

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
難治性血管炎に関する調査研究班分担研究平成 25 年度終了報告書

ANCA 関連血管炎の臨床調査個人票の改訂計画

研究分担者 高崎芳成 順天堂大学医学部 膠原病内科	教授
山田秀裕 聖マリアンヌ医科大学 リウマチ・膠原病・アレルギー内科	教授
藤井隆夫 京都大学医学部附属病院 免疫・膠原病内科	准教授
研究協力者 李 鍾碩 順天堂大学医学部 膠原病内科	助手

研究要旨

顕微鏡的多発血管炎および多発血管炎性肉芽腫症の臨床調査個人票は、記載項目が多様で、各項目の配置様式から、診断基準に対する準拠が解りにくかった。また、新規と更新の書類が同一で、治療の変遷の把握が困難であった。そこで、我々は、より使い易い臨床調査個人票の改訂の改訂を目的に、全体の構成ならびに、臨床・検査所見、重症度、治療内容、合併症などの各項目を見直した新規調査票の原案を平成 23 年度に作成し、この試案について調査研究班員内での第一次アンケート調査を実施した。その結果に基づき改訂を加えた後、さらに平成 24 年度に改訂調査票に対する意見を第二次アンケートで求め、今後用いるべき調査票の最終案がまとめられた。しかし、この段階で平成 25 年度に日本リウマチ学会を經由して、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）今後の難病対策のあり方に関する研究班により新たに策定された個人調査票の提示があり、この妥当性に関する意見を求められた。これに対し、我々の策定した調査票自体を参考として提出したのに加え、これまでに集積した班員の意見に基づき改訂を要する部分について意見を上申した。

A. 研究目的

従来の顕微鏡的多発血管炎(MPA)および多発血管炎性肉芽腫症(GPA、旧ウェゲナー肉芽腫症)の臨床調査個人票は、調査項目が多岐に渡り、その構成も臓器別の配列となっている。また、「新規」と「更新」の調査項目もほぼ同様の構成となっている。その結果、記入が煩雑であり、また診断基準

に対する準拠・治療の変遷の把握が困難であるなど様々な問題があり、以前より改訂の必要性が指摘されてきた。

これらの問題点を勘案し、両疾患の臨床個人調査票の各項目の必要性和妥当性、さらに全体の構成について検討を加え、より有用で使いやすい調査票の作成を目指してきた。今回は、この調査票と、厚生労働科

学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）今後の難病対策のあり方に関する研究班により新たに策定された個人調査票を比較検討した。

## B.研究方法

研究分担者である山田秀裕教授、藤井隆夫准教授、研究協力者である李 鍾碩助手とともに、MPA および GPA の臨床調査票の全体の構成ならびに、臨床・検査所見、重症度、治療内容、合併症などの各項目の必要性・配列について検討を行い、その結果に基づき第一次アンケートを作成、「難治性血管炎に関する調査研究班」研究協力者を対象にアンケート調査を実施した。67施設にアンケートを送付し記入を依頼、そのアンケート結果に基づき、臨床調査個人票の改訂案を作成し班会議内で発表した。さらに、この調査票に対する意見を第二次アンケートで募集し、修正を加え今後用いるべき調査票の案がまとめられた。

本年度は厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）今後の難病対策のあり方に関する研究班により新たに策定された個人調査票と当研究班で策定した新規臨床個人調査票と比較しながら我々の策定した臨床個人調査票の妥当性について検討を加えた。

## C.研究結果

本年度は、表 1 および 2 に示す顕微鏡的多発血管炎(MPA)ならびに多発血管炎性肉芽腫症(GPA、旧ウェゲナー肉芽腫症)の調査

票(一部のみ示す)の最終確定をおこなう上での検証を予定していた。しかし、同年 8 月、日本リウマチ学会を經由して、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）今後の難病対策のあり方に関する研究班により新たに策定された個人調査票の提示があり、この妥当性に関する意見を求められた(表 3,4)。この書式は平成 26 年度 4 月より実施される新たな Web を用いた申請システムを実施するために、既存の申請書に基づき策定され、ほぼ同様の項目に加え、疫学調査に必要な項目が付加されたものとなっている。また、「新規」および「更新」の書式も現在と同様に同じ書式となっている。表 3,4 に示すごとく今後の難病対策のあり方に関する研究班による調査票では調査項目もデータの実数を記載する部分も多く、煩雑な手続きが求められている。また、臓器別に配列された臨床所見は分類基準もしくは判定基準の合致度を確認しにくい構造となっている。また、「新規」および「更新」の書類が同形式となっているため治療の変遷を確認できない。

このような問題点を鑑み、今回は厚生労働省に対し、我々の策定した調査票自体を参考として提出したのに加え、これまでに集積した班員の意見に基づき改訂を要する部分について意見を上申した。

## D. 考察

特定疾患治療研究事業における臨床調査個人票は、難治度、重症度が高い希少疾患に

対して、原因の究明・治療方法確立のための調査研究が目的である一方、医療費の助成を受けるための公的書類でもある。従来の調査票は前者の目的で、各臓器別に詳細な項目の記載を求めている傾向が顕著で、分類基準もしくは難病認定基準への合致を確認するには必ずしも合目的では無かった。今回の改訂では、厚生労働省の診断分類基準に準拠した項目を中心に構成し、かつ各項目すべてに自由記載欄を設けることにより、調査研究を目的としたデータ収集ツールとしての質を損ねることなく、調査項目数の簡素化による臨床現場の負担軽減と、申請認定における利便性の向上に寄与することができたと考える。

しかし、平成26年度の厚生労働省より提示された臨床調査個人票の妥当性の評価に当たり、今回提出した当研究班の新規調査票案に対し、厚生労働省より、1)認定基準に直接関与する病理所見の提出の必要性が明記されていない、2)これまで取り上げられていた确实、疑い、全身型、限局型を、認定するのかわからないかが明記されていない、3)【重症度分類】と【日常生活の程度】記載欄を削除しているが問題は無いかな等の指摘を受けた。确实および疑い例などの認定基準は各自治体で異なる判定を行っていると思われるが、その他についての見解を明らかにする必要がある。

今後、現状では提示された厚生労働省の新基準をもって認定が行われる可能性が高いが、今後、これまで班内で検討した個人調査票に近い様式なるように要望していくこ

とが求められていると考える。

#### E. 結論

血管炎班会議内でのアンケート結果に基づき、今後用いるべき臨床調査個人票の案がまとめられた。疫学的情報収集ツールとしての質を損ねることなく、臨床現場の負担軽減、申請認定における利便性の向上のいずれにも寄与することができた有意義な改訂であったと考えるが、今後さらに検討すべき課題も残されている。また、この考えを厚生労働省から提示された新臨床個人調査票に出来るだけ反映させることも求められている。

