

厚生労働科学研究費補助金 医療技術実用化総合研究事業

難治性SLEに対するボルテゾミブ療法の有効性・安全性検証試験

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 張替 秀郎

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I . 総括研究報告

難治性SLEに対するボルテゾミブ療法の有効性・安全性検証試験 張替秀郎	----- 3
--	---------

II . 分担研究報告

1. B細胞を標的とした全身性エリテマトーデスの治療の開発に関する研究 田中良哉、中山田真吾、久保智史	----- 17
2. SLEにおけるP糖蛋白質発現リンパ球の治療抵抗性および組織病態への関与 に関する研究 齋藤和義	----- 22
3. ループス腎炎のpodocyteにおけるCD86分子を介した蛋白尿発現メカニズムに 関する研究 川上 純、一瀬邦弘	----- 25
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 28

研究要旨

SLEは皮膚、中枢神経、腎臓など多臓器障害を伴う代表的自己免疫疾患で、自己抗体産生等の免疫異常がその原因である。根本的治療はなく、発症ピークが20 - 30歳代であることから長期のステロイド剤による治療を余儀なくされ、感染症・動脈硬化・骨粗鬆症等合併症により長期的予後は不良である。さらに重症例、難治症例においてはステロイドのみでの病勢制御が困難である。長期ステロイド投与の回避や制御不良例に対してはステロイド以外の治療薬が必要であるが、現時点ではその選択肢が乏しく新規治療法の開発が強く望まれている。ボルテゾミブは形質細胞腫瘍である多発性骨髄腫に対し高い有効性を有する分子標的薬であり、形質細胞腫瘍だけでなく形質細胞が産生する抗体が発症原因である自己免疫疾患に対しても高い効果を発揮することが期待される。

これらの背景から、平成 24 年度より申請者らは厚生労働省科学研究補助金のもとに難治性 SLE に対するボルテゾミブ療法の確立を目指した医師主導治験を進めている。平成 25 年度は各施設の IRB 承認を得て、7 月に治験届を提出し、確認期間の終了を待って、各施設でキックオフミーティングを行い、11 月から症例のエントリーを開始した。平成 25 年度末の時点で 8 名の治験が進行中で、さらに 1 名のスクリーニング予定となっており、順調に症例登録が進んでいる。

また、薬事相談の際に、前臨床のデータはすでに論文化されているものの、治験実施者自身でデータを有していることが望ましいとの助言があったため、SLE モデルマウスでの薬効を追試する研究を実施した。その結果、ボルテゾミブ投与群においてリンパ節腫脹、脾腫の著明な改善と抗 dsDNA 抗体の低下を認め、期待通りの効果が得られている。

研究分担者

石井智徳	東北大学大学院医学系研究科	血液・免疫病学分野	准教授
田中良哉	産業医科大学	第一内科	教授
川上純	長崎大学大学院医学系研究科	第一内科	教授
石澤賢一	東北大学病院	臨床試験推進センター	特任教授
山口拓洋	東北大学大学院医学系研究科	医学統計学分野	教授
井上彰	東北大学病院	臨床試験推進センター	特任准教授

研究協力者

向井陽美	ヤンセンファーマ
------	----------

A. 研究目的

膠原病の代表的疾患である全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus : SLE) は、男女比 1:9、発症年齢のピークが 20-40 歳と 若年女性が主体となる疾患である。頬部紅斑、円盤状皮疹、日光過敏などの皮膚病変、口腔潰瘍などの粘膜病変、関節炎などの症状に加え、溶血性貧血、免疫性血小板減少症などの血液異常、更に漿膜炎、腎臓、中枢神経、肺、心、腸、膀胱、末梢神経、膵臓、眼など多彩な内臓病変が出現する。根本的治療がなく、炎症の病態に合わせてステロイドホルモンを中心とした免疫抑制療法がおこなわれるが、治癒することは期待できず、一生涯継続的な診察、治療を必要とされる難治性疾患である。特に、重症例、難治性症例においては標準的治療薬であるステロイド剤のみでは病勢をコントロールすることが難しく、またステロイド剤が有効であっても一定量以下に減量する事が出来ず治療に難渋することが珍しくない。類縁疾患である関節リウマチは生物学的製剤の開発により、その生命予後、QOL が目覚ましく改善してきているものの、SLE に対する治療法は旧来のままであり、新たな治療法の開発が急務である。

SLE は形質細胞により産生された自己抗体が免疫複合体を形成し、組織に沈着して補体系の活性化などを介して炎症性変化並びに組織障害が惹起され発症すると考えられている。したがって SLE の特異的治療として、自己抗体産生を長期に渡り、かつ、効果的に阻止するために B 細胞から形質細胞に至る抗体産生細胞の制御が有用であることが期待され、抗 CD20 抗体（リツキシマブ）や B 細胞共刺激因子である B_{Ly}S に対する抗体等の生物学的製剤が開発されてきた。しかしながらこれら新規治療薬による臨床試験の結果も満足できる結果ではなく、更に抗体産生に特化した細胞を標的とした新たな治療が必要であると考えられる。

ボルテゾミブは可逆的かつ特異的なプロテアソーム阻害薬であり、多発性骨髄腫を対象疾患として承認されている薬剤である。細胞内では蛋白合成の過程で生産される変性蛋白質はプロテアソームで分解・除去されるが、この変性蛋白質が過剰に蓄積すると小胞体ストレス応答が誘導され細胞はアポトーシスに陥る。抗体を大量に産生する形質細胞は、変性蛋白質が蓄積しやすい状態であり、プロテアソーム阻害による ER ストレスからアポトーシスを誘導しやすいものと考えられている。これらの特性から、ボルテゾミブは病原性自己抗体産生細胞を排除することができる可能性が高い。

これらの背景から、難治性 SLE に対するボルテゾミブ療法の安全性・有効性を検証することを目的とした本研究を計画した。

B. 研究方法

本研究は「難治性SLEに対するボルテゾミブ療法」の医師主導治験を行うことが目的である。この医師主導治験の実施体制を右に示す。本治験は東北大学臨床研究推進センターを中心に行い、実施施設は東北大学、産業医科大学、長崎大学の3施設である。

また、SLEモデルマウスを用いてボルテゾミブの薬効を追試する研究を実施する。

(倫理面への配慮)

本研究は医師主導治験であり、厚生労働省の「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（GCP）」に準拠して行う。

具体的には以下のように行う。

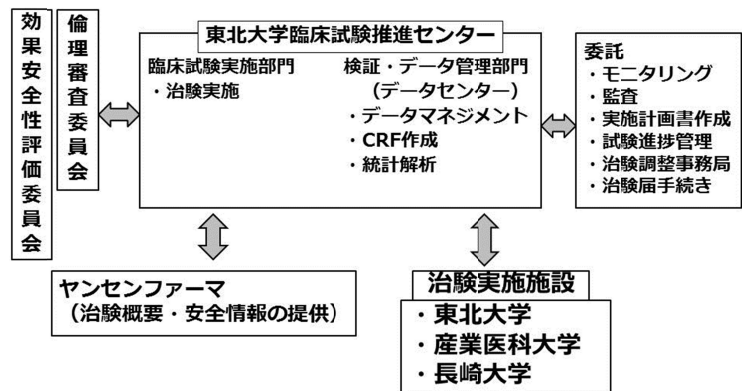
- 1) 東北大学および治験参加施設の治験審査委員会（IRB）の承認を得る。
- 2) 被験者については連結可能匿名化を行う。
- 3) 被験者に対しては説明文書を用いて試験の意義、目的、方法等の内容を説明し、文書による同意を得てインフォームドコンセントを行う。

なお、以下の点を明記し人権擁護に配慮する。

- ・参加は自由意志に基づくこと、
- ・同意の撤回は可能であること、
- ・同意を撤回しても何ら不利益を受けないこと、
- ・試料等の取り扱いについて、
- ・結果の公表について

