キネレット皮下注 100 mg シリンジ

＜アナキンラ（遺伝子組換え）＞

第 2 部（モジュール 2）
CTD の概要（サマリー）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

Swedish Orphan Biovitrum Japan 株式会社

Property of the SOBI group - strictly confidential

目次

2.6.2　薬理試験の概要文 7
2.6.2.1　まとめ 7
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 8
2.6.2.2.1　*In vitro* 試験による評価 8
2.6.2.2.2　IL-1α 及び IL-1β との相同性 9
2.6.2.2.3　IL-1 及び IL-1Ra の IL-1 受容体に対しての異なる結合 11
2.6.2.2.4　動物種間の相同性 11
2.6.2.2.5　アナキンラとの結合試験 16
2.6.2.2.5.1　アナキンラの細胞表面 IL-1 受容体への結合特性 16
2.6.2.2.6　細胞培養に対するアナキンラの作用 19
2.6.2.2.6.1　上皮細胞成長因子（EGF）受容体のリン酸化 19
2.6.2.2.6.2　IL-1 及び IL-1 受容体の複合体の内在化 21
2.6.2.2.6.3　IL-1 の選択された細胞生理学的作用 22
2.6.2.2.6.4　*c-jun* の転写活性化 22
2.6.2.2.6.5　IL-1 誘発胸腺細胞増殖作用に対する抑制 23
2.6.2.2.6.6　培養液中の T リンパ球クローンに対するアナキンラの作用 23
2.6.2.2.6.7　B 細胞増殖に対するアナキンラの *in vitro* での作用 27
2.6.2.2.6.8　NK 細胞に対するアナキンラの *in vitro* での作用 28
2.6.2.2.6.9　ヒトメラノーマ細胞株における細胞毒性 29
2.6.2.2.6.10　IL-1 誘発プロスタグランジン及びコラゲナーゼ産生に対する抑制作用 30
2.6.2.2.6.11　白血球増殖に対する抑制作用 31
2.6.2.2.6.12　細胞培養におけるアナキンラ活性の概要 32
2.6.2.2.7　アナキンラの *in vivo* 作用 33
2.6.2.2.7.1　*In vivo* での IL-1 作用に対するアナキンラの抑制作用 33
2.6.2.2.7.2　動物モデルにおける関節炎に対するアナキンラの作用 34
2.6.2.2.7.3　ラットコラーゲン誘発関節炎における徐放性溶媒の影響 34
2.6.2.2.7.4　ラット及びマウスを用いた連鎖球菌細胞壁誘発関節炎 37
2.6.2.2.7.5　マウスを用いた抗原及びコラーゲン誘発関節炎 38
2.6.2.2.7.6　ラットアジュバント誘発関節炎 38
2.6.2.2.7.7　IL-1Ra トランスジェニックマウス、IL-1Ra ノックアウトマウスに対する関節炎に関連する結果及び IL-1Ra を用いた遺伝子治療アプローチ 43
2.6.2.2.7.8　その他の動物モデル（非リウマチ性関節炎）に対するアナキンラの作用 43
2.6.2.2.7.9　感染症モデルに関する IL-1/IL-1Ra のその他の試験 44
2.6.2.2.7.10　免疫系に対するアナキンラの作用 46
2.6.2.2.7.11　*In vivo* 免疫反応に対するアナキンラの作用 46

2.6.2.2.7.12　骨髄細胞に対するアナキンラの *in vivo* 作用.....48
2.6.2.3　副次的薬理試験.....48
2.6.2.4　安全性薬理試験.....49
2.6.2.4.1　安全性薬理試験の評価項目を含むアナキンラの一般薬理試験（試験番号：[redacted] 66-80]）.....49
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験.....50
2.6.2.6　考察及び結論.....50
2.6.2.7　図表.....51
2.6.2.8　参考文献.....51

表目次

表 2.6.2-1　アナキンラ変異タンパク質：受容体結合競合結果の概要.....8
表 2.6.2-2　アナキンラ及び IL-1 と T 細胞との結合に対する pH の影響.....17
表 2.6.2-3　アナキンラは MLR における同種異系 T 細胞増殖を抑制しない.....26
表 2.6.2-4　アナキンラが抑制する IL-1 の *in vitro* 作用.....32
表 2.6.2-5　選択動物を用いたリウマチ性関節炎以外の疾患モデルに対するアナキンラの非臨床有効性プロファイル.....43