表1 MPAの臨床調査個人票改定案

11-2 顕微鏡的多発血管炎 臨床調査個人票 (1.新規)	
氏名	性別 1.男 2.女 生年月日 1.明治 2.大正 3.昭和 4.平成 年 月 日生 (満歳)
住所	郵便番号 出生地 現病時在住 都道府県
発病年月	1.昭和 2.平成 年 月 (満歳) 初診年月日 1.昭和 2.平成 年 月 日 採尿種類 1.尿 2.尿 3.尿
身体障害者手帳	1.あり(等級) 2.なし 介護認定 1.要介護(要介護度) 2.要支援 3.なし
生活状況	社会活動 (1.就労 2.就学 3.家事労働 4.在宅療養 5.入院 6.入所 7.その他) 日常生活 (1.正常 2.やや不自由であるが自力で可能 3.制限があり部分介助 4.全介助)
家族歴	1.あり 2.なし 3.不明 発症状況 1.主に入院 2.入院と通院併行 3.主に通院( /月) 4.その他(説明)
既往と経過 (具体的に記述)	【印刷入力不要】
I. 主要症状	①急速進行性糸球体腎炎(RPGN) 0.なし 1.あり 9.不明 RPGN以外の腎病変 ②肺病変 ③関節性肺炎 ④肺出血 0.なし 1.あり 9.不明 ⑤その他
II. 主要組織所見	⑥腎-肺以外の臓器病変 0.なし 1.あり 9.不明 ⑦皮膚(口瘡 ⑧皮下出血 ⑨その他) ⑩消化管(⑪消化管出血 ⑫その他) ⑬多発性単神経炎(⑭感覚障害 ⑮運動障害) ⑯その他
III. 主要検査所見	⑰MPO-ANCAの上昇(測定値 基準値) 0.なし 1.あり 9.不明 ⑱CRPの上昇(測定値 mg/dL) 0.なし 1.あり 9.不明 ⑲病的蛋白尿の持続 0.なし 1.あり 9.不明 尿量自覚性: □(±) □(+) □(2+) □(3+) ⑳血尿(尿赤血球数 /HPF) 0.なし 1.あり 9.不明 異常円柱の有無 ㉑赤血球円柱 □白血球円柱 □顆粒円柱 ㉒血清アラニンの上昇(測定値 mg/dL) 0.なし 1.あり 9.不明 ㉓胸部画像所見(⑴胸部単純レントゲン □胸部CT) 0.なし 1.あり 9.不明 ⑵関節性肺炎 ⑶浸潤陰影(肺出血) ⑷その他
IV. その他の検査所見	白血球数 /μL 好球球 % PR3-ANCA 陽性(測定値 基準値) 抗GBM抗体陽性(測定値 基準値)

表2 GPAの臨床調査個人票改定案

25 多発血管炎性肉芽腫症(ウェグナー肉芽腫症) 臨床調査個人票 (1.新規)	
氏名	性別 1.男 2.女 生年月日 1.明治 2.大正 3.昭和 4.平成 年 月 日生 (満歳)
住所	郵便番号 出生地 現病時在住 都道府県
発病年月	1.昭和 2.平成 年 月 (満歳) 初診年月日 1.昭和 2.平成 年 月 日 採尿種類 1.尿 2.尿 3.尿
身体障害者手帳	1.あり(等級) 2.なし 介護認定 1.要介護(要介護度) 2.要支援 3.なし
生活状況	社会活動 (1.就労 2.就学 3.家事労働 4.在宅療養 5.入院 6.入所 7.その他) 日常生活 (1.正常 2.やや不自由であるが自力で可能 3.制限があり部分介助 4.全介助)
家族歴	1.あり 2.なし 3.不明 発症状況 1.主に入院 2.入院と通院併行 3.主に通院( /月) 4.その他(説明)
既往と経過 (具体的に記述)	【印刷入力不要】
I. 主要症状	(1)上気道炎の症状 0.なし 1.あり 9.不明 鼻(①鼻性鼻膜炎 □出血 □膿状) 眼(②結膜 □眼力低下 □眼瞼突出) 耳(③中耳炎) □咽-咽頭炎 □嚥下 □嗝 □気道閉塞 ④その他 ⑤鮮血の症状 ⑥血尿 □咳 □呼吸困難 □動脈出血 □関節性肺炎 ⑦結節性肺炎(⑧単発性 □多発性 □肉芽腫) ⑨その他 ⑩腎臓の症状 ⑪血尿 □蛋白尿 □尿沈渣異常 □急速に進行する腎不全 ⑫浮腫 □高血圧 □その他 (⑬血管炎による症状) ⑭全身症状 □発熱(38℃以上、2週間以上) □体重減少(6ヵ月以内に10%以上) ⑮臓器症状 □潰瘍 □多関節炎(痛) □上肢痺 □多発性神経炎 □感覚障害 □運動障害 □虚血性心疾患(⑯狭心症 □心筋梗塞) □消化管出血(□吐血 □下血) □膀胱炎 □その他
II. 主要組織所見	生検の有無 ※ (生検組織名 検査年月) 0.なし 1.あり 9.不明 ※生検が有る場合、検査報告のコピーを添付すること ⑰H、Kの巨細胞を伴う壊死性肉芽腫性肺炎 ⑱免疫グロブリン沈着を伴わない壊死性半月体形成性腎炎の存在 ⑲小・中動脈の壊死性肉芽腫性血管炎 ⑳その他
III. 主要検査所見	PR3-ANCA 陽性(測定値 基準値) 0.なし 1.あり 9.不明 MPO-ANCA (測定値 基準値) 抗GBM抗体(測定値 基準値) 白血球数(測定値 /μL) CRP(測定値 mg/dL) 血清アラニン(測定値 mg/dL)

表3 今後の難病対策のあり方に関する研究班により新たに策定された個人調査票(GPA)

GPA 臨床調査個人票 (1.新規)	
氏名	性別 1.男 2.女 生年月日 1.明治 2.大正 3.昭和 4.平成 年 月 日生 (満歳)
住所	郵便番号 出生地 現病時在住 都道府県
発病年月	1.昭和 2.平成 年 月 (満歳) 初診年月日 1.昭和 2.平成 年 月 日 採尿種類 1.尿 2.尿 3.尿
身体障害者手帳	1.あり(等級) 2.なし 介護認定 1.要介護(要介護度) 2.要支援 3.なし
生活状況	社会活動 (1.就労 2.就学 3.家事労働 4.在宅療養 5.入院 6.入所 7.その他) 日常生活 (1.正常 2.やや不自由であるが自力で可能 3.制限があり部分介助 4.全介助)
家族歴	1.あり 2.なし 3.不明 発症状況 1.主に入院 2.入院と通院併行 3.主に通院( /月) 4.その他(説明)
既往と経過 (具体的に記述)	【印刷入力不要】
I. 主要症状	①急速進行性糸球体腎炎(RPGN) 0.なし 1.あり 9.不明 RPGN以外の腎病変 ②肺病変 ③関節性肺炎 ④肺出血 0.なし 1.あり 9.不明 ⑤その他
II. 主要組織所見	⑥腎-肺以外の臓器病変 0.なし 1.あり 9.不明 ⑦皮膚(口瘡 ⑧皮下出血 ⑨その他) ⑩消化管(⑪消化管出血 ⑫その他) ⑬多発性単神経炎(⑭感覚障害 ⑮運動障害) ⑯その他
III. 主要検査所見	⑰MPO-ANCAの上昇(測定値 基準値) 0.なし 1.あり 9.不明 ⑱CRPの上昇(測定値 mg/dL) 0.なし 1.あり 9.不明 ⑲病的蛋白尿の持続 0.なし 1.あり 9.不明 尿量自覚性: □(±) □(+) □(2+) □(3+) ⑳血尿(尿赤血球数 /HPF) 0.なし 1.あり 9.不明 異常円柱の有無 ㉑赤血球円柱 □白血球円柱 □顆粒円柱 ㉒血清アラニンの上昇(測定値 mg/dL) 0.なし 1.あり 9.不明 ㉓胸部画像所見(⑴胸部単純レントゲン □胸部CT) 0.なし 1.あり 9.不明 ⑵関節性肺炎 ⑶浸潤陰影(肺出血) ⑷その他
IV. その他の検査所見	白血球数 /μL 好球球 % PR3-ANCA 陽性(測定値 基準値) 抗GBM抗体陽性(測定値 基準値)



