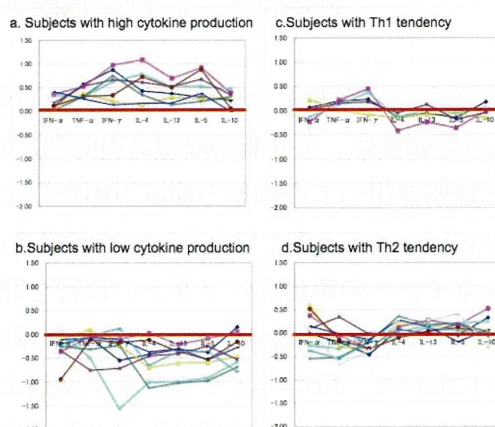


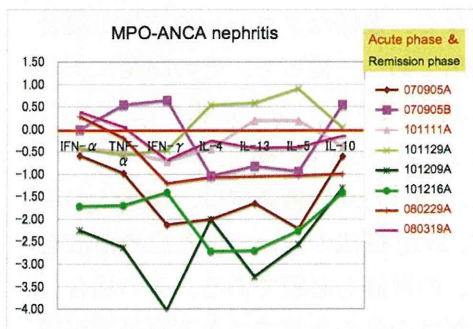
図2 健康人サイトカイン産生能のパターン



更に図2に示すように、a、全体的にサイトカイン産生の高い高サイトカイン産生群、b、低サイトカイン産生群、c、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 産生が高く、IL-4、IL-5、IL-13が低いTh1タイプ、d、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 産生が低く、IL-4、IL-5、IL-13が高いTh2タイプに分けることができた。

また、MPO-ANCA腎炎患者のサイトカイン産生能は図2に示すように、低産生能群、Th1優位群、Th2優位群が認められた。

図3 MPO-ANCA腎炎患者のサイトカイン産生



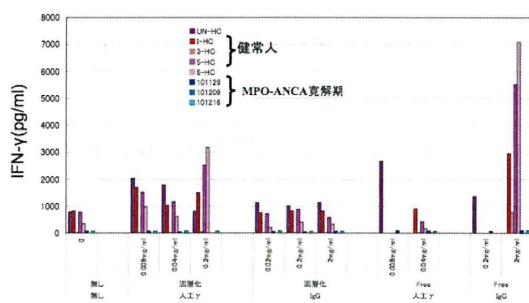
## C-2 in vitro サイトカイン産生能への γグロブリン製剤の影響

### C-2-a. Th1 サイトカイン 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、モノバレント hScFv、γ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。

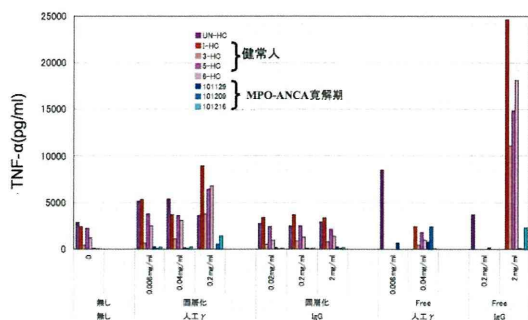
IFN-γ の産生に対しては、モノバレント hScFv においては図 4 に示すように固相化条件では亢進、浮遊添加条件では、高濃度では抑制が認められ、また個人差が認められた。またγグロブリン製剤では、浮遊添加条件で特に亢進するケースが認められた。より高濃度で、抑制されるかどうかの、検証が必要であろう。

図 4, γグロブリン製剤の IFN-γ 産生への影響



同様に Th1 サイトカインである TNF-α の産生に対しては、モノバレント hScFv においては固相化条件、浮遊添加条件共に亢進が認められた。

図 5, γグロブリン製剤の TNF-α 産生への影響



また 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γグ

ロブリンで抑制が認められたものの、健康人症例では、むしろ亢進していた。

### C-2-b. Th2 サイトカイン産生への影響

Th2 サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 の産生に対しては、図 6-8 に示すように、モノバレント hScFv、γグロブリン製剤共に、固相化条件、浮遊添加条件共に、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γ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 6, γグロブリン製剤の IL-4 産生への影響