図目次

図 2.6.2-1　IL-1α、IL-1β 及び IL-1Ra の配列アライメント.....10
図 2.6.2-2　IL-1Ra 及び IL-1β の IL-1R1 受容体への結合.....11
図 2.6.2-3　ヒト、マウス、ラット及びウサギの IL-1Ra のアミノ酸配列アラインメント.....13
図 2.6.2-4　pH 7.2 における ^{35}S-アナキンラの T 細胞への特異的結合.....17
図 2.6.2-5　アナキンラとヒト B 細胞との結合.....18
図 2.6.2-6　アナキンラとヒト PMN との結合.....19
図 2.6.2-7　アナキンラは ^{125}I-EGF の線維芽細胞に対する結合に影響しない.....20
図 2.6.2-8　アナキンラによる EGF 受容体の IL-1 誘発ダウンモジュレーションの阻害.....21
図 2.6.2-9　^{35}S-アナキンラは内在化しない.....22
図 2.6.2-10　IL-1 及び/又はアナキンラへ曝露後の線維芽細胞 mRNA のノーザンブロット解析.....23
図 2.6.2-11　アナキンラによる PHA 刺激 PBMC 増殖に対する抑制作用.....24
図 2.6.2-12　分裂促進因子誘発 T 細胞増殖に対するアナキンラの作用.....25
図 2.6.2-13　抗原誘発 T 細胞増殖に対するアナキンラの作用.....26
図 2.6.2-14　B 細胞増殖に対するアナキンラの作用.....28

図 2.6.2-15 ヒトメラノーマ A375 細胞の増殖抑制アッセイによって得られたヒト遺伝子組換え IL-1 の用量反応曲線 29
図 2.6.2-16 IL-1Ra は A375 細胞に対する IL-1 の細胞致死作用を抑制する 30
図 2.6.2-17 培養接着ヒト滑膜細胞における IL-1 誘発 PGE_2 産生に対するアナキンラの抑制作用 31
図 2.6.2-18 雌の Lewis ラットを用いた II 型コラーゲン関節炎の肢関節直径に対して連日皮下投与した、CSEP を配合したアナキンラ及び HA を配合したアナキンラの作用35
図 2.6.2-19 雌の Lewis ラットを用いた II 型コラーゲン関節炎の組織学的スコアに対して連日皮下投与した、CSEP を配合したアナキンラの作用対 HA を配合したアナキンラの作用 36
図 2.6.2-20 雌の Lewis ラットを用いた II 型コラーゲン関節炎での肢関節直径に対して皮下ボーラス投与した、HA を配合したアナキンラの作用 37
図 2.6.2-21 雄の Lewis ラットを用いたアジュバント関節炎に対するアナキンラ（5 mg/kg/hour、8 日目から 15 日目まで）の持続静脈内投与及びメトトレキサート（75 µg/kg、0 日目から 15 日目まで）の連日経口投与の作用....39
図 2.6.2-22 雄の Lewis ラットを用いたアジュバント関節炎の炎症に対するアナキンラ及び PEG-sTNF-RI の併用投与の作用 40
図 2.6.2-23 雄の Lewis ラットを用いたアジュバント関節炎の脛肢関節領域の骨密度減少に対するアナキンラ及び PEG-sTNF-RI の併用投与の作用 41
図 2.6.2-24 雄の Lewis ラットを用いたアジュバント関節炎による体重減少に対するアナキンラ及び PEG-sTNF-RI の併用投与の作用 42