# 【国際研究協力分科会】

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
分担 平成 25 年度終了報告書

血管炎の国際共同臨床試験  
(DCVAS, PEXIVAS, RITAZAREM, GPA 日英比較試験)

藤元昭一 宮崎大学医学部 血液・血管先端医療学講座 教授

**研究要旨：**国際研究協力分科会が中心となり、以下の4つの国際共同試験プロジェクトを進めている。DCVAS（欧州リウマチ学会/米国リウマチ学会主導による原発性全身性血管炎の分類・診断基準作成のための研究）では国際的な症例登録が継続されており、わが国からも23施設が参画して追加の症例を登録中である。PEXIVAS（ANCA 血管炎に対する免疫抑制療法への血漿交換療法追加による生命予後と腎予後の改善の有無を評価する無作為比較試験）にはわが国からも4施設が被験者募集可能状態になり、現在までに3症例が登録されている。RITAZAREM（再発性 ANCA 関連血管炎の寛解維持療法におけるリツキシマブとアザチオプリンを比較する国際ランダム化比較試験）には我が国から7施設が参加することが決まり、来年度には被験者募集可能状態になる予定である。GPA（多発血管炎性肉芽腫症）日英比較研究は、我が国から16施設が参加して疾患重症度や予後などを比較する後ろ向き観察研究である。現在は症例データを収集中であるが、来年度には解析を行う予定である。

研究分担者： 小林茂人 順天堂越谷病院内科教授、濱野慶朋 東京都健康長寿医療センター腎臓内科部長、平橋淳一 東京大学医学部腎臓内分泌内科助教、猪原登志子 京都大学医学部臨床研究総合センター助教

研究協力者： 高橋啓東 邦大学大橋医療センター病理、原淵保明 旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学、中島裕史 千葉大院医遺伝子制御学、武曾恵理 田府興風会医学研究所附属北野病院腎臓内科、湯村和子 国際医療福祉大学病院、伊藤千春 自治医科大学腎臓内科、岩本逸夫 国保旭中央病院アレルギー・リウマチセンター、内田俊也 帝京大学医学部内科、古田俊介 千葉大院医遺伝子制御学

#### A. 研究目的

血管炎に関する日本と海外の研究の状況・成果をお互いに共有しつつ、国際共同研究に参加し、日本と欧米の血管炎の異同を知ることによって、血管炎の原因、疫学、臨床症状、新しい治療法などに関して内外の理解を深めることが目的である。

#### B. 研究方法

1) DCVAS; 国際会議へ出席し、討議に参加する。日本での検討事項は当研究班に報告し、論議事項は当研究班にて決定される。申請書類の作成、臨床記録票の作成、登録症例の暗号化、国際事務局への症例登録は当分科会が行う。倫



理的妥当性は代表者が所属する各施設の倫理委員会に諮る。

2) ①PEXIVAS・②RITAZAREM; 諸外国で開始された国際共同臨床試験へ日本が参画するにあたり、共通の臨床試験プロトコルを基本的に変更することなく施行できるように日本国内での体制を整える。同時に、試験中央組織である欧州血管炎グループ (EUVAS)、米国血管炎臨床研究コンソーシアム (VCRC) および中央試験事務局との契約を締結するための条件を明らかにし、解決する。本研究は、介入を伴うランダム化比較臨床試験として UMIN-CTR に登録し、倫理的妥当性は代表者が所属する各施設の倫理委員会に諮る。

3) GPA 日英比較研究; 日本の参加施設募集を研究班全体に諮り、運営委員会を設けて症例収集に向けて検討する。申請書類および臨床記録票の作成は英国側と共同して行い、登録症例の暗号化、症例登録は当分科会が行う。倫理的妥当性は代表者が所属する各施設の倫理委員会に諮る。

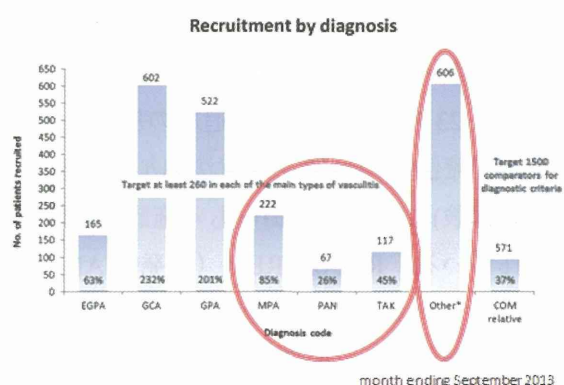
### C. 研究結果

1) DCVAS; 当初 (2011 年度)、日本の 15 施設が参加し、登録が行われた (研究統括者当研究班 榎野班長)。しかし、目標症例数に達していないことより、EUVAS および VCRC から日本からの再度登録を促す依頼があった。前回は DCVAS 登録規定が曖昧であったが、現時点では改善された。2012 年度に日本からも再登録を行うことが本研究班で承認され、今回は 23 施設が参加することとなった。代表者が所属する各施設の倫理委員会で承認された後は、日本事務局 (国際研究協力分科会長 藤元昭一) に症例データを送って頂き、事務局において Web 登録する事で、研究は進行中である。

本年 9 月末の時点で世界 109 施設より 2,872

例の症例登録がなされている (DCVAS Web 上での日本からの登録確認例数は 15 施設からの 112 例)。目標は全体で 3500 例であるが、疾患によって、また、対照疾患 (コントロール) 症例の登録が少ない状況である。そのため、症例登録期間の延長が 2015 年 12 月までとなり、特に、日本から顕微鏡的多発血管炎、高安動脈炎、対照疾患症例などを登録することが必要であると考えられる。

#### 登録症例の疾患別内訳 (2013 年 9 月現在)



赤枠は登録症例数が目標に達せず、日本からの追加登録を依頼されている疾患群

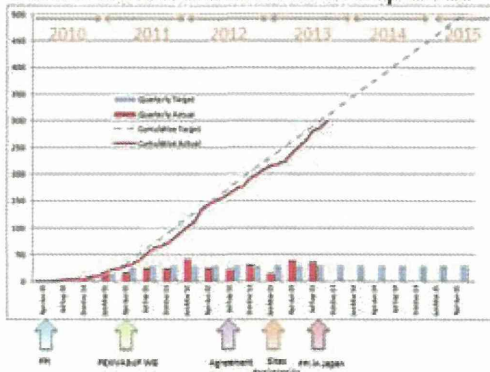
2) ①PEXIVAS; 本試験は、AAV に対して免疫抑制療法への血漿交換療法追加による、①生命予後と腎予後の改善の有無、②経口ステロイド減量維持療法による非劣性の有無、を明らかにする国際臨床試験である。