また、実験動物については、動物実験等の実施に関する基本指針にのっとり実験を進める。

難治性SLEに対するボルテゾミブの有効性・安全性探索試験実施体制



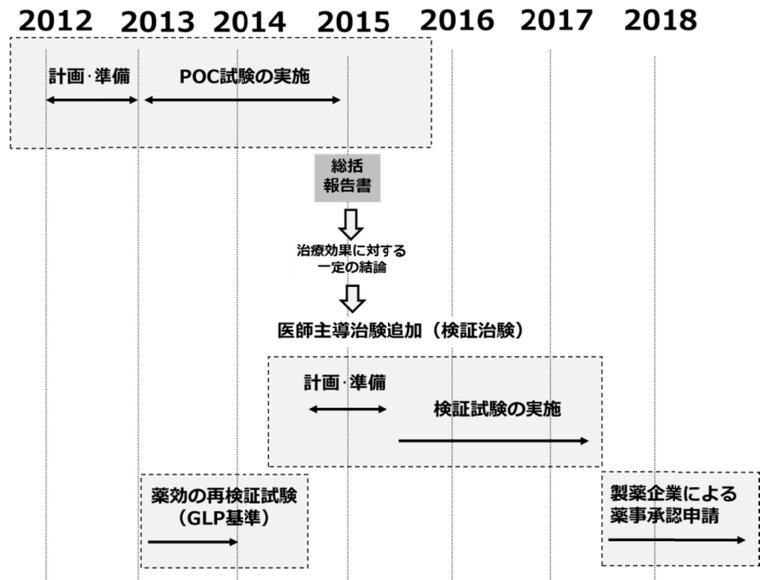
C. 結果

平成25年度

1) 治験実施

ボルテゾミブのSLEに対する薬事承認までのロードマップは右の通りである。この中で本研究は最初のPOC試験の実施に該当する。

本研究では平成25年度-26年度の2年間で14例のSLE患者を対象にボルテゾミブの有効性・安全性探索試験を行う。本治験



がPhaseIIaのPOC試験であることから当初単アーム20例の治験を予定していたが、PMDAの強い要請により、治験プロトコールは実薬7例、プラセボ7例を目標症例数とするRCTとなった。東北大学、長崎大学、産業医科大学のIRB承認を得た後、7月22日にPMDAに治験届を提出した（難治性全身性エリテマトーデスに対するボルテゾミブの有効性・安全性探索試験：第II相多施設共同プラセボ対照無作為化二重盲検並行群間比較試験：UMIN試験ID UMIN000012227）。9月に東北大学で、10月に長崎

大学、11月に産業医科大学でスタートアップミーティングを開催した。11月に東北大学で患者エントリーが開始され、25年度末現在、8名の治験が進行中であり、さらに1名のスクリーニング中である。

これまでの研究の流れを右に示す。

これまでの流れ

	2012	2013	2014
PMDA	4月6日 薬事戦略事前面談 10月11日 薬事戦略事前面談	2月15日 薬事戦略相談対面助言	7月22日 治験届提出 難治性全身性エリテマトーデスに対するボルテゾミブの有効性・安全性探索試験：第II相多施設共同プラセボ対照無作為化二重盲検並行群間比較試験
班会議 (スタートアップ含む)	12月22日 合同班会議 コンセプト承認、プロトコール作成	4月20日 合同班会議 治験実施打ち合わせ	9月12日東北大学 スタートアップ 11月18日産業医科大学 スタートアップ 10月7日長崎大学 スタートアップ
IRB承認		6月24日東北大学 8月12日産業医科大学 8月16日長崎大学	
Patient -in			10月25日第一例目 同意取得 11月8日第一例目 投与開始 1月27日時点 同意取得10例 投与中1例 投与後観察期間6例

本治験の概要は以下の通りである。

試験デザイン：

多施設共同プラセボ対照無作為化二重盲検並行群間比較試験

選択基準：

難治性SLEとしての症例選択は以下の条件を満たす患者とする。

- 1)20 歳以上65 歳未満の患者（同意取得時）
- 2)アメリカリウマチ協会（ACR）クライテリア11項目中4項目を満たすもの
- 3)一日あたりプレドニゾン換算10mg以上のステロイドホルモン製剤を6か月以上継続して使用している。
- 4)一剤以上の免疫抑制剤*の使用歴がある、あるいは現在も一剤以上の免疫抑制剤を併用している。
- 5)SLENA SLEDAIスコアにて6点以上31点以下である
- 6)投与開始前28日以内の検査で免疫学的活動性を有する。
（抗dsDNA IgG抗体 13IU/ml以上）

投与スケジュール：

多発性骨髄腫で承認されている投与量(1.3mg/m²)、投与方法(d1, 4, 8, 11の4回投与、2週間の休薬で1コース)を基本とする。

良性疾患であるSLEを対象とすること、多発性骨髄腫に対する治療においてボルテゾミブの治療効果が1カ月で発現することから、治療サイクルは2コースと限定し治療効果を評価する。

主要評価項目：

投与開始より24週後におけるdsDNA抗体価の低下。

副次評価項目：

投与開始より12週後、24週後における以下の項目とする。

1. 抗dsDNA抗体の低下、補体の上昇
2. 治療反応率 SLEDAI response index (SRI) *
3. BILAG AまたはBの臓器障害スコアの改善度
4. SLICC/ACR damage indexによる臓器障害度の変化
5. プレドニン投与量の変化率

* SRIに関しては以下の全てを満たす症例を治療反応があった症例として定義した。

1. SLENA SLEDAI 4点以上の改善
2. 医師によるPGAで悪化なし
3. BILAG A 1項目あるいはBILAG B2項目の出現がない

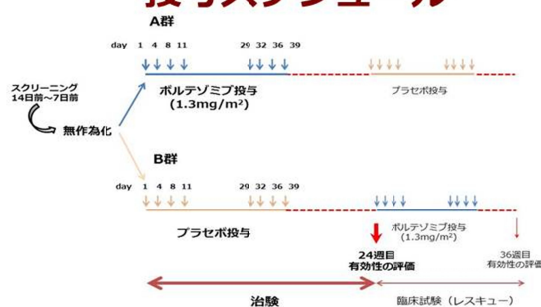
なお、プラセボ群に対し実薬を投与する2nd phaseを設ける必要があるが、PMD Aとの協議の結果、研究期間、研究費を考慮しこのphaseについては臨床試験として実施し、治験の評価は1st phaseをもってすることとなった。右に投与プロトコルを示す。

投与プロトコル

Day	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	28
ボルテゾミブ (皮下注) 1.3mg/m ² または プラセボ	○			○				○			○	

ボルテゾミブ1.3 mg/m²またはプラセボを週2回 day1, 4, 8, 11に投与し17日間休薬する。この28日を1サイクルとして皮下注射にて投与を行う。

投与スケジュール



目標症例数 7例 x 7例

このPOC試験によって、臨床症状を中心とした評価に関して前向きな情報が得られた場合、薬事承認を目指して、さらに次なる検証試験を行う予定である。

2) SLE モデルマウスに対するボルテゾミブ薬効の再検証

ループモデルマウスである MRL/lpr マウスに 14 週齢より以下の薬剤投与を行った。コントロール(Con) ボルテゾミブ 150ug/kg 週 2 回皮下注(150Bz) ボルテゾミブ 750ug/kg 週 2 回皮下注(750Bz) シクロフォスファミド 1mg/body2 週に 1 回腹腔内注(Cyc)