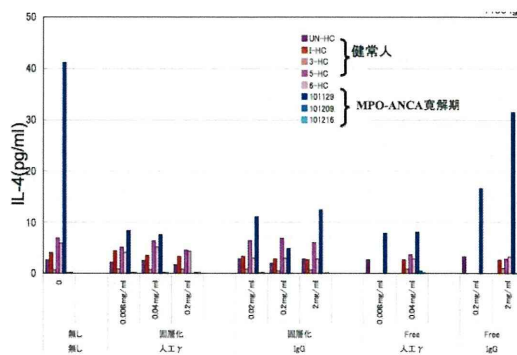


図 7, γグロブリン製剤の IL-5 産生への影響

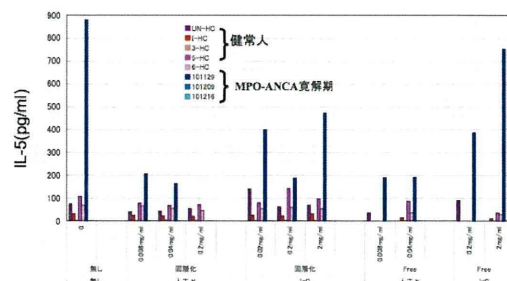
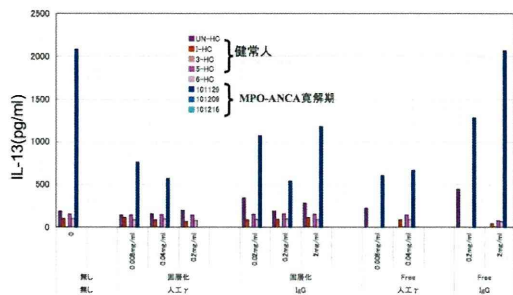


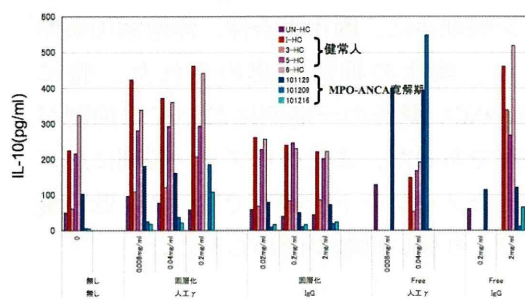
図 8, γグロブリン製剤の IL-13 産生への影響



### C-2-c. 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、どちらかというといずれの条件でも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9,  $\gamma$  グロブリン製剤の IL-10 産生への影響



### D. 考案

ヒトの免疫機能は、色々な観点から評価可能である。末梢血全血を希釈後、PHA で刺激したときに産生される IFN- $\gamma$  を始めとして、Th1/Th2 サイトカイン産生能を測定することにより、個々のヒトを Th1 傾向、Th2 傾向に分けることができた。また明らかに高サイトカイン産生の人が存在し、これまでに紹介してきた IFN 産生能とは異なる個人の免疫特性を明らかに出来ることが明らかにされた。

また、 $\gamma$  グロブリン製剤や人工 $\gamma$  グロブリン製剤の in vitro 添加実験により、産生されるサイトカインが抑制されたり、亢進する結果が得られた。特に Th2 サイトカインの産生は、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 はより低い濃度で効果をしました。Th1 サイトカインに関しては、一定した結果は得られずさらなる検討が必要である。免疫抑制性のサイトカインである IL-10 に関してはむしろ、人工 $\gamma$  グロブリンで亢進傾向が認められた。更なる検討は必要であるが、過剰な免疫反応を抑えるという観点から興味深い。

### E. 結論

少量の血液で判定可能な、サイトカイン産生系を開発した。この結果からサイトカイン産生のパターンには個人に特有なパターンがあることが明らかにされた。また、この系を用いて、人工 $\gamma$  グロブリンの評価が、可能であることが明らかにされた。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表研究発表