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ARH	Arcuate nucleus of the hypothalamus	視床下部弓状核
BSA	Bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
CSEP	Citrate-buffered saline with ethylenediaminetetraacetic acid and polysorbate	エチレンジアミン四酢酸及びポリソルベート含有クエン酸緩衝生理食塩液
CFU-GM	Colony-forming units for granulocytes and monocytes	顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞
CFU-GEMM	Colony-forming units for granulocytes, erythrocytes, monocytes, and megakaryocytes	顆粒球・赤血球・巨核球・単球コロニー形成細胞
CTL	Cytotoxic T lymphocytes	細胞傷害性 T 細胞
DTH	Delayed type hypersensitivity Epidermal growth factor	遅延型過敏
EGF	Epidermal growth factor	上皮細胞成長因子
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HA	Hylan fluid	ヒラン液
IL-1	Interleukin-1	インターロイキン-1
IL-1α	Interleukin-1 alpha	インターロイキン-1 アルファ
IL-1β	Interleukin-1 beta	インターロイキン-1 ベータ
IL-1RI	Interleukin-1 receptor type I	インターロイキン-1 受容体 I 型
IL-1RII	Interleukin-1 receptor type II	インターロイキン-1 受容体 II 型
IL-1Ra	Interleukin-1 receptor antagonist	インターロイキン-1 受容体拮抗薬
K_D	Equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
KLH	Keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
LAK	Lymphokine activated killer (cells)	リンホカイン活性化キラー（細胞）
LPS	Lipopolysaccharide	リポ多糖類
MLR	Mixed leukocyte reaction	混合リンパ球反応
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MTX	Methotrexate	メトトレキサート
NK	Natural killer (cells)	ナチュラルキラー（細胞）
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	末梢血単核細胞
PEG-sTNF-RI	Polyethylene glycosylated soluble tumor necrosis factor-receptor type I	ポリエチレングリコシル化可溶性腫瘍壊死因子受容体 I 型
PGE_2	Prostaglandin E_2	プロスタグランジン E_2
PG-PS	Peptidoglycan polysaccharide	ペプチドグリカンポリ多糖類
PHA	Phytohemagglutinin	フィトヘマアグルチニン

PMN	Polymorphonuclear neutrophil	多形核好中球
r (as prefix)	Recombinant	遺伝子組換え
rhIL-1Ra	Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist	遺伝子組換えヒトインターロイキン-1 受容体拮抗薬
r-HuIL-1α	Recombinant human interleukin-1 alpha	遺伝子組換えヒトインターロイキン-1 アルファ
r-HuIL-1β	Recombinant human interleukin-1 beta	遺伝子組換えヒトインターロイキン-1 ベータ
r-metHuIL-1Ra (anakinra)	Recombinant methionyl human interleukin-1 receptor antagonist (anakinra)	遺伝子組換えメチオニルヒトインターロイキン-1 受容体拮抗薬（アナキンラ）
s (as prefix)	Soluble	可溶性
SRBC	Sheep red blood cell	ヒツジ赤血球
Th	T helper (cells)	ヘルパーT（細胞）
TNCB	Trinitrochlorobenzene	トリニトロクロロベンゼン
TNFα	Tumor necrosis factor alpha	腫瘍壊死因子アルファ
TNP	Trinitrophenyl	トリニトロフェニル

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

アナキンラ（遺伝子組換え）（以下、本薬）又は遺伝子組換えヒトインターロイキン-1 受容体拮抗薬（IL-1Ra）は、遺伝子組換え DNA 技術を用いて大腸菌で生成した可溶性タンパク質である。本薬は、天然のヒトタンパク質と比較して N 末端メチオニン残基を有することのみが異なっており、天然分子と同様にグリコシル化されていない。したがって、本薬は r-metHuIL-1Ra とも示される。本薬は、ヒト以外の動物種で相当のタンパク質と 75～77%の相同性を示す（Eisenberg 1991; Cominelli 1994）。異種タンパク質であるにもかかわらず、実験動物における本薬の活性はヒトで想定される活性と一致していると考えられる。