22 - 23 週齢に脾臓/腋窩リンパ節重量測定、腎病理スコアリング（系球体腎炎、腎血管炎）、フローサイトメトリー、血清抗 dsDNA 抗体活性の測定を行った。ボルテゾミブ 750ug/kg、シクロフォスファミド投与群において有意に脾臓、腋窩リンパ節重量が低下した(Fig. 1)。系球体腎炎、腎血管炎の病理学的スコアも低いこれら薬剤投与群において低下傾向にあった(Fig. 2)。フローサイトメトリーにより、脾臓、骨髄中の形質細胞 (IgL-kappa⁺⁺CD138⁺) を測定したところ、ボルテゾミブ 750ug/kg 投与群において顕著に形質細胞の低下が認められた(Fig. 3)。また、ボルテゾミブ 750ug/kg 投与により有意に血清抗 dsDNA 抗体活性の低下が認められた(Fig. 4)。以上の結果からボルテゾミブは、主に抗体産生細胞である形質細胞を障害し、抗 dsDNA 抗体を減じることにより系球体腎炎に対する治療効果があると考えられた。

D. 考察

SLE は皮膚、関節、中枢神経、腎臓など多臓器障害を伴う代表的自己免疫疾患で、自己抗体産生等の免疫異常が病態を形成している。根本的治療はなく、長期にわたるステロイド剤による治療を余儀なくされ、感染症・動脈硬化・骨粗鬆症等合併症により長期的予後は不良である。発症ピークが平均余命が長い 20 - 30 歳代であることを考えると、良性疾患とは決して予後良好な疾患とは言えない。本疾患患者における長期ステロイド投与の回避や制御不良例に対する治療としてステロイド以外の治療薬が必要であるが、SLE ではその選択肢が乏しく新規治療法の開発が強く望まれている。更に、生命予後のみならず重要臓器に起こった臓器障害はその後の QOL を大幅に低下させ、個人の問題のみでなく社会的コストの増大も招いている。SLE の長期的予後を改善させるためには、速やかな疾患制御を達成でき、更にステロイドの必要量を大きく減らす事を可能とする強力な選択的免疫抑制剤の存在が必要である。このような目的で、シクロホスファミド(CPA)パルス療法、経口アザチオプリン(AZA)、ミゾリピン、タクロリムス療法が積極的に広く行われているが全ての症例で目的を達するには至っていない。

SLE は多彩な自己抗体の産生とそれら抗体の臓器沈着にともなう障害が病態の主体である。したがって SLE の特異的治療として、自己抗体産生を長期に渡り、かつ、効果的に阻止するために B 細胞から形質細胞に至る抗体産生細胞の制御が有用であることが期待される。ボルテゾミブは可逆的かつ特異的なプロテアソーム阻害薬であり、多発性骨髄腫に対する有効性が確立している。ボルテゾミブのプロテアソーム阻害によるユビキチン化タンパクの蓄積は、小胞体ストレスを誘導し (UPR: unfold protein response) アポトーシスを惹起するが、免疫グロブリンをはじめとするタンパク質合成の盛んな形質細胞は UPR を起こしやすく、このため他の細胞よりプロテアソーム阻害剤の感受性が高い。このようなボルテゾミブの作用機序から、多発性骨髄腫だけでなく、自己免疫疾患をはじめとする抗体関連型良性疾患に対しても、ボルテゾミブが有効であることが予想される。実際に、ボルテゾミブの投与により、SLE およびループス腎炎モデルマウスにおいて UPR 活性化により dsDNA 抗体を産生する形質細胞が消失し、ループス腎変の発症が抑制され、生存期間が延長することが報告されている。また、腎移植拒絶症例において、ボルテゾミブは抗胸腺グロブリン、Rituximab に比べ、拒絶反応の原因である抗 HLA 抗体を産生する形質細胞を有意に高くアポトーシスへと導くことが確認されている。

これらの背景をもとに SLE における臨床的課題を解決するために、難治性 SLE に対するボルテゾミブの有効性・安全性探索試験を計画した。腫瘍性疾患に対する薬剤を良性疾患である SLE に対し用いる倫理的妥当性・安全性については、すでにアルキル化剤であるシクロホスファミドが LN に対し承認されていること、ボルテゾミブがいわゆる従来抗がん剤ではなく分子標的薬であること、また多発性骨髄腫に対

する治療プロトコールより少ない投与コース数を設定することにより担保されると考えている。

本計画は血液疾患に使われているボルテゾミブを自己免疫疾患に投与する計画であり、その使用については実際に投与経験がある施設が主導することが望ましいが、東北大学血液免疫科は、実臨床で数多くの多発性骨髄腫の診療を行っており、薬剤の特性について熟知しているだけでなく、ボルテゾミブを用いた移植非適応多発性骨髄腫患者を対象とした多施設共同、ランダム化第 II 相比較試験（UMIN No.3472）を行っており、同剤を用いた臨床研究の実績を有している。同時に、自己免疫疾患の診療では東北地方で最も多い治療実績がある。この血液・免疫両方の疾患の治療実績を有する東北大学血液免疫科が中心となり、日本における自己免疫疾患診療科として屈指の 2 施設である産業医科大学と長崎大学が行う本研究の成果は新たな SLE 治療のエビデンスとなるものと思われる。また、東北大学病院、長崎大学病院、産業医科大学病院の 3 施設において医師主導治験が行われることにより、多施設共同の医師主導治験の体制が構築されることになり、日本の新薬開発において大きな実績となることが期待できる。

E. 結論

医師主導治験である「難治性全身性エリテマトーデスに対するボルテゾミブの有効性・安全性探索試験：第Ⅱ相多施設共同プラセボ対照無作為化二重盲検並行群間比較試験」を開始した。現在のところ順調に症例のエントリーが進んでおり、平成26年度末までに治験を終了し、総括を行う予定である。

F. 健康危険情報

治験における有害事象については、治験プロトコールに従い効果安全評価委員会を適宜開催するとともにPMDAへの報告を行っている。

G. 研究発表

1. 学会発表

小林浩子、石井智徳、浦田幸朋、高橋裕一、平林泰彦、泉山朋政、無量井泰、竹森弘光、浅野智之、齊藤理恵、鈴木英二、岩館治代、渡辺浩志、**張替秀郎**、大平弘正、佐々木毅

東北地方における免疫抑制療法後の B 型肝炎ウイルス再活性化前向き調査研究中間報告

第57回日本リウマチ学会総会・学術集会 2013/04/18-20 京都

2. 論文発表

- 1) Shirai T1, Fujii H, Saito S, Ishii T, Yamaya H, Miyagi S, Sekiguchi S, Kawagishi N, Nose M, **Harigae H.**

Polyarteritis nodosa clinically mimicking nonocclusive mesenteric ischemia.

World J Gastroenterol. 2013 Jun 21;19(23):3693-3698.

- 2) Shirai T, Fujii H1, Ono M, Watanabe R, Shirota Y, Saito S, Ishii T, Nose M, **Harigae H.**

A novel autoantibody against ephrin type B receptor 2 in acute necrotizing encephalopathy.

J Neuroinflammation. 2013 Oct 18;10:128.