本試験への日本の参加協力を求められ、難治性血管炎研究班として取り組むことを念頭に、2011 年 6 月に国際班メンバーを中心に PEXIVAS-JP working group が立ち上げられた。その後 (2011.6~12) の話し合いの中で、本研究班のプロジェクトとして取り組むことが決定され、PEXIVAS-JP group と名称が変更された (グループ代表者 宮崎大学 藤元)。2012 年 2 月には、グループ代表施設で倫理委員会の承認が得られた。本年度も国内及び国外のメンバー間で会議を行い、試験実施へ向けての必要事項が達成され、症例募集可能な状態となった。



2013年9月にわが国から第1症例目が登録され（田附興風会北野病院、施設代表者、武曾恵理）、現在までに3例が登録されている。

PEXIVAS Recruitment as of Sep 2013



②RITAZAREM; 本試験は、リツキサン維持療法が再発AAV症例（過去にGPAもしくはMPAと診断されている症例）の予後改善につながるかどうかを検証する国際多施設共同臨床試験である（EUVASとVCRCによる共同研究、主任研究者は David Jayne と Peter Merkel、症例登録開始は2013年4月）。本試験への日本の参加協力を求められ、2013年5月に本分科会を中心に日本のRITAZAREM参画について検討を開始し、班長の承認を得て、試験組織を立ち上げた（RITAZAREM-JPグループ代表者 宮崎大学 藤元）。7月の本研究班会議にての承認を得て、2013年8月にRITAZAREM-JP キックオフミーティングが行われた（参加施設；岡山大学、杏林大学、北野病院、帝京大学、東京都健康長寿医療センター、千葉大学、宮崎大学）。

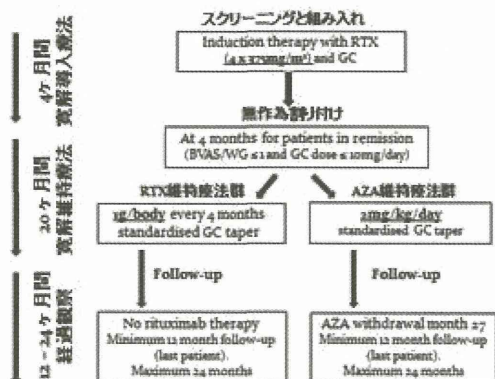
2013年末には、中央試験依頼者・日本側の試験依頼者（岡山大学）・主たる試験実施医療機関（宮崎大学）の三者間で共同研究契約

（Collaboration Agreement）締結のための文書取り交わし、臨床研究保険加入契約、グループ代表施設で倫理委員会審査などが行われた。さらに、PEXIVAS試験と同様に各種の手続きを順次進めており、来年度早々には日本国内においても症例登録が始まることが期待される。

3) GPA比較研究; わが国ではMPAに比べて頻度の少ないGPAに関して、MPAと同様に日英比較研究の提案が英国より有り、日本の参加施設募集を本研究班全体に諮り、運営委員会を設けて行うこととなった。GPA あるいは GPA 疑いで、2000年1月～2012年4月の間に、参加施設でフォローされた患者を対象として、日本で100～150症例のデータ収集を目標としている。中小型血管炎の臨床研究分科会と本分科会が共同で進めている（主任研究者：榎野博史班長、運営委員：土橋浩章先生、本間栄先生、藤元昭一（兼、事務局））。本研究班内で参加施設を募り、16施設から参加表明を得て、GPA症例のデータ収集を行っており、現在、6施設から51症例の登録がなされている。今後、症例収集を進め、来年度にはCambridge 大学症例とのデータ比較を行う予定である。

#### D. 考案

血管炎の分類・診断基準については、現在まで世界的に統一されたものではなく、日本の診断基準も全世界に認められているものではない。このような状況の中、新たに始まった分類・診断基準作成の国際共同研究に、わが国も参画（わが国の症例を登録）する意義は大きいと考えられる。同様に、ANCA 関連血管炎の治療法に関して、世界でのエビデンス構築に日本が



寄与すること（国際共同臨床試験への参画）は重要であるとの認識が本研究班でも確認され、実際に症例登録も始まった。諸外国とともに行なう介入を伴うランダム化比較臨床試験には、いくつものハードルがあり時間が掛かったが、本研究班の先生方のご協力に加え、特に海外の主任研究者達の後押しを受け、軌道に乗ってきている。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Iwakiri T, Fujimoto S, Kitagawa K, Furuichi K, Yamahana J, Matsuura Y, Yamashita A, Uezono S, Shimao Y, Hisanaga S, Tokura T, Wada T, Kitamura K, Asada Y: Validation of a newly proposed histopathological classification in Japanese patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulo- nephritis. *BMC Nephrol* 14(1):125, 2013.
- 2) Kobayashi S, Fujimoto S: Epidemiology of vasculitides: differences between Japan, Europe and North America. *Clin Exp Nephrol*. 17(5):611-4, 2013.
- 3) Furuta S, Chaudhry AN, Hamano Y, Fujimoto S, Nagafuchi H, Makino H, Matsuo S, Ozaki S, Endo T, Muso E, Ito C, Kusano E, Yamagata M, Ikeda K, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Westman K, Jayne D: Comparison of phenotype and outcome in microscopic polyangiitis patients between Europe and Japan. *J Rheumatol*, in press
- 4) 藤元昭一、猪原登志子: ANCA 関連血管炎の病因・病理、診断・治療 ANCA 関連血管炎の臨床研究 PEXIVAS 試験。日本臨床 71:392-398, 2013.
- 5) 小林茂人、藤元昭一: 血管炎の分類と診断基準 新しい国際分類と診断基準(CHCC2012 と DCV AS)欧州リウマチ学会/アメリカリウマチ学会による血管炎の分類基準・診断基準の作成。日本臨床 71:70-73, 2013.

### 2. 学会発表

- 1) 藤元昭一、小林茂人、鈴木和男: 血管炎の国際疫学。日本リウマチ学会総会 シンポジウム (京都) 2013 年 4 月
- 2) 桑原知代、菊池正雄、戸井田達典、岩切太幹志、福田顕弘、中川秀人、佐藤祐二、岩坪修司、藤元昭一: 半月体形成を認めた MPO, PR3 - ANCA 陽性の IgG4 関連腎臓病の 1 例。日本腎臓学会西部学術大会 (松山) 2013 年 10 月
- 3) 馬場明子、皆川明大、福留慶一、久永修一、今村卓郎、佐藤祐二、藤元昭一: ANCA 関連血管炎にて維持血液透析に至った患者 25 例の検討。日本透析医学会総会 (博多) 2013 年 6 月
- 4) 猪原登志子、藤元昭一、鈴木和男、武曾惠理、遠藤知美、内田俊也、濱野慶朋、槇野博史、PEXIVAS-JP グループ。抗好中球細胞質抗体関連血管炎に対する血漿交換療法と国際共同臨床試験 PEXIVAS。第 19 回 MPO 研究会 (東京) . 2013 年 10 月 26 日
- 5) 猪原登志子、藤元昭一、鈴木和男、武曾惠理、遠藤知美、PEXIVAS-JP グループ: 抗好中球細胞質抗体関連血管炎に対する血漿交換療法と国際共同臨床試験。第 34 回日本アフェレシス学会総会 シンポジウム (軽井沢)。2013 年 11 月