IL-1Ra は IL-1 サイトカインファミリーの一員である。インターロイキン-1（IL-1）シグナル伝達経路は、2 種類の作動物質であるインターロイキン-1 アルファ（IL-1α）及びインターロイキン-1 ベータ（IL-1β）、膜結合型及び可溶型の両方の形態で存在する 2 種類の受容体である、IL-1 受容体 I 型（IL-1RI）及び IL-1 受容体 II 型（IL-1RII）、並びに 1 種類の可溶型拮抗物質（IL-1Ra）から構成される。膜結合型 IL-1RI は、様々な細胞に存在し、IL-1α 及び IL-1β の初期シグナル伝達を担う。血中を循環する受容体拮抗物質である IL-1Ra は、I 型受容体に結合し IL-1α 及び IL-1β の作用に対して拮抗し、IL-1 が媒介する炎症プロセスを抑制する。本薬が IL-1 細胞表面受容体に競合的拮抗薬として作用し、内因性作動活性を示さずに IL-1 の作用に対して拮抗することを示す多くの薬理試験が文献で報告されている。本薬は、IL-1α 及び IL-1β の作用を効果的に阻害する。

安全性薬理試験は、マウス、ラット、イヌ及び *ex vivo* 試験をモルモット回腸で実施した。中枢/自律神経機能、鎮痛作用、心血管、消化器及び腎機能の試験では、本薬に関連した影響は認められなかった。

本薬の薬力学的薬物相互作用は、アジュバント関節炎ラットにおいてメトトレキサート（MTX）（Bendele 1999）又はポリエチレングリコシル化可溶性腫瘍壊死因子受容体 I 型（PEG-sTNF-RI）（Feige 2000）との併用により評価した。本薬の単独投与（5 mg/kg//hour）では足蹠浮腫に対して 9%抑制したのに対し、MTX 単独投与（0.075 mg/kg）では 45%、本薬と MTX（Bendele 1999）の併用投与では 78%の抑制が認められた。さらに、低用量の本薬（0.2 mg/kg//hour）又は PEG-sTNF-RI（0.25 mg/kg/day）の単独投与では、アジュバント関節炎ラットにおける炎症、体重減少及び骨密度の低下に対する抑制作用は認められなかった。しかし、これらの低用量の併用投与により、炎症（足蹠浮腫）に対する 78 ± 10%の抑制及び骨密度低下に対する 64 ± 14%の抑制が認められた。低用量の併用投与による足蹠浮腫に対する作用は非常に顕著であり、相乗作用を示した。

関節リウマチ、クリオピリン関連周期熱症候群及び家族性地中海熱並びに他の IL-1 が起因となる疾患（全身型若年性特発性関節炎及び成人発症スチル病など）の慢性炎症及びそれに伴う組織破壊を、定期的な皮下投与で制御するために本薬を開発した。本薬はこれらの適応症の治療を

目的としており、単独投与又は疾患修飾性抗リウマチ薬など他の抗リウマチ薬と併用投与して、症状を軽減し、構造的損傷を遅延させる。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

申請予定の適応症に関連する薬理試験は正式には申請者により実施しなかった。以下に示す複数の効力を裏付ける試験が実施され、文献（Bendele 1998; Bendele 1999; Esser 1985; Fernandes 1999; Hom 1988; Hom 1990; Joosten 1996; Kuiper 1998; Ma 1998; Pelletier 1997; Stimpson 1987; van de Loo 1995a; van den Berg 1998; van Lent 1995; Wooley 1993）で公表し、2.6.2.8 項に示している。

2.6.2.2.1　*In vitro* 試験による評価

本薬遺伝子配列に対して部位特異的変異導入を行い、本薬が IL-1RI に結合する際の残基を特定した（Evans 1995）。変異タンパク質（ムテイン）は、天然のタンパク質配列から単一アミノ酸残基を変更して構築している。本薬の 152 のアミノ酸残基のうち 101 残基を変異させており、主に天然の残基をグリシン残基に置換している。この方法で、ほぼ全ての表面残基はグリシン又は場合によってはアラニン残基に置換している。一部のムテインは、結合に重要であると最初に特定された位置にグリシン又はアラニン以外のアミノ酸を組み込んでいる。得られたムテインを、ヒト IL-1RI を発現するチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた競合的受容体結合アッセイで解析した（表 2.6.2-1）。得られた結果により、Trp 16、Tyr 34 及び Tyr 147 の残基が受容体結合に関与していることが示唆された。これらの個々の残基をグリシンに置換すると、放射性標識した本薬の受容体結合と競合するムテインの結合能が 3 倍以上低下する。これらの 3 つの残基は、本薬の三次元構造上で互いに近接しており、それらの残基の溶媒に接触可能な表面は連続している。本薬のこの領域は IL-1RI と相互作用することが提示されている。N 末端メチオニンを含まないこの位置番号付けにおいて、AGA コドンでコードされる位置 77 及び 92 のアルギニン残基の変異によって、IL-1 受容体に対する本薬の結合能に顕著な影響は認められない。これらの 2 つのアルギニン残基は、低頻度で大腸菌によってリジンに置換される。二重リジンムテインが作成されており、それは本薬と区別できない程度の効力で受容体と結合する。