- 2) 浦田幸朋、小林浩子、石井智徳、高橋裕一、平林泰彦、泉山朋政、無量井泰、竹森弘光、浅野智之、齊藤理恵、鈴木英二、岩館治代、渡辺浩志、**張替秀郎**、大平弘正、佐々木毅

東北地方における B 型肝炎再活性化前向き研究について

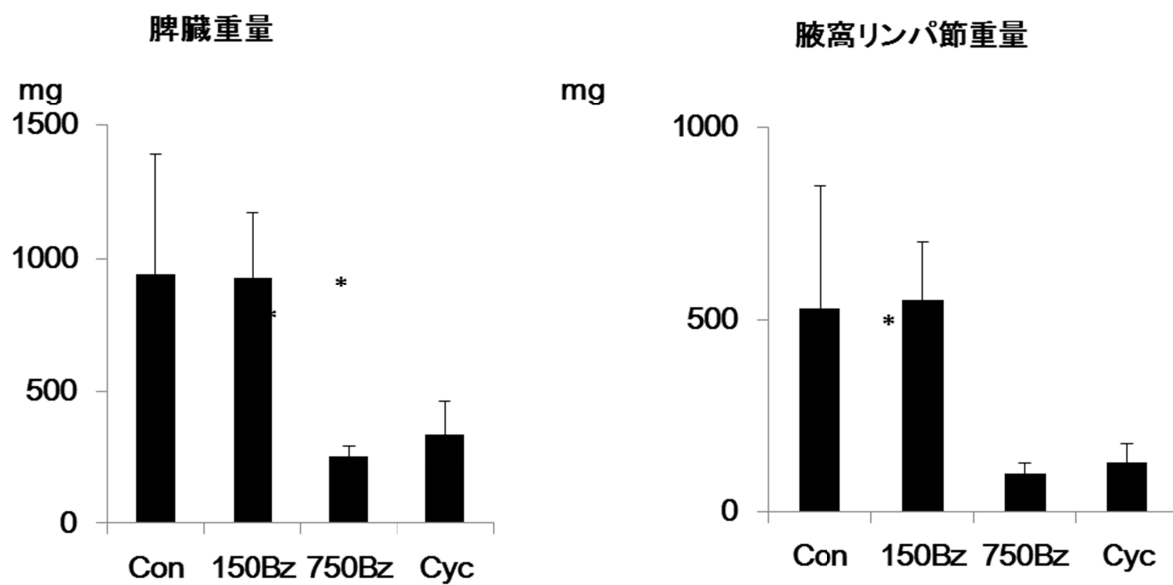
最新医学 68(3) p395-402 2013.3

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

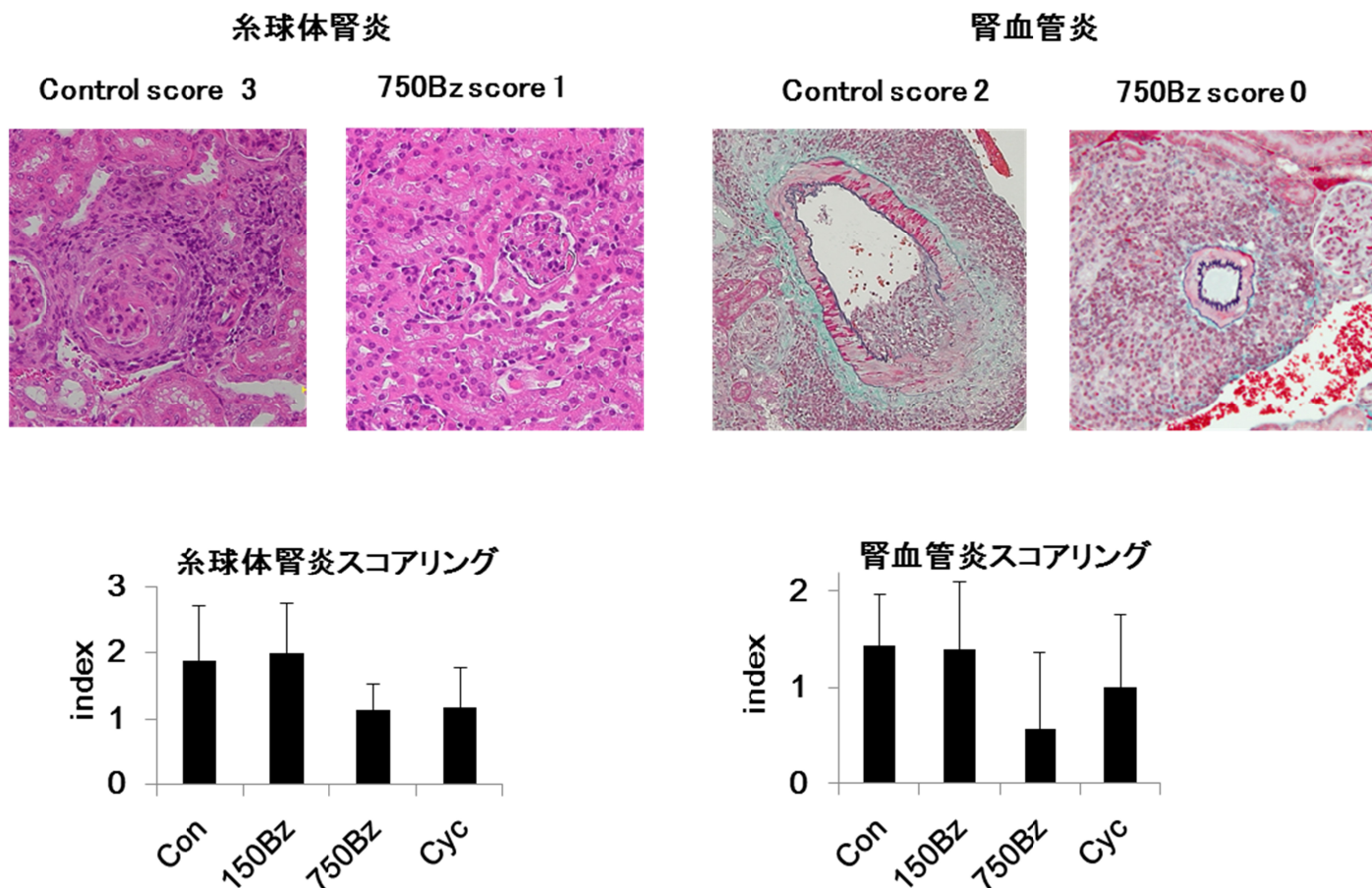
Fig.1

ボルテゾミブ、シクロフォスファミド投与後の脾臓、腋窩リンパ節の重量



マウスをサクリファイスし、脾臓重量、左右腋窩リンパ節の重量測定を行った。
ボルテゾミブ750ug/kg、シクロフォスファミド投与群において有意に臓器重量が低下した
(* p<0.05)。