## F. 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 |

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究 2013 年度終了報告書

欧州リウマチ学会/アメリカリウマチ学会による新しい血管炎の分類・診断基準の作成  
(Diagnostic and Classification Criteria for Systemic Vasculitis:DC-VAS)  
に関する研究（国際研究協力分科会）

研究分担者 小林 茂人 順天堂越谷病院内科 教授  
濱野 慶朋 東京都健康長寿医療センター 腎臓内科 部長  
平橋 淳一 東京大学医学部腎臓内分泌内科 助教  
猪原登志子 京都大学医学部附属病院 臨床研究総合センター  
早期臨床試験部 特定助教  
分科会長 藤元 昭一 宮崎大学医学部医学科血液・血管先端医療学講座 教授

研究要旨

The European vasculitis Society (EUVAS) と Vasculitis Clinical Research Consortium(VCRC)による Vasculitis Clinical Research Investigators Meeting が、2013 年 6 月 5 日にパリ、2013 年 10 月 25 日（土）サンディエゴの Grand Horton ホテルにおいて開催・参加した。諸外国では、多くの臨床医によって血管炎の臨床研究が共同研究として組織され、血管炎の臨床・治療が着実に進歩してきた。EUVAS,VCRC などの臨床研究に関して理解することが重要な課題考えられる。DCVAS の国際研究は当研究班の 15 施設から参加し、国際研究の目標は 3500 例、世界 75 施設からであり、2014 年 12 月に登録を終了する予定であり、日本からの再度登録を促す依頼があった。

研究協力者

高橋 啓 東邦大大橋医療センター病理 教授、湯村和子 国際医療福祉大学 腎臓内科 教授、猪原登志子 京都大学医学部探索医療臨床  
武 助教、原淵保明 旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授、中島裕史 千葉大  
大学院遺伝子制御 教授、武曾恵理 田府興風会医学研究所附属北野病院腎臓内科 部長、  
内田俊也 帝京大学医学部内科 教授、伊藤千春 自治医科大学腎臓内科 講師、岩本逸夫

国保旭中央病院アレルギー・リウマチセンター  
センター長、中村浩士 山口大学医学部地域医療推進学 准教授

A. 研究目的

血管炎に関する海外の研究の状況・方向、研究成果を伝えること。また、日本の研究の状況・方向、研究成果を伝えること。さらに、国際共同研究に参加し、日本と欧米の血管炎の異同を知ることによって、血管炎の原因、疫学、

臨床症状、新しい治療法など内外の理解を深めることが目的である。

## B. 研究方法

国際会議への参加を依頼され、出席・討議に参加する。日本での検討事項は当研究班に報告・発表する。論議すべき事項は当研究班にて決定される。日本での倫理委員会は、榎野博史班長主任研究者のもとで岡山大学の倫理委員会の承認を得て、当分科会及び研究参加施設での承認を得る。申請書類の作成、臨床記録票の作成、登録症例の暗号化は当分科会が行う。

## C. 研究結果

### 1. The European vasculitis Society (EUVAS) 会議

欧州血管炎研究会議であり、2013年と6月5日にパリで開催され、藤元昭一が参加した。

### 2. Vasculitis Clinical Research

#### Investigator's meeting

米国の血管炎の研究グループ Vasculitis Clinical Research Consortium (VCRC: 主任研究者 Peter Merkel) の国際研究会議であり、本年はアメリカリウマチ学会(ACR)の開催前日の2013年10月25日(土)サンディエゴのGrand Hortonホテルで開催された(表1)。小林茂人、針谷正祥先生らが参加した。

今回の会議で、"PedVas Study"として、18歳未満の小児の血管炎の国際臨床研究が開始されたことが発表された。

### 3. DCVAS (ACR/EULAR endorsed study to Development Classification and Diagnostic criteria for primary systemic Vasculitis)

本国際研究の目的は、1)Develop and validate

new classification for systemic vasculitis for research purpose to improve approaches to treatment. 2)Development diagnostic criteria which can be used in daily clinical practice である。

本年9月上旬の時点で、世界32各国、2872症例(昨年1662例)の登録に至った。日本からは22施設、112症例の登録があった。目標は3500症例であり、結節性動脈周囲炎、高安動脈炎および対照例の登録が不足している。このため、2014年12月に登録終了が延期された。EUVASおよびVCRCから日本からの再度登録を促す依頼があった。前回はDCVAS登録規定が曖昧であったが、現時点では改善された。また、日本で集約して登録することなどのシステムの継続・理解が必要と思われた。特に、日本からのMPAの典型症例(間質性肺炎と伴う)、GPAの限局型症例を登録する必要があると考えられる。

事務局(宮崎大学 藤元昭一)から9月20日に各施設の倫理委員会で承認された参加19施設に症例登録データの記載に関する依頼のメールを送り、現在、岡山大学、大阪北野病院、聖マリアンナ病院(皮膚科)、東邦大学の4施設から症例登録データの送付があり、残り15施設からの送付を待っている状態である。

症例の登録に関して非常に大切なことは、コントロール症例の重要性である。コントロールとは、血管炎様の症状がある疾患であり、かつ、診断未確定でも良いこと(Vasculitis Clinical Research Investigator's meetingで確認された)で、このコントロール症例の補充が求められた(図1-8)。

## D. 考案

諸外国では、多くの臨床医によって血管炎の臨床研究が共同研究として組織され、血管炎の臨床・治療が着実に進歩してきた。EUVAS, VCRC, FVSGなどの臨床研究に関して理解する

ことが重要であると考えられる。

DCVAS の国際研究には、当研究班の 22 施設から参加し、また、PEXIVAS に関しても、一部の施設が参加することは血管炎の国際共同研究を推進していくうえで重要な意義であると考えられる。

特に、高安動脈炎、川崎病など日本に特有な、発見者の氏名を冠した血管炎があり、ANCA 関連血管炎も欧米と異なった頻度・臨床病態を呈していることが国際共同研究で明らかになった。このため、当研究班が DCVAS に参加することが重要である。

## E. 結論

EUVAS-VCRC の会議に参加し、DCVAS の国際研究に当研究班の 15 施設が参加した。日本からの DCVAS の症例登録が重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Matsuda J, Kaburaki T, Kobayashi S, Numaga J. Treatment of recurrent anterior uveitis with infliximab in patient with ankylosing spondylitis. *Jpn J Ophthalmol.* 2013;57:104-7.
2. Kawasaki A, Inoue N, Ajimi C, Sada KE, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Sumida T, Tohma S, Miyasaka N, Matsuo S, Ozaki S, Hashimoto H, Makino H, Harigai M, Tsuchiya N. Association of IRF5 polymorphism with MPO-ANCA-positive vasculitis in a Japanese population. *Genes Immun.* 2013 Aug 29. doi: 10.1038/gene.2013.45. [Epub ahead of print] (In Press).
3. Nagao T, Kusunoki R, Iwamura C, Kobayashi S, Yumura W, Kameoka Y, Nakayama T, Suzuki K. Correlation of Interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 levels with the crescent

formation and myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody titer in SCG/Kj mice by treatment with anti-interleukin-6 receptor antibody or Mizoribine. *Microbiol Immunol.* 2013;57:640-50.