表 2.6.2-1　アナキンラ変異タンパク質：受容体結合競合結果の概要

Anakinra mutant	Relative affinity (% affinity of rhIL-1Ra)	Anakinra mutant	Relative affinity (% affinity of rhIL-1Ra)	Anakinra mutant	Relative affinity (% affinity of rhIL-1Ra)
Anakinra	100	V48→N	100	S105→F	72
Q11→A	97	V48→Q	100	P107→G	123
R14→G	116	P50→A	53	T108→G	104
*W16→G	12	E52→A	97	T108→K	97
*W16→R	31	H54→G	120	S110→A	118
*W16→Y	69	L56→A	78	E112→A	77
*W16→K	<1	I60→A	67	S113→G	102
*W16→M	5	H61→G	79	C116→S	79
*W16→Q	14	K64→A	111	P117→G	70
V18→Q	110	M65→A	86	W119→G	53
V18→G	100	C66→S	71	F120→A	75

Anakinra mutant	Relative affinity (% affinity of rhIL-1Ra)	Anakinra mutant	Relative affinity (% affinity of rhIL-1Ra)	Anakinra mutant	Relative affinity (% affinity of rhIL-1Ra)
N19→A	56	S68→G	89	M125→G	146
N19→F	78	V70→A	66	E126→G	100
Q20→N	45	K71→G	100	D128→G	55
K21→G	100	S72→G	100	Q129→A	110
T22→G	100	D74→G	30	P130→G	125
Y24→G	53	D74→C	80	V131→G	100
L25→G	43	D74→F	106	S132→G	113
R26→A	89	D74→A	59	T134→G	158
N27→G	129	D74→W	59	N135→G	113
N28→A	123	E75→G	100	M136→A	144
Q29→G	76	T76→G	100	P137→G	113
V31→G	80	R77→A	193	D138→G	158
G33→G	100	R77→C	100	D138→N	152
*Y34→G	25	R77→E	89	D139→G	117
*Y34→F	58	Q79→G	54	V141→G	85
*Y34→H	91	E81→G	102	M142→G	85
*Y34→C	41	N84→C	95	V143→G	79
*Y34→W	94	I85→A	115	T144→G	100
*Y34→K	<1	T86→A	104	K145→D	75
*Y34→D	7	D87→A	141	K145→G	91
*Y34→M	41	D87→N	124	K145→A	85
L35→G	36	L88→A	82	K145→E	95
Q36→G	100	S89→A	89	K145→Y	42
Q36→F	<1	E90→A	109	K145→R	71
P38→C	100	N91→G	79	K145→M	119
P38→G	70	R92→D	100	K145→Q	63
N39→G	57	R92→K	71	Y147→G	34
V40→G	116	K93→A	83	Y147→H	54
N41→G	71	Q94→A	110	Y147→A	35
L42→C	116	D95→G	106	Y147→K	1
L42→G	73	D95→C	75	Y147→M	48
L42→Q	81	K96→G	100	Y147→T	4
E43→G	65	R97→D	100	F148→A	85
E44→G	60	I101→G	100	F148→Q	45
K45→G	144	R102→G	60	Q149→G	70
K45→Y	100	S103→G	111	E150→A	106
I46→G	144	D104→G	100	D151→A	111
D47→A	19	S105→A	128	E152→A	146
V48→A	132	S105→Q	187	E152→F	71