Fig. 2 ボルテゾミブ、シクロフォスファミド投与による腎病変に対する効果



腎臓組織標本（HE染色、EM染色）を作成し、系球体腎炎、腎血管炎レベルをスコアリング：

系球体腎炎のスコアリング

系球体中の赤血球や好中球、メサンギウム細胞の増加、構築の乱れにより0-3に分類

0;正常,1;メサンギウム細胞、赤血球が増加するが、管腔が保たれている。

2;分葉化。好中球、マクロファージ、メサンギウム細胞増加

3;管外増殖性,マクロファージ増加。ボウーマン囊の外側に炎症波及

20個の系球体病変を0-3に分類し、50%以上を占めるスコアを各マウスのindexとする。

腎血管炎のスコアリング

0;血管周囲の単核球浸潤。外位弾性板破壊無し。

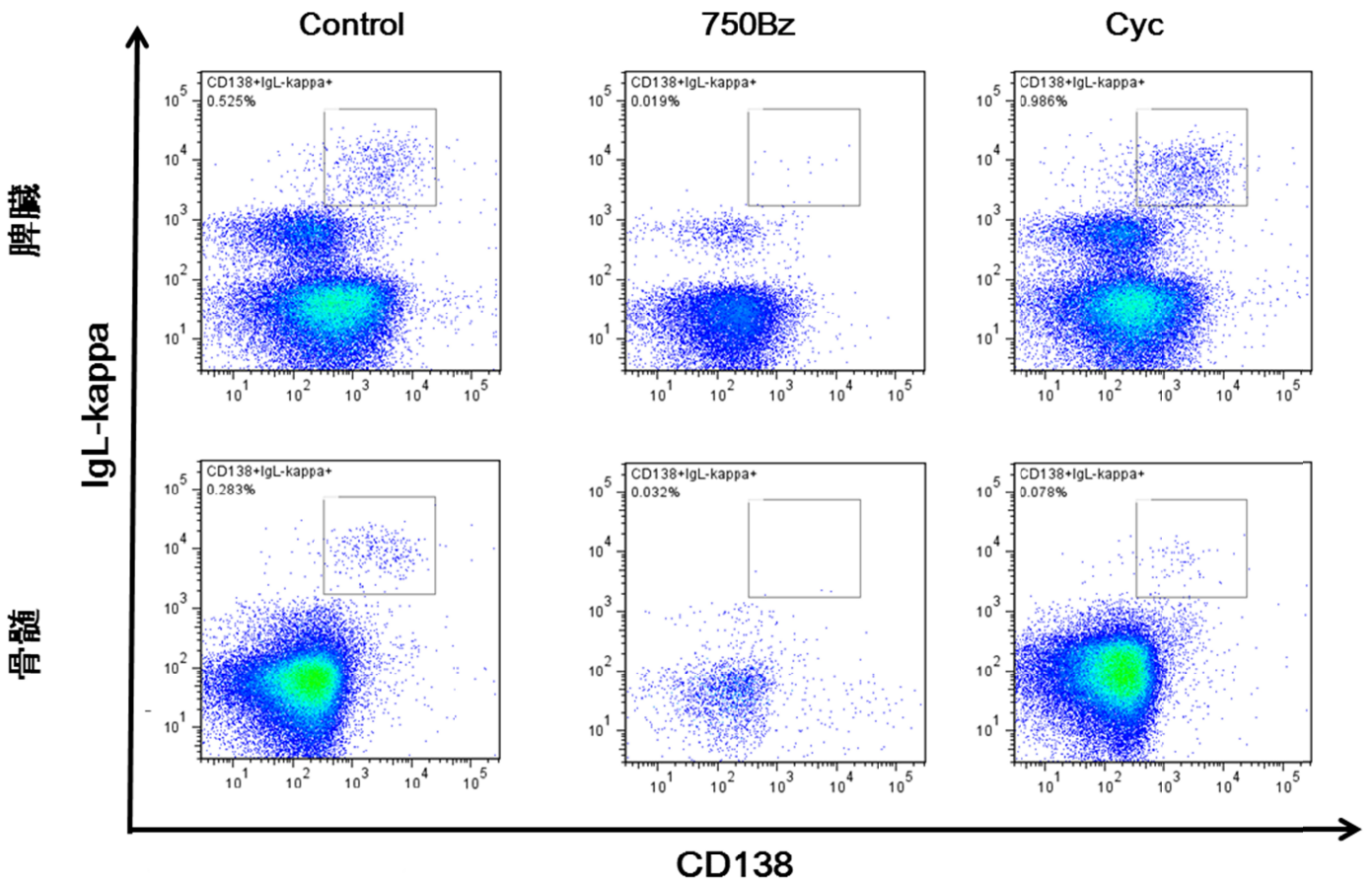
1;腎動脈血管炎。核細胞の蓄積顕在化。小肉芽腫近傍に外位弾性板の破壊あり。

2;スコア2の病変に追加して、筋内膜細胞増殖に動脈の内膜肥厚。

腎動脈20個を0-2に分類し、最大のものを各マウスのindexとする。

ボルテゾミブ750ug/kg、シクロフォスファミド投与群において、腎病変のスコアリングが低い傾向にあった。

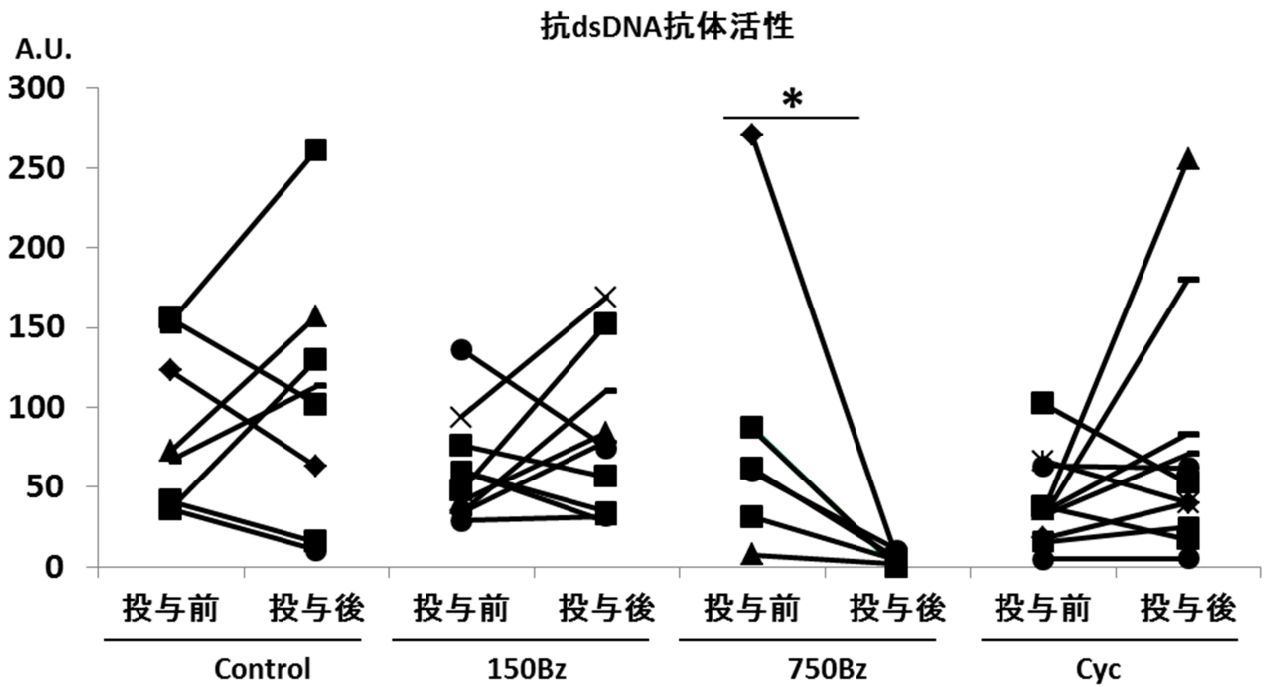
Fig. 3



マウスをサクリファイス後、脾臓細胞、骨髄細胞のCD138, IgL-kappa (細胞内) の発現をフローサイトメトリーにて解析を行った。ボルテゾミブ750ug/kg投与群において顕著に形質細胞 (CD138+IgL-kappa++)は顕著に減少した。

Fig. 4

ボルテゾミブ、シクロフォスファミドによる血清抗dsDNA抗体活性の変化



薬剤投与前後の血清抗dsDNA抗体活性をELISAにて測定した。リファレンス血清を用いてarbitrary unit (A.U.)を算出した。

ボルテゾミブ750ug/kg投与群において有意に抗dsDNA抗体活性が低下した。

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合事業）
分担研究報告書

難治性 SLE に対するボルテゾミブ療法の有効性・安全性検証試験

B 細胞を標的とした全身性エリテマトーデスの治療の開発に関する研究

研究分担者 田中良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授
研究協力者 中山田真吾 同 学内講師
研究協力者 久保智史 同 助教

研究要旨：全身性エリテマトーデス（SLE）の発症過程には、B 細胞の自己抗体産生による多臓器障害が生ずる。しかし、病態を形成する B 細胞の分化と機能の詳細は不明である。平成 24 年度は、抗 CD20 抗体リツキシマブによる B 細胞標的治療の問題点を明らかにすることを目的とし、治療不応性、あるいは、治療後に再燃する症例では IgD⁺CD27^{high} 形質細胞も再燃とともに末梢血中に検出されることが示された。平成 25 年度は、SLE における活性化 B 細胞サブセット、形質細胞の質的異常を明らかにすることを目的とした。その結果、活動期の SLE の末梢血では、CD3⁺CD19⁺CD27⁺CD38⁺の形質細胞が、健常者の 5-6 倍も著増していた。活動期の SLE では CXCR5 陰性 CXCR3 陽性の effector memory B 細胞が疾患特異的に出現していた。このサブセットの割合は B 細胞を刺激する Tfh 細胞の活性化と相関し、Tfh 細胞が産生する IL-21 と IFN- γ の刺激が B 細胞の分化誘導とエフェクター機能を強力に誘導していた。以上から、SLE 患者の末梢血では、B 細胞は Tfh 細胞からの刺激を受容し、CXCR5 の減弱と CXCR3 の増強を介してリンパ組織から標的臓器へ遊出して、エフェクター機能を発揮するとともに、形質細胞への分化が亢進している可能性が示された。これらの結果より、形質細胞を主要な標的としたボルテゾミ