4. Yumura W, Kobayashi S, Suka M, Hayashi T, Ito S, Nagafuchi H, Yamada H, Ozaki S. Assessment of the Birmingham vasculitis activity score in patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: sub-analysis from a study by the Japanese Study Group for MPO-ANCA-associated vasculitis. *Mod Rheumatol.* 2013 May 28 (In Press).
5. Muso E, Okuzaki D, Kobayashi S, Iwasaki Y, Sakurai MA, Ito A, Nojima H. Ficolin-1 is up-regulated in leukocytes and glomeruli from microscopic polyangiitis patients. *Autoimmunity.* 2013 ; 46:513-24
6. Yamanishi Y, Ito-Ihara T, Nagao T, Uno K, Kobayashi S, Muso E, Shane PY, Firestein GS, Hashimoto H, Okazaki T, Suzuki K. Clinical features of patients with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies targeting native myeloperoxidase antigen. *Mod Rheumatol.* 2013.23:963-71.
7. 公文 義雄, 有井 薫, 谷口 義典, 小林 茂人. 血清炎症反応陰性脊椎関節炎患者の診断における FGD-PET/CT の有用性、日本脊椎関節炎学会誌 5 ; 15-19、2013

## 総説

1. Kobayashi S, Fujimoto S. Epidemiology of vasculitides: differences between Japan, Europe and North America. *Clin Exp Nephrol* 2013;17:611-4.
2. 小林 茂人, 藤元 昭一, 鈴木 良雄. 血管炎、-基礎と臨床のクロストーク- 血管炎の分類と診断基準 新しい国際分類と診断基準

- (CHCC2012とDCVAS) 欧州リウマチ学会/アメリカリウマチ学会による血管炎の分類基準・診断基準の作成,日本臨床、71巻増刊1 血管炎 Page70-73、2013.
3. 小林 茂人、血管炎-基礎と臨床のクロストーク - 大型血管炎の病因・病理、診断・治療 巨細胞性動脈炎(側頭動脈炎)の診断と治療、日本臨床 71巻増刊1 血管炎 Page179-182、2013
  4. 小林 茂人、木田 一成、図でみる免疫学のABC 免疫と耳鼻咽喉科関連疾患の病態 ANCA 関連血管炎症候群 JOHNS 29巻3号 Page527-531、2013.
  5. 小林 茂人、血管炎の診断と治療-新分類 CHCC2012 に沿って 大型血管炎 巨細胞性動脈炎(GCA)の正しい理解 側頭動脈炎(TA)ではなぜいけないのか、医学のあゆみ 246 巻 1号 Page12-18、2013.
  6. 小林茂人、リウマチ性疾患の予後、脊椎関節炎の予後、リウマチ科、49 巻 6号 Page686-690、2013.
  7. 飯野 ゆき子、原渕 保明、岸部 幹、小林 茂人、立山 香織、吉田 尚弘、ANCA関連難治性中耳炎 診断治療におけるピットホールとジレンマ解消 成人難治性中耳炎の診断アルゴリズム ANCA関連血管炎性中耳炎を正しく診断するために、Otology Japan,23:282-284,2013
  8. 原渕 保明、飯野 ゆき子、岸部 幹、吉田 尚弘、立山 香織、小林 茂人、ANCA関連難治性中耳炎 診断治療におけるピットホールとジレンマ解消 ANCA関連血管炎性中耳炎(Otitis media with ANCA associated vasculitis(OMAAV))の診断基準(案)、Otology Japan,23,279-281,2013.
  9. 小林 茂人、ANCA 関連難治性中耳炎 診断治療におけるピットホールとジレンマ解消 ANCA 関連血管炎の診断の難しさと治療の重要性 内科の立場から Otology Japan, 3:258-262,2013.
  10. 小林 茂人 大型血管炎 巨細胞性動脈炎 (GCA)の正しい理解 側頭動脈炎(TA)ではなぜいけないのか 医学のあゆみ,246、12-18、2013
  11. 小林 茂人 高安動脈炎と巨細胞動脈炎 似て非なるもの early vs late-onset aortoarteritis? 血管炎症候群の新しい考え方、分子リウマチ治療 6、28-34、2013
2. 学会発表
    1. 藤元 昭一, 小林 茂人, 鈴木 和男,血管炎の最前線 血管炎の国際疫学,日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集57回・22回 Page145,2013.
    2. 多田 久里守, 田村 直人, 小林 茂人, 井上 久, 高崎 芳成、本邦での強直性脊椎炎に対するインフリキシマブの有効性とその予測因子の解析、日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集57回・22回 Page299、2013.
    3. 多田 久里守, 田村 直人, 小林 茂人, 井上 久, 高崎 芳成、SAPHO症候群に見られた腰仙椎部くも膜嚢胞による下肢不全麻痺に対し嚢胞腹腔短絡術が有効であった一例、日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集57回・22回 Page343、2013.
    4. 長谷部 成美, 川崎 綾, 小林 茂人, 佐田 憲映, 山田 秀裕, 古川 宏, 當間 重人, 住田 孝之, 宮坂 信之, 尾崎 承一, 橋本 博史, 榎野 博史, 針谷 正祥, 土屋 尚之ANCA、関連血管炎とUBE2L3、TNIP1遺伝子多型の関連研究、日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集57回・22回 Page366、2013.03
    5. 井上 尚哉, 川崎 綾, 小林 茂人, 佐田 憲映, 山田 秀裕, 古川 宏, 當間 重人, 住田 孝之,



宮坂 信之, 尾崎 承一, 橋本 博史, 榎野 博史, 針谷 正祥, 土屋 尚之, ANCA関連血管炎におけるSTAT4、IRF5遺伝子多型の関連研究, 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集57回・22回 Page366, 2013.

6. 川上 民裕, 石津 明洋, 有村 義宏, 小林 茂人, 尾崎 承一, 聖マリアンナ医科大学皮膚科で経験した皮膚型結節性多発動脈炎101例の集計, 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集57回・22回 Page371, 2013.

7. 木田 一成, 小林 茂人, 高崎 芳成, 関節リウマチ患者における低用量タクロリムス投与の効果, 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集57回・22回 Page561, 2013.

8. 金子 元英, 小林 茂人, 平田 大介, 木田 一成, 守田 貴浩, 高崎 芳成, 守田 浩一, First biologics における Tocilizumab(TCZ)の QOL に対する効果の前向き試験(52週) SAQRA study 日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 57回・22回 Page578, 2013.