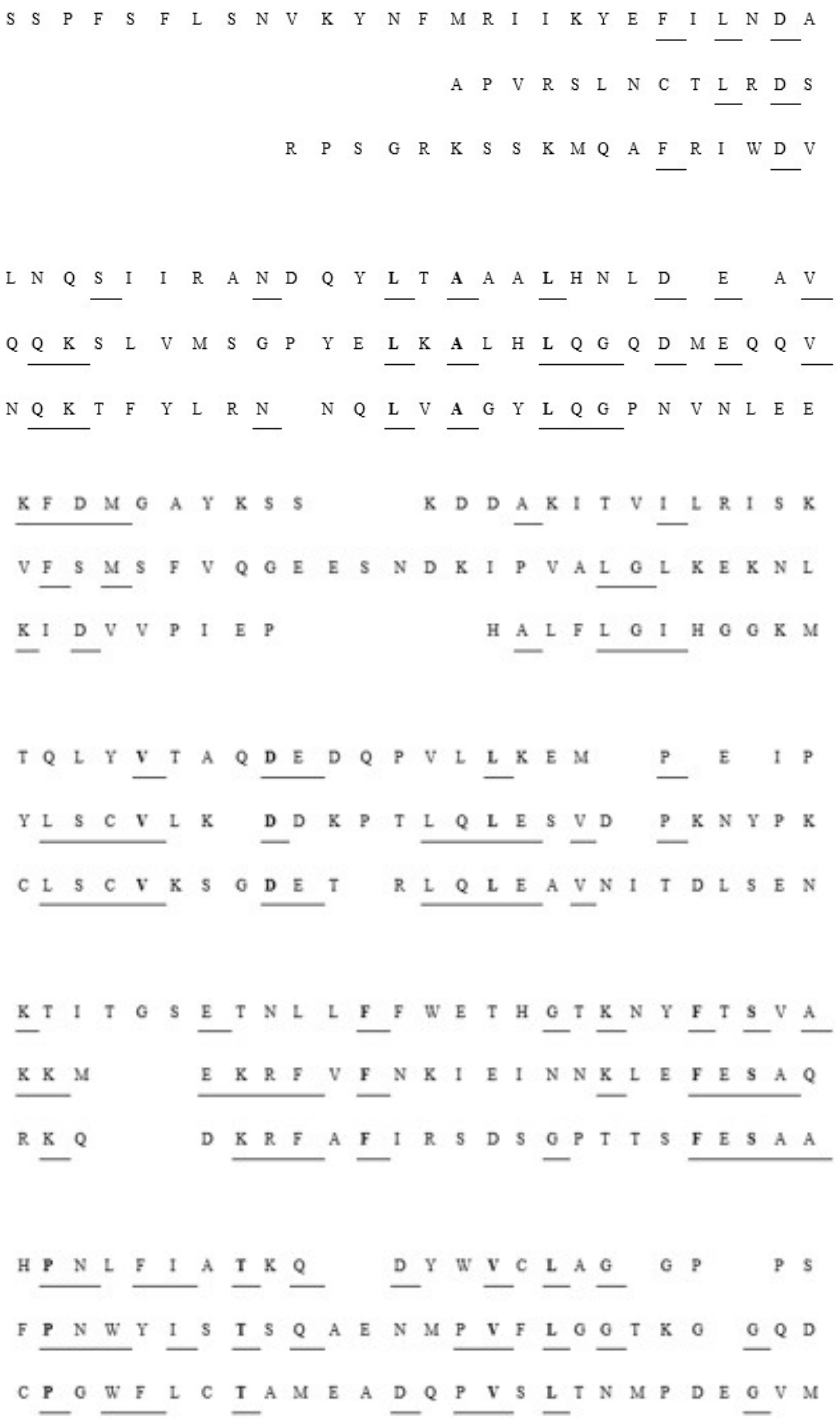
Abbreviation: rhIL-1Ra, Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist.
*Proposed residues involved in receptor binding.