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス（SLE）は代表的な膠原病で、20～30 歳代の女性に好発し、本邦でも約 10 万人の患者数が推定される。SLE の発症過程には、B 細胞の自己抗体産生による多臓器障害が生ずる。平成 24 年度は、抗 CD20 抗体リツキシマブによる B 細胞標的治療の問題点を明らかにすることを目的とし、治療不応症例、治療後に再

燃する症例では IgD⁺CD27^{high} 形質細胞も再燃とともに末梢血中に検出されることが示された。平成 25 年度は、SLE における活性化 B 細胞サブセット、形質細胞の質的異常を明らかにすることを目的とし、B 細胞のサブセット分類を試み、その誘導機構と病的意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

健常人、RA 患者、SLE 患者より末梢血を採取し、8 カラーフローサイトメトリー (FACSVerse)を用いて、T 細胞、B 細胞のケモカイン受容体などによる細分類を試み、各サブセット間および患者背景との相関を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRBで承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

C. 研究結果

(1) 疾患活動性の高い SLE 患者末梢血では、IgM memory B 細胞の割合が減少し、 $CD19^+IgD^-CD27^+$ effector memory B 細胞と $CD19^+CD27^+CD38^+$ plasmablast の割合が増加した。

(2) SLE 患者 B 細胞では、健常人と比し CXCR5 の発現が有意に減少した。また、CXCR5 陰性 CXCR3 陽性の effector memory B 細胞が有意に増加し、疾患活動性と相関した。

(3) SLE 患者 T 細胞では $CD4^+CD45RA^-CCR7^-$ effector T 細胞と $CD4^+CD45RA^-CXCR5^+$ 濾胞性ヘルパー T (Tfh)細胞の割合が増加した。

(4) CXCR5 陰性 CXCR3 陽性の effector

memory B 細胞の割合は、末梢血活性化 Tfh 細胞の割合と正の相関を認めた。

(5) SLE 患者の末梢血では、 $CD3^-CD19^+CD27^+CD38^+$ の形質細胞の割合が 42.3%と、健常者の 5-6 倍も著増していた。

D. 考察

SLE 患者 B 細胞では、memory B 細胞の増加が特徴的であるが、その機能と分化の機序は不明であった。今回の検討により、活動期の SLE では CXCR5 陰性 CXCR3 陽性の effector memory B 細胞が疾患特異的に出現すること、このサブセットの割合が B 細胞を刺激する Tfh 細胞の活性化と相関することが示された。また、そのメカニズムとして、Tfh 細胞が産生する IL-21 と IFN- γ の刺激が B 細胞の分化誘導とエフェクター機能を強力に誘導する可能性が考えられた。即ち、B 細胞は Tfh 細胞からの刺激を受容し、CXCR5 の減弱と CXCR3 の増強を介してリンパ組織から標的臓器へ遊出して、エフェクター機能を発揮するものと考えられる。その結果、

$CD3^-CD19^+CD27^+CD38^+$ 形質細胞への分化がさらに亢進し、自己抗体の過剰産生を齎している可能性が示された。

以上より、SLE のような自己反応性 B 細胞の活性化、長期生存形質細胞の増加、自己抗体産生の増加を病態の基本とする疾患の制御では、形質細胞の制御が重要な鍵を握る可能性が示唆される。ボルテゾミブは、形質細胞を主要標的とし、既に多発性骨髄腫に対

して承認されている経口薬剤であるが、上記のような病態を示す難治性 SLE に対する応用が期待される。難治性 SLE に対するボルテゾミブ療法の有効性・安全性検証試験の可及的速やかな実施が期待される。

E . 結論

SLE 患者の末梢血では、B 細胞は Tfh 細胞からの刺激を受容し、CXCR5 の減弱と CXCR3 の増強を介してリンパ組織から標的臓器へ遊出して、エフェクター機能を発揮するとともに、形質細胞への分化が亢進している可能性が示された。これらの結果より、形質細胞を主要な標的としたボルテゾミブの難治性 SLE に対する検証試験の速やかな実施が期待される。

F. 研究発表

1.論文発表

1. Tanaka Y, Hirata S. Is it possible to withdraw biologics from therapy in rheumatoid arthritis?
Clinical Therapeutics (in press)
2. Tanaka Y, Hirata S, Kubo S, Fukuyo S, Hanami K, Sawamukai N, Nakano K, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamura F, Saito K.
Discontinuation of adalimumab after achieving remission in patients with established rheumatoid arthritis: 1-year outcome of the HONOR study. Ann Rheum Dis (in press)
3. Kubo S, Yamaoka K, Kondo M, Yamagata K, Zhao J, Iwata S, Tanaka Y. The JAK inhibitor

tofacitinib reduces the T cell stimulatory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. Ann Rheum Dis (in press)

4. Kondo M, Yamaoka K, Sonomoto K, Fukuyo S, Oshita K, Okada Y, Tanaka Y. IL-17 inhibits chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Plos ONE (in press)
5. Tanaka Y. Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal? Ann Rheum Dis (2013) 72, ii124-ii127
6. O’Shea JJ, Kontzias A, Yamaoka K, Tanaka Y, Laurence A. Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. Ann Rheum Dis (2013) 72, ii111-
7. Tanaka Y, Hirata S, Saleem B, Emery P. Discontinuation of biologics in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol (2013) 31 (Suppl.78): S22-S27
8. Kameda H, Kanbe K, Sato e, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, Takeuchi T. A merged presentation of clinical and radiographic data using probability plots in a clinical trial, the JESMR study. Ann Rheum Dis (2013) 72, 310-312
9. van der Heijde D, Tanaka Y, Fleischmann R, Keystone E, Kremer

- J, Zerbini C, Cardiel MH, Cohen S, Nash P, Song YW, Tegzová D, Wyman BT, Gruben D, Benda B, Wallenstein G, Krishnaswami S, Zwillich SH, Bradley JD, Connell CA and the ORAL Scan investigators. Tofacitinib (CP-690,550) in patients with rheumatoid arthritis on methotrexate: 12 month data from a 24 month Phase 3 randomized radiographic study. *Arthritis Rheum* (2013) 65: 559-570
10. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. Persistent memory B cell down-regulation after 6-year remission induced by rituximab therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* (2013) 22, 538-540
3. Tanaka Y. A potential of human mesenchymal stem cells for the treatment of Rheumatoid Arthritis. The First ARISE WITH APLAR. Seoul, Korea. 平成 25 年 9 月
4. Tanaka Y. Certolizumab pegol and biologics for the treatment of rheumatic diseases. 12th International symposium on Sjögren's syndrome. Kyoto, Japan 平成 25 年 10 月
5. Tanaka Y, Emoto K, Tsujimoto M, Schlichting DE, Macias W. 12-week results of a phase 2b dose-ranging study of baricitinib, an oral JAK1/JAK2 inhibitor in Japanese patients with rheumatoid arthritis on background methotrexate therapy. ACR 2013. San Diego, USA. 平成 25 年 10 月