9. 小林茂人, 木田一成, 井上 久, 多田久里守, 田村直人, 高崎芳成, 岡本洋幸, 鈴木利根, 強直性脊椎炎に伴う前部ぶどう膜炎について, 日本脊椎関節炎学会第23回学術集会, 2013年9月14日京王プラザホテル 本館42階富士

**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

**Aims** D C V A S

- Develop and validate new classification criteria for systemic vasculitis for research purposes and to improve approaches to treatment
- Develop diagnostic criteria which can be used in daily clinical practice

図 1. DCVAS の目的

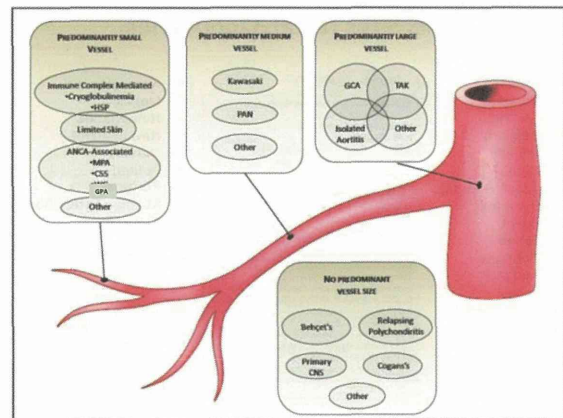


図 2. 血管炎の分類法 (案) :DCVAS による

**Overview** D C V A S

**Recruitment**

Patients with a diagnosis of vasculitis (cases) or any presentation which mimics vasculitis (comparators). Either new patient or diagnosis within 2 years.

**Data**

Clinical features, serology, pathology and radiology  
Baseline data at diagnosis - 6 month follow up

**Numbers**

75-100 sites worldwide  
Estimated total cases                       = 2028  
Comparators for diagnostic criteria       = 1560  
Estimated total patients                   = 3588

図 3. DCVAS 登録法、目標症例数など



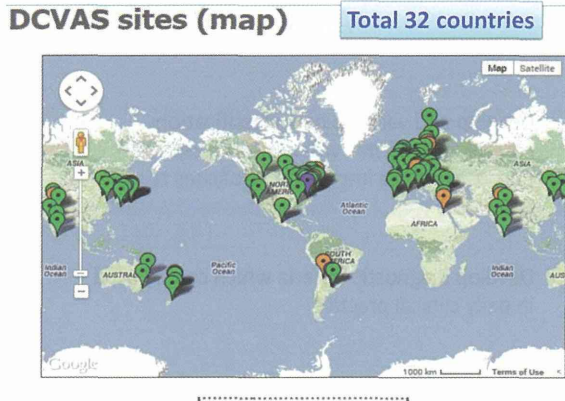


図 4. DCVAS 参加施設 (国と地域)

### DCVAS Sites (total 32 countries)



図 5. 世界 32 カ国と日本からの参加施設

### DCVAS

PARTICIPANT ENROLMENT as of September 2013			
	Total sites	Total patients recruited	% patients recruited
Europe	56	1929	67%
North America	19	557	19%
Rest of world	34	386	14%
<b>TOTAL</b>	<b>109</b>	<b>2872</b>	

(日本は 22施設, 112 症例)

図 6. 現在の登録症例と地域別登録症例数

### DCVAS

### Overall recruitment

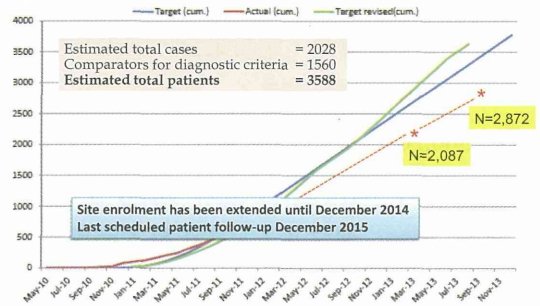


図 7. 登録症例の累積数: 登録終了期間が 2014 年 12 月に延期された。

### Recruitment by diagnosis



図 8. 疾患別登録数の現状: PAN, TAK および対象症例の登録が必要である。

---

**VASCULITIS CLINICAL RESEARCH INVESTIGATORS MEETING**

**Saturday October 25, 2013: 12:00 AM – 5:00 PM**

**San Diego, CA, USA**

---

*CHAIR: PETER A. MERKEL*

- 1) Welcome and Introductions
- 2) ACR-EULAR Diagnosis and Classification Study (DCVAS)....P. Grayson, C. Ponte, R. Suppiah
- 3) Current therapeutic clinical trials updates:
  - a) Consortium-driven, multi-centered clinical trials (investigator-initiated)
    - i) Update on current trials of the FVSG..... B. Terrier, B. Dunogu , M. Samson
    - ii) VCRC trial of abatacept for LVV (AGATA)..... C. Langford
    - iii) VCRC-EUVAS collaborative trials:
      - (1) Plasma exchange in AAV (PEXIVAS)..... P. Merkel
      - (2) Rituximab for maintenance in AAV (RITAZAREM) .... R. Smith
      - (3) Abatacept for GPA (ABROGATE)..... C. Langford
    - iv) Update on other EUVAS activities ..... A. Mahr
  - b) Industry-sponsored, multi-centered clinical trials:
    - i) Tocilizumab for giant cell arteritis (GIACTA) .....
    - ii) Belimumab for ANCA-associated vasculitis (BREVA) ..... P. Merkel
    - iii) Other? .....
  - c) Clinical trials for Behçet’s disease..... G. Hatemi
  - d) Update on clinical research and trials in vasculitis in Japan ..... M. Harigai
  - e) *Group discussion of current status/opportunities for trials in vasculitis*
- 4) OMERACT-outcome measures in vasculitis:
  - i) Update on OMERACT agenda in vasculitis .....P. Merkel
  - ii) Development of outcome measures for Behçet’s disease ..... G. Hatemi
  - iii) Development of outcome measures for GCA/TAK..... H. Direskeneli
- 5) GCA Ultrasound Study (TABUL) ..... R. Luqmani
- 6) Update on the PedVas study..... M. Twilt, S. Bensler
- 7) General discussion and proposals/ideas for new studies
- 8) Close

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
平成 25 年度研究分担報告書

難治性血管炎の新規治療法開発のための基礎的アプローチ

研究分担者 平橋 淳一 東京大学医学部附属病院腎臓内分泌内科 助教

**研究要旨：** 難治性血管炎研究における国際的貢献というスローガンの中で、基礎的アプローチによる実験結果に基づいて、ANCA 関連血管炎の新たな治療法をわが国から海外へ発信することを目標に研究を行った。

活性化好中球が細胞外に放出する自らのクロマチン線維の束である好中球細胞外トラップ(NETs)は外来微生物を捕捉し生体を防御する一方、自己免疫性疾患や炎症性疾患、血栓症の病態形成に関与している。我々は NETs 上に同定されている好中球顆粒成分であるラクトフェリンが活性酸素発生系とは独立に NETs 形成を顕著に抑制すること、放出された NETs を凝集させることを見出した。In vivo では好中球依存性血管炎である自己免疫性小型血管炎および出血性血栓性血管炎において、ラクトフェリンが NETs 形成を抑制し病態を改善させた。ラクトフェリンは臨床応用を考える上で安全性の高い物質として知られていることから、本研究の実験結果を契機として、ラクトフェリンの血管炎をはじめとする NETs 関連疾患への幅広い応用が期待される。