#### 1. 論文発表

##### 1. Uno K, Okuno K, Hamuro J

Intracellular glutathione in monocytes are useful biomarker of immune status of tumor bearing patients *The European Journal of Clinical & Medical Oncology*, (2012) in press

2. Asahina A, Uno K, Fujita H Sequential occurrence of pemphigus vulgaris and palmoplantar pustulosis: Possible role of cytokine profile. *Acta Derm Venereol.* (2012) 92: 89-90

3. Y.Yasuda, T.Shimoda, K.Uno, N.Tateishi, S.Furuya, Y.Tsuchihashi, Y.Kawai, S.Naruse, S.Fujita Temporal and sequential changes of glial cells and cytokine expression during neuronal degeneration after transient global ischemia in rats (2011) *Journal of Neuroinflammation* 8,70

4. ISHIKAWA T, KOKURA S, SAKAMOTO N, MATSUMOTO T, FUNAKI J, ADACHI S, OKAYAMA T, UCHIYAMA K, HANDA O, TAKAGI T, YAGI N, ANDO T, UNO K, NAITO Y and YOSHIKAWA Y Adoptive cellular therapy enhances the helper T cell response and reduces the number of

- regulatory T cells (2011)EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE 2: 737-743,
5. Kamide Y, Utsugi M, Dobashi K, Ono A, Ishizuka T, Hisada T, Koga Y, Uno K, Hamuro J, Mori M Intracellular glutathione redox status in human dendritic cells regulates IL-27 production and T cell polarization. (2011) Allergy. Sep;66(9):1183-92
6. Kazuko Uno, Eri Mso, Toshiko Ito-Ihara, Kazuko Suzuki Impairment of IFN- $\alpha$  production, peripheral plasmacytoid dendritic cell number and susceptibility to MPO-ANCA-associated glomerulonephritis and vasculitis. (2011) Cytokine, 56
7. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, Murakami Y Dysregulation of IFN System Can Lead to Poor Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C. (2011) PLoS ONE May Volume 6,
8. 宇野賀津子、八木克巳、谷川真理、吉川敏一、藤田哲也 健康人における IFN- $\alpha$  産生能と加齢の影響 Pasken J (2011) vol. 21/22, 1-4
9. 村田圭一郎、宇野賀津子 インターフェロン- $\gamma$  産生能測定のための ELISA 法、BioPlex 法によるインターフェロン- $\gamma$  量測定の比較検討 Pasken J (2011) vol. 21/22, 10-12
10. 宇野賀津子 あなたと隣の HIV ウォームアップクイズ:「ほんとうに知っている? HIV のこと」と「やってみようどこでも使える実践ワーク」によるエイズ予防教育の試み Pasken J (2011) vol. 21/22, 42-48
11. 宇野賀津子 「今、再び」インフルエ  
ンザにインターフェロン: The preventive effect of human interferon-alpha on influenza infection; Modification of clinical manifestations of influenza in children in a closed community.1982 の再検討 Pasken J (2011) vol. 21/22, 5-9
12. 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
13. 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 Vol.60,No.3 343-350
14. 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.
15. 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.
16. 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
17. 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
18. Uno K, Okuno K, Yagi K, Hamuro J Prediction of overall survival through pre-operative blood plasma of colorectal cancer patients. 2009, Cytokine, 48 p.52
19. K. Uno, E Muso, T. Ito-Ihara, K. Yagi, S. Fujita, and K. Suzuki. Comparison of plasma cytokine/chemokine levels and IFN-alpha



production capacity amongst healthy subjects, MPO-ANCA-positive MPA patients, IgA nephritis. APMIS 2009 June;117:136

20. T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Kobayashi, K.Uno, N. Tamura, Y.Yamanishi, A.Fukatsu, R. A. Watts, D.G.I. Scott, D.R.W. Jayne, K.Suzuki, and H.Hashimoto. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe. APMIS 2009 June;117: 173

21. 宇野賀津子 サイトカインハンテイング: 先頭を駆け抜けた日本人研究者達 2009 細胞工学 11 月号 Vol. 28, No. 11, 1113-1115