2.学会発表

1. Tanaka Y, Hirata S. Novel multi-biomarkers for estimating disease activity in rheumatoid arthritis. The 22nd International Rheumatology Symposium . Tokyo, Japan 平成 25 年 4 月
2. Tanaka Y. The Development of Anti-TNF Agents in Rheumatoid Arthritis. EAGOR2013, The 5th East Asian Group of Rheumatology (symposium). Seoul, Korea. 平成 25 年 5 月
6. Tanaka Y, Yamanaka Y, Ishiguro N, Miyasaka N, Kawana K, Kubo T, Kuroki A, Takeuchi T. Clinical remission after 52 weeks of treatment is a predictor of adalimumab-free disease control in patients with early rheumatoid arthritis: Hopeful 2 Study. ACR 2013. San Diego, USA. 平成 25 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
該当無し

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合事業）
分担研究報告書

難治性 SLE に対するボルテゾミブ療法の有効性・安全性検証試験

SLE における P 糖蛋白質発現リンパ球の治療抵抗性および組織病態への
関与に関する研究

研究分担者 齋藤和義 産業医科大学医学部第 1 内科学講座 准教授

研究要旨：SLE に対する薬物療法に於いて、薬剤抵抗性は重要な問題点である。これまで、SLE 患者リンパ球に於ける多剤抵抗性遺伝子産物 P-糖蛋白質の発現と薬剤抵抗性との関連性を検討し、P 糖蛋白質は、活動期 SLE の疾患活動性上昇に伴ってリンパ球上に発現することを明らかにしてきた。今回、P 糖蛋白質発現細胞の組織での病態形成への関与および B リンパ球を標的とした治療の抵抗性解除への有用性を検討した。P-gp⁺CD69⁺CD4⁺ cell は疾患活動性に従って増加し、ステロイド(CS)不応例、増殖性腎炎、NPSLE 合併例で増加を認めた。難治性増殖性腎炎症例では腎間質への P-gp⁺CD4⁺ cell 集簇を認めた。ステロイドに免疫抑制剤併用を行っても多臓器病変が進行し、リンパ球上 P 糖蛋白質発現量が 1000molecules/cell 以上かつ P 糖蛋白質高発現する症例に Rituximab 投与（500mg/body を 1 週間間隔で反復 4 回点滴静注）を行い、Rituximab 投与開始後、尿蛋白は速やかに消失して疾患活動性は低下しはじめ、末梢血中 B cell が消失したのみならず、CD4⁺ T cell における P 糖蛋白質高発現サブグループは消失した。以上から、SLE 患者における B 細胞標的療法は多剤治療抵抗性の側面からも有用であると考えられた。SLE においては形質細胞への分化が亢進している可能性が示されており、形質細胞を主要な標的としたボルテゾミブも難治性 SLE における治療抵抗性の解除をもた

A. 研究目的

SLE に対する薬物療法に於いて、薬剤抵抗性は重要な問題点である。薬剤抵抗性は、長期間の薬剤投与による薬剤耐性（二次無効）疾患活動性が高いために薬剤に反応しない薬剤不応性に大別される。これまで、SLE 患者リンパ球に於ける多剤抵抗性遺伝子産物 P-糖蛋白質の発現と薬剤抵抗性との関連性を検討した。薬剤の細胞外排出によって治療抵抗

性を齎す P 糖蛋白質(P-gp)は、活動期 SLE の疾患活動性上昇に伴ってリンパ球上に発現する。しかし、B リンパ球を標的とした治療の抵抗性解除への有用性および P 糖蛋白質発現細胞の組織での病態形成への関与は不明である。今回、リツキシマブによる治療抵抗性の克服および P-gp 発現細胞の組織における役割を検討した。

A. 研究方法

SLE 患者末梢血リンパ球上の P 糖蛋白、細胞機能分子の発現はフローサイトメーターで、残りのリンパ球でそのステロイド排泄能を指標とした薬剤排出能を評価した。(リンパ球に *in vitro* で dexamethasone を添加して細胞内外に均一に拡散する ¹⁴C label Butanol をバックグラウンドとして細胞内に残留する ³H label dexamethasone の medium に対する比を算出した。)また、組織浸潤リンパ球は免疫組織染色で評価した。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRBで承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入所機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

B. 研究結果

健常人に比して SLE では P-gp, CD69 は有意に発現増強した。P-gp は CD69+CD4+cell に有意に高発現した。P-gp+CD69+CD4+cell は疾患活動性に従って増加し、ステロイド(CS)不応例、増殖性腎炎、NPSLE 合併例で増加を認めた。難治性増殖性腎炎症例では腎間質への P-gp+CD4+cell 集簇を認めた。ステロイドに免疫抑制剤併用を行っても多臓器病変が進行し、リンパ球上 P 糖蛋白質発現

量が 1000molecules/cell 以上かつ P 糖蛋白質高発現する症例に Rituximab 投与 (500mg/body を 1 週間間隔で反復 4 回点滴静注) を行い、P 糖蛋白質発現に及ぼす効果を評価した。ステロイド増量と IVCY を併用したが、疾患活動性改善乏しく、1.0 g/日を超える高度な蛋白尿持続、BILAG A1 /B2 項目 (15 points) と多臓器病変合併、B cell 上 P 糖蛋白質発現量は低下しても依然 1000 molecules/cell を超えたままで、かつ、P 糖蛋白質高発現リンパ球が消失せず、リンパ球からのステロイド排出は亢進して細胞内残留ステロイド濃度は低下していた。

Rituximab 投与開始後、尿蛋白は速やかに消失して疾患活動性は低下しはじめ、末梢血中 B cell が消失したのみならず、CD4+ T cell における P 糖蛋白質高発現サブグループは消失した。

C. 考察

P-gp+CD69+CD4+cell は薬剤抵抗性かつ臓器侵襲を齎しうるサブセットと考えられ、その制御が治療抵抗性克服に重要である。末梢血リンパ球上 P-gp 発現は治療抵抗性とリンパ球の臓器浸潤を反映し、治療選択において有用な指標となり得る。

また、多剤抵抗性症例に Rituximab 投与が奏効する場合、B 細胞の消失に伴い T 細胞活性化も抑制され、かつ治療抵抗性がリセットされる可能性が示唆された。

Rituximab は難治性病態の改善のみならず、治療反応性の回復を齎し、長期寛解維持を可能としうる。

E . 結論

以上から、SLE 患者における B 細胞標的療法は多剤治療抵抗性の側面からも有用であると考えられた。SLE においては形質細胞への分化が亢進している可能性が示されており、形質細胞を主要な標的としたボルテゾミブも難治性 SLE における治療抵抗性の解除をもたらす可能性が示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

11. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y. Persistent memory B cell down-regulation after 6-year remission induced by rituximab therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 22(5):538-540, 2013

2. 学会発表

1. Saito K, Hanami K, Hirata S, Kubo S, Nawata M, Yamaoka K, Nakayamada S, Nakano K, Tanaka Y.

Comparison of lipid profile including high molecular weight adiponectin (HMW-AN) after treatment with three different biologics in the patients with bio-naïve rheumatoid arthritis (RA)

The 14th Annual European Congress of Rheumatology(EULAR)

2013 年 6 月 Madrid, Spain

2. Saito K.

Best use of infliximab in autoimmune disease

12th International Symposium on Sjogren's syndrome (Morning Seminar)

2013 年 10 月 Kyoto, Japan

3. Tsujimura S, Saito K, Tanaka Y.

The expression of P-glycoprotein on CD4+CXCR3+ cells and its relevance to tissue damage in patients with SLE

第 42 回 日本免疫学会

2013 年 12 月 千葉

4. Nakayamada S, Kubo S, Yunoue N, Yoshikawa M, Sheau-Pey Wang, Saito K, Tanaka Y.

Involvement of transitional T follicular like helper cells bearing triple phenotypes of Tfh/Th1/Th17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

第 42 回 日本免疫学会

2013 年 12 月 千葉

5. Yunoue N, Nakayamada S, Kubo S, Yamaoka K, Saito K, Tanaka Y

Phenotypic heterogeneity between Tfh cells and Th1 cells induced by interleukin-12- and interferon- γ -mediated signaling in human T cells