**A. 研究目的**

抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody: ANCA) 関連血管炎は急速進行性の多臓器障害を来し、集学的治療を要する最重症疾患のひとつである。現状ではステロイドや免疫抑制薬、血漿交換といった治療が中心となっており、感染症などの副作用や治療過程での再発により致命的な転帰をとる場合も多くより安全な治療法の開発が求められている。好中球は貪食、脱顆粒により生体を防御しており、外来微生物からの生体防御において重要な役割を果たす最大のポピュレーションを持つ白血球である。最近、好中球がクロマチン線維から成る網目状構造物(Neutrophil

Extracellular Traps ; NETs)を細胞外に放出し、細菌、真菌、寄生虫等の外来微生物を捕捉することが報告され新たな生体防御メカニズムの一つとして注目されてきている。Apoptosis や necrosis とは異なり、NETs の放出を特徴とするこの細胞死の過程は NETosis と呼ばれる。しかし一方で NETs の制御不全は様々な自己免疫性疾患の病態に関与することが報告されている。抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody ; ANCA)関連血管炎においては ANCA が直接好中球を刺激し NETs 産生が亢進することが知られている。また全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus ; SLE)においては NETs のクリ

アランスの低下が病態に関わっていることが報告されている。また自己免疫性疾患だけでなく、深部静脈血栓症を始めとした血栓性疾患においても NETs の制御不全が関わるということが報告されている。そのため NETs の関連する多くの疾患において、安全な NETs 抑制物質の開発が新たな治療薬として期待されている。

ラクトフェリン(lactoferrin ; Lf)は主に母乳や涙液等のヒト外分泌液や好中球顆粒内に含まれる多機能蛋白である。これまでに抗ラクトフェリン抗体が SLE 患者において上昇しているという報告や、関節リウマチ患者において抗ラクトフェリン抗体の抗体価がその病勢と相関しているという報告があり、内因性ラクトフェリンの減少がこれらの病態に関与していることが示唆される。また、外因性ラクトフェリン投与により新生児における敗血症による死亡率が低下したことを示唆する無作為化試験があり、この病態におけるラクトフェリンの保護的な機能が示唆される。我々は、ラクトフェリンが NETs 形成において抑制的に機能し、血管炎をはじめとした NETs の関連する疾患において保護的に働くと仮説をたて検証した。

## B. 研究方法 および

### C. 研究結果

これまでの研究で、ANCA 血管炎の自然発症型モデルである spontaneous crescentic glomerulonephritis forming mice/Kinjoh (SCG/Kj マウス)に血管炎発症前から Lf を長期投与してみたところ、急速進行性腎炎と肺血管炎を予防し生命予後を著明に改善することが分かった。さらに、Lf 投与群では

自己抗体である Myeloperoxidase (MPO)-ANCA の産生が顕著に抑制されることが判明した。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。

我々は in vitro の実験系において薬理的刺激物質として phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を用いてヒト末梢血由来好中球（東京大学医学部倫理委員会の承認のもと、健康者ボランティアより分離）を刺激し NETs 形成を惹起し共焦点顕微鏡を用いて観察した。NETs 形成が外因性のラクトフェリン前処置により濃度依存性に顕著に抑制されることを、共焦点顕微鏡下に確認した。ラクトフェリンによる NETs 形成の抑制効果を定量するために好中球より放出された培養上清 DNA の濃度を測定したところ、顕微鏡下での結果と対応するようにラクトフェリン前処置が培養液中 DNA 濃度上昇を抑制した。NETs 形成を惹起する刺激として PMA の他に ANCA、活性化血小板が知られているが、いずれの刺激の場合でもラクトフェリン前処置が濃度依存性に NETs 形成を抑制することを in vitro の実験系において示した。

また電子顕微鏡を用い PMA 刺激によりヒト好中球から放出された NETs を観察したところ、ラクトフェリン非存在下では NETs 線維一本一本が網目状に拡散していることが観察されたのに対し、ラクトフェリン存在下では NETs 線維が一塊に凝集したように集簇した像が観察された。

内因性ラクトフェリンの NETs 形成にお

ける役割を検証するために、ヒト骨髓球系白血球細胞株 (neutrophil-like human myeloid leukemia cell line ; HL-60 ) に対してラクトフェリン siRNA 処置を用いてラクトフェリン mRNA のノックダウンを行った。ヒト末梢血由来好中球は終末分化細胞であり寿命が短いため遺伝的操作が困難であるため、これまでに好中球同様に NETs 形成を起こすことが知られている HL-60 細胞を実験に使用した。ラクトフェリン mRNA 発現、ラクトフェリン蛋白発現は siRNA 処置によって 54%、49% 低下したことをそれぞれ real time PCR、western blotting により確認した。siRNA 処置により内因性ラクトフェリンをノックダウンした HL-60 細胞が PMA 刺激により形成する NETs は、negative control siRNA 処置を施行した HL-60 細胞と比較して増強することが示された。このデータからラクトフェリンが内因性の NETs 抑制物質であることが示唆された。

NETs 形成におけるラクトフェリンの局在を検証するためにヒト由来好中球を PMA により刺激し免疫蛍光染色を施行、共焦点顕微鏡を用いて観察した。無刺激の好中球において好中球細胞質に存在していた内因性ラクトフェリンが、PMA 刺激により細胞膜へ移行することが確認された。外因性にラクトフェリンを投与した場合、細胞膜上へのラクトフェリンの集積がより顕著となった。

これまでの報告からラクトフェリンは強い陽性荷電物質であり、陰性荷電をもつ DNA と結合することが知られている。我々はラクトフェリンが NETs 形成を抑制するメカニズムは陽性荷電による NETs への結合および NETs を縮合させることによる

NET-DNA 拡散の抑制であると考えた。PMA によりヒト由来好中球に NETs 形成を惹起、NET-DNA を抽出した。NET-DNA にラクトフェリンを投与し電気泳動で観察したところバンドの上方へのシフトが観察された。興味深いことに、陰性荷電物質として知られるヘパリンおよび LPS を前処置することによりバンドの上方へのシフトが解除された。この結果はラクトフェリンが NET-DNA と電荷的に結合したことを示唆する。

これまでに NETs 形成において必須の細胞内現象として活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) の産生が重要な役割を持つことが知られている。さらに好中球内での ROS 産生亢進に引き続いて起こるエラスターゼの核内移行によるヒストン消失、ROS により活性化するカルシウム依存性の酵素である peptidylarginine deiminase 4 (PAD 4) が触媒するヒストンシトルリン化等の細胞内現象もまた NETs 形成においては重要な役割をもつことが報告されている。我々は、これらの細胞内現象に対するラクトフェリンの影響を検証した。

ヒト由来好中球を PMA により刺激し NETosis を惹起した。好中球細胞内で産生される次亜塩素酸、ヒドロキシラジカルをそれぞれ見目、瀬月内らが開発した HySOx、HPF の蛍光プローブにより検出しフローサイトメトリーを用いて蛍光強度を測定した。NADPH oxidase inhibitor である DPI がこれらの蛍光強度を有意に抑制する一方で、ラクトフェリンは蛍光強度を抑制することはなかった。また、ヒストン H3 シトルリン化を抗ヒストン H3 シトルリン化抗体を用いた western blotting により検出した。PMA 刺激により惹起されたヒストン H3 シトルリ