## 2. 学会発表

### 国際会議

1. Eri Muso, Kazuko Uno, Toshiko Ihara, Kazuo Suzuki Effect of IVIg monotherapy on “cytokine and chemokine storm” in acute phase of MPO-ANCA positive microscopic polyangiitis(MPA) 15th International Vasculitis & ANCA Workshop. May 15-18, 2011, in Chapel Hill, North Carolina

2. K Uno 第 76 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、第 19 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム (大阪) 2011.5.25-27

3. Kazuko Uno, Eri Mso, Toshiko Ito-Ihara, Kazuko Suzuki Impairment of IFN- $\alpha$  production, peripheral plasmacytoid dendritic cell number and susceptibility to MPO-ANCA-associated glomerulonephritis and vasculitis. 9<sup>th</sup> Joint Conference of the International Cytokine Society and the International Society for Interferon and Cytokine Research (フィレンツェ) 2011.10. 9-11

4. Uno K, Yagi K, Tanigawa M, Murata K, Fujita S, Yoshikawa T AGEING EFFECTS ON HUMAN TYPE I IFN SYSTEM IN HEALTHY SUBJECTS, Chicago 2010.10.2-2010.10.9

5. 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 14th International Congress of Immunology, Kobe Japan 2010.8.22-27

6. 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, 2010.10.26; Gifu.

7. 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 .4.19; Washington, DC, USA.

8. 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. Lund, Sweden. June 2009 [Poster No.T1].

9. 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. June 2009 [Poster No.K5]:.

10. Uno, K, Okuno K, Yagi K, Hamuro J Prediction of overall survival through pre-operative blood plasma of colorectal cancer patients. Lisbon, Portugal 2009, 10. 18-21

#### 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〔仙台〕 2011.1.28-29
2. 宇野賀津子、八木克巳、谷川真理、吉川敏一、藤田哲也 ヒトインターフェロンシステムと加齢—24年間のデータベースの混合モデルによる縦断的解析—第11回日本抗加齢医学会総会（京都）、2011.5.27-28
3. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、鈴木和男 MPO-ANCA 関連血管炎患者の IFN システム不全と感染抵抗性 第17回 MPO 研究会（熊本）2011.10.28-29
4. Uno K, Tanigawa M Aging effects on human type I IFN system: linear mixed model analysis of 24 year longitudinal study 第40回日本免疫学会学術集会（千葉）2011.11.27-29
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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.
11. 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
12. 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
13. 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 血清菌周病抗体価と 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 武曾恵理、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、平成 21 年 6 月 3 日、横浜。
21. 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 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 26, 27 日京都
22. 宇野賀津子 モノサイトのレドックス制御と抗腫瘍免疫応答 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 26, 27 日京都
23. 宇野賀津子、武曾恵理、猪原登志子、鈴木和男 MPO-ANCA 腎炎、IgA 腎症患者、健常人の血漿中多項目サイトカイン・ケモカイン動態の比較 第 9 回抗加齢医学会総会 2009 年 5 月 28 日、29 日 東京
24. Uno K, Okuno K Prediction of anti-tumor immunity and life prognosis through pre-operative blood plasma of colorectal cancer patients 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 日 横浜
25. 宇野賀津子、奥野清隆 モノサイトのレドックス制御と抗腫瘍免疫応答：末梢血

で解る予後予測パラメーター バイオセラ  
パイ学会 2009年11月26、27日 大阪

26. Uno K, Muso E, Ito-Ihara T, Suzuki K

Comparison of IFN- $\alpha$  systems amongst  
healthy subjects, MPO-ANCA nephritis  
patients, and IgA nephritis patients 第15回

MPO研究会 2009年11月28日 栃木

27. K Uno, K Okuno, J Hamuro Prediction  
of overall survival through pre-operative blood  
plasma cytokine/chemokine/MMPs of  
colorectal cancer patients 第39回日本免疫学  
会学術集会 2009年12月2-4日 大阪

#### 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