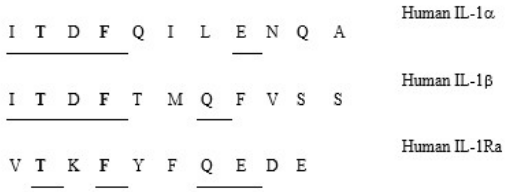
2.6.2.2.2 IL-1α 及び IL-1β との相同性

ヒト IL-1Ra のアミノ酸配列を、IL-1α 及び IL-1β と比較した（Eisenberg 1991）。配列アラインメントを図 2.6.2-1 に示す。IL-1Ra は IL-1β と 26%の配列相同性を持ち、IL-1α とは 19%の相同

性を持つ。IL-1Ra 及び IL-1β には、3 つ以上の同一残基を持つ領域が 5 つある。IL-1Ra 及び IL-1β で同一の残基の 70%以上が、分子の構造コアを形成する β ストランドに位置している（Eisenberg 1991）。したがって、IL-1Ra は IL-1 遺伝子ファミリーの一員であり、その分子構造はファミリーの他の 2 つのメンバー（IL-1α 及び IL-1β）と非常に類似していると予測される。したがって、IL-1Ra は IL-1α 及び IL-1β と同じ受容体に結合すると予測するのが合理的である。

図 2.6.2-1　IL-1α、IL-1β 及び IL-1Ra の配列アライメント



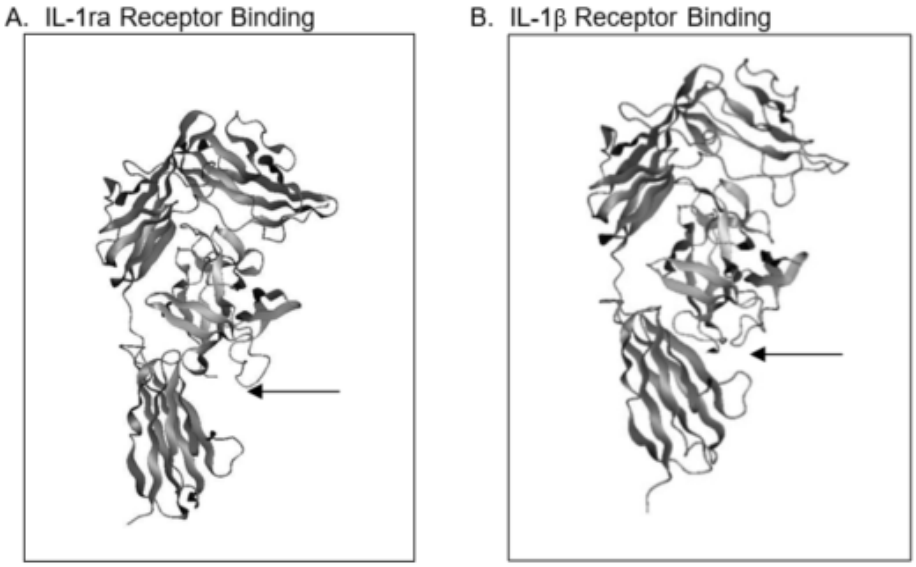


Abbreviations: IL-1α, Interleukin-1 alpha; IL-1β, Interleukin-1 beta; IL-1Ra, Interleukin-1 receptor antagonist.
The amino acid sequences of the mature protein of human IL-1α, IL-1β, and IL-1Ra are aligned. Bold font represents residues that are conserved in all 3 molecules. Underlined residues are conserved in at least 2 of the molecules.

2.6.2.2.3　IL-1 及び IL-1Ra の IL-1 受容体に対しての異なる結合

IL-1Ra 及び IL-1β が IL-1 受容体と複合体を形成した結晶構造は解析されている（Vigers 1997; Schreuder 1997）。図 2.6.2-2 に示すように、これらの構造から、IL-1β 及び IL-1Ra の両方が IL-1RI の 3 つの異なる細胞外受容体ドメインに結合することが示された。しかし、IL-1R 作動物質である IL-1β の場合、第 3 ドメインでの結合がより広範であり、これがおそらく受容体活性化の構造的機序である（Auron 1998）。

図 2.6.2-2　IL-1Ra 及び IL-1β の IL-1R1 受容体への結合



Source: (A: Modified from Schreuder 1997; B: Modified from Vigers 1997)
Abbreviations: IL-1β, Interleukin-1 beta; IL-1R1, Interleukin-1 receptor I; IL-1Ra, Interleukin-1 receptor antagonist.