第 42 回 日本免疫学会

2013 年 12 月 千葉

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合事業）
分担研究報告書

難治性 SLE に対するボルテゾミブ療法の有効性・安全性検証試験

ループス腎炎の podocyte における CD86 分子を介した蛋白尿発現メカニズム
に関する研究

研究分担者 川上 純 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座（第一内科） 教授
研究協力者 一瀬邦弘 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座（第一内科） 助教

研究要旨：ループス腎炎におけるポドサイトはバリア機能を有し、蛋白尿発現との関連が示唆されている。以前、プロテアーゼ阻害薬であるボルテゾミブのループス腎炎抑制効果が報告された(Nature Medicine 14, 748 - 755 (2008))が、形質細胞制御が主なメカニズムであり、腎の構成細胞への影響については明らかにされていない。そこで今回、我々は健常人およびループス腎炎患者から分離した IgG を用いて、ヒトのポドサイトと免疫担当細胞の関与について検討した。健常人およびループス腎炎 IgG をインキュベートし、RNA を抽出した。Microarray による Gene Ontology 解析で CD86, CD80, PTPN22, PDE5A, CD47 や MALT1 などの免疫細胞の活性化、ポドサイト障害に関わる分子の発現亢進がループス腎炎 IgG でみられた。ポドサイトにも抗原提示細胞と同様に co-stimulatory pathway を介した免疫活性を有し、ボルテゾミブが形質細胞だけではなく、ポドサイトに直接、機能変化をもたらす可能性が示唆された。

A. 研究目的

SLE 患者の中で、腎障害は症例の約 40～75%に認められ、重要な予後規定因子である。しかし、これまでのところループス腎炎における蛋白尿発現のメカニズムについては明らかにされていない。ループス腎炎におけるポドサイトはバリア機能を有し、蛋白尿発現との関連が示唆されている。

B. 研究方法

今回、我々は健常人およびループス腎炎患者から分離した IgG を用いて、ヒトのポドサイトの cell line (AB8/13)における影響について検討した。健常人およびループス腎炎患者の血清から IgG purification kit を用いて IgG を分離し、IgG をポドサイト とともに 24 時間インキュベートして、Microarray による網羅的遺伝子解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では「全身性エリテマトーデスの病態を多角的に解析する臨床研究」というテーマで長崎大学病院倫理委員会に申請・承認を得て、十分にインフォームドコンセントを行い検体採取している。匿名化された検体を用い、情報管理を厳重に行っているため倫理面での問題はない。

C. 研究結果

Microarray による Gene Ontology 解析では CD86, CD80, PTPN22, PDE5A, CD47 や MALT1 などの免疫細胞の活性化、ポドサイト障害に関わる分子の発現亢進がみられた。

D. 考察

ループス腎炎におけるポドサイトでは抗原提示細胞と同様に co-stimulatory pathway を介した免疫活性を有し、ボルテゾミブが形質細胞だけではなく、ポドサイトにも直接、機能変化をもたらす可能性が示唆された。

E. 結論

ボルテゾミブの SLE、ループス腎炎の病態制御には多彩な免疫学的機序を介した抑制効果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawashiri SY, Ueki Y, Terada K, Yamasaki S, Aoyagi K, Kawakami A. Improvement of plasma endothelin-1

and nitric oxide in patients with systemic sclerosis by bosentan therapy. *Rheumatol Int.* 34 (2): 221-5, 2014.

- 2) Kuriya G, Uchida T, Akazawa S, Kobayashi M, Nakamura K, Satoh T, Horie I, Kawasaki E, Yamasaki H, Yu L, Iwakura Y, Sasaki H, Nagayama Y, Kawakami A, Abiru N. Double deficiency in IL-17 and IFN- γ signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia.* 56 (8): 1773-1780, 2013.
- 3) Kobayashi M, Kaneko-Koike C, Abiru N, Uchida T, Akazawa S, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Ida H, Kawasaki E, Yamasaki H, Nagayama Y, Sasaki H, Kawakami A. Genetic deletion of granzyme B does not confer resistance to the development of spontaneous diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol.* 173 (3): 411-8, 2013.

2. 学会発表

- 1) 川尻真也, 中島好一, 竇來吉朗, 鈴木貴久, 岡田覚丈, 中島宗敏, 溝上明成, 松岡直樹, 右田清志, 中村英樹, 折口智樹, 青柳 潔, 川上 純 全身性強皮症合併症と血管内皮機能検査およびバイオマーカーの関連の検討 .第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 . 第 22 回国際リウマチシンポジウム . 2013/4/18-4/20 .
- 2) 一瀬邦弘, 牛草 健, 梅田雅孝,

中島好一, 鈴木貴久, 寶來吉朗, 岡田覚丈, 川尻真也, 岩本直樹, 玉井慎美, 中村英樹, 折口智樹, 川上 純. ループス腎炎における Calcium/calmodulin dependent kinase protein type IV のポドサイト機能に対する影響. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013/4/18-4/20.

3) 一瀬邦弘, 梅田雅孝, 中島好一, 鈴木貴久, 寶來吉朗, 岡田覚丈, 川尻真也, 岩本直樹, 玉井慎美, 有馬和彦, 中村英樹, 折口智樹, 川上 純. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus における脳脊髄液中サイトカインプロファイルの検討. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 22 回国際リウマチシンポジウム. 2013/4/18-4/20.

4) Ichinose K, Ushigusa T, Koga T, George C. Tsokos, Kawakami A.

Role of Calcium/Calmodulin Kinase On Podocyte Function in Lupus Nephritis. 2013 ACR/ARHP Annual Meeting 13 . 2013/10/25/10/30 .

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

一瀬邦弘, 大山 要, 川上 純, 黒田直敬, 中嶋秀樹, 岸川直哉, 馬場雅子: 中枢神経ループス (NPSLE) 診断用バイオマーカー. 特願 2013-55543, 平成 25 年 3 月 18 日 (出願人: 国立大学法人長崎大学)

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌【欧文】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号, ページ	出版年
Tanaka Y , Hirata S.	Is it possible to withdraw biologics from therapy in rheumatoid arthritis?	Clinical Therapeutics	In press.	
Tanaka Y , Hirata S, Sawamura F, Saito K. et al.	Discontinuation of adalimumab after achieving remission in patients with established rheumatoid arthritis: 1-year outcome of the HONOR study.	Annals of the Rheumatic Diseases	In press.	
Kubo S, Yamamoto K, Kondo M, Yamagata K, Zhao J, Iwata S, Tanaka Y .	The JAK inhibitor tofacitinib reduces the T cell stimulatory capacity of human monocyte-derived dendritic cells.	Annals of the Rheumatic Diseases	In press.	
Kondo M, Yamamoto K, Okada Y, Tanaka Y . et al.	IL-17 inhibits chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.	Plos ONE	In press.	
Kawashiri SY, Kawakami A . et.al	Improvement of plasma endothelin-1 and nitric oxide in patients with systemic sclerosis by bosentan therapy.	Rheumatology International	34(2):221-225	2014
Tanaka Y .	Next stage of RA treatment: TNF-inhibitor-free remission will be a possible treatment goal?	Annals of the Rheumatic Diseases	72:ii124-ii127	2013
O'Shea JJ, Kontzias A, Yamamoto K, Tanaka Y , Laurence A.	Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases.	Annals of the Rheumatic Diseases	72:ii111-115	2013
Tanaka Y , Hirata S, Saleem B, Emery P.	Discontinuation of biologics in patients with rheumatoid arthritis.	Clinical and Experimental Rheumatology	31(Suppl78): S22-S27	2013

雑誌【和文】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号, ページ	出版年
浦田幸朋、石井智徳、張替秀郎、佐々木毅、その他 12 名	東北地方における B 型肝炎再活性化前向き研究について	最新医学	68(3) ,395-402	2013