2.6.2.2.4　動物種間の相同性

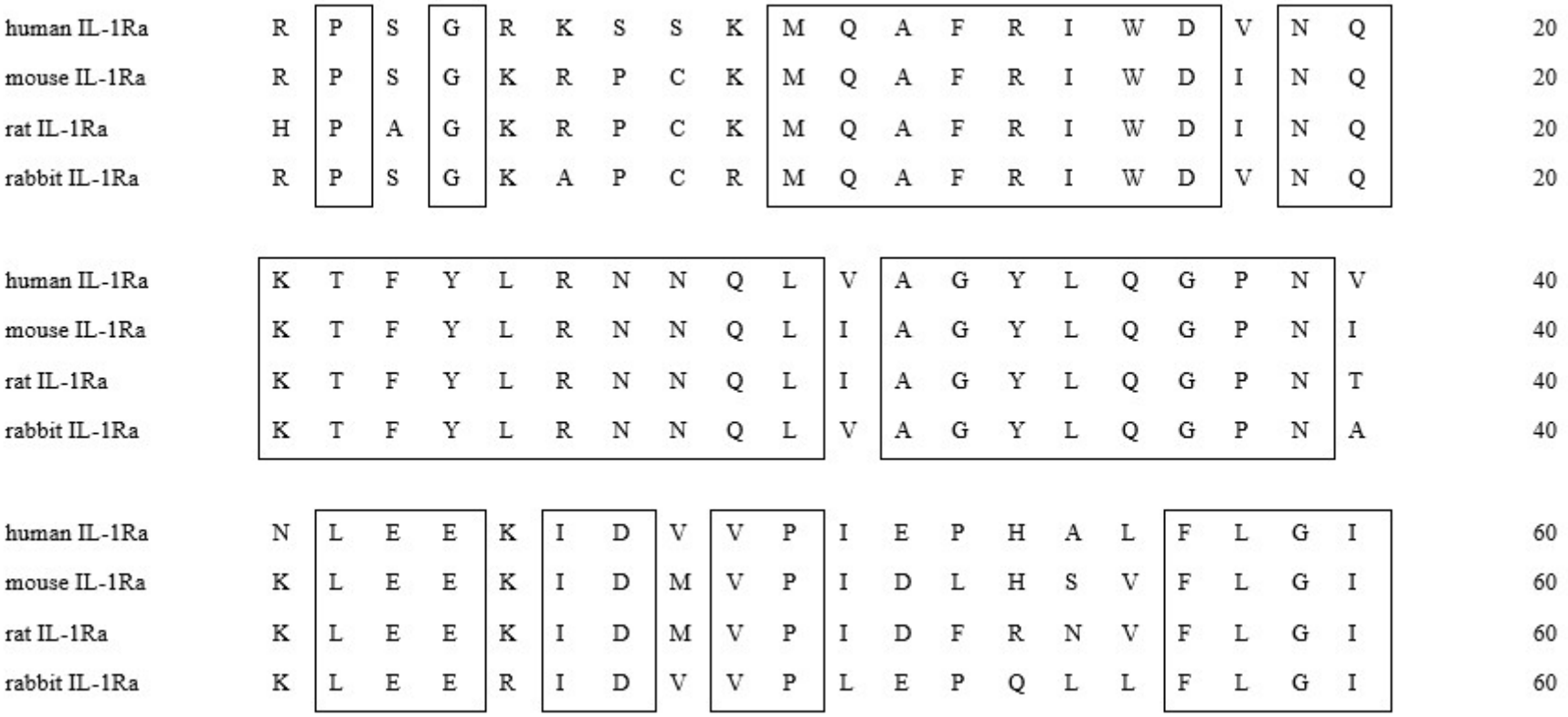
ヒト、マウス、ラット及びウサギの IL-1Ra をコードするゲノムクローンは単離されている（Eisenberg 1991; Cominelli 1994）。図 2.6.2-3 に示すように、IL-1Ra 遺伝子によってコードされるタンパク質は非常に類似した配列を示す。これらの配列には挿入又は欠失はない。マウス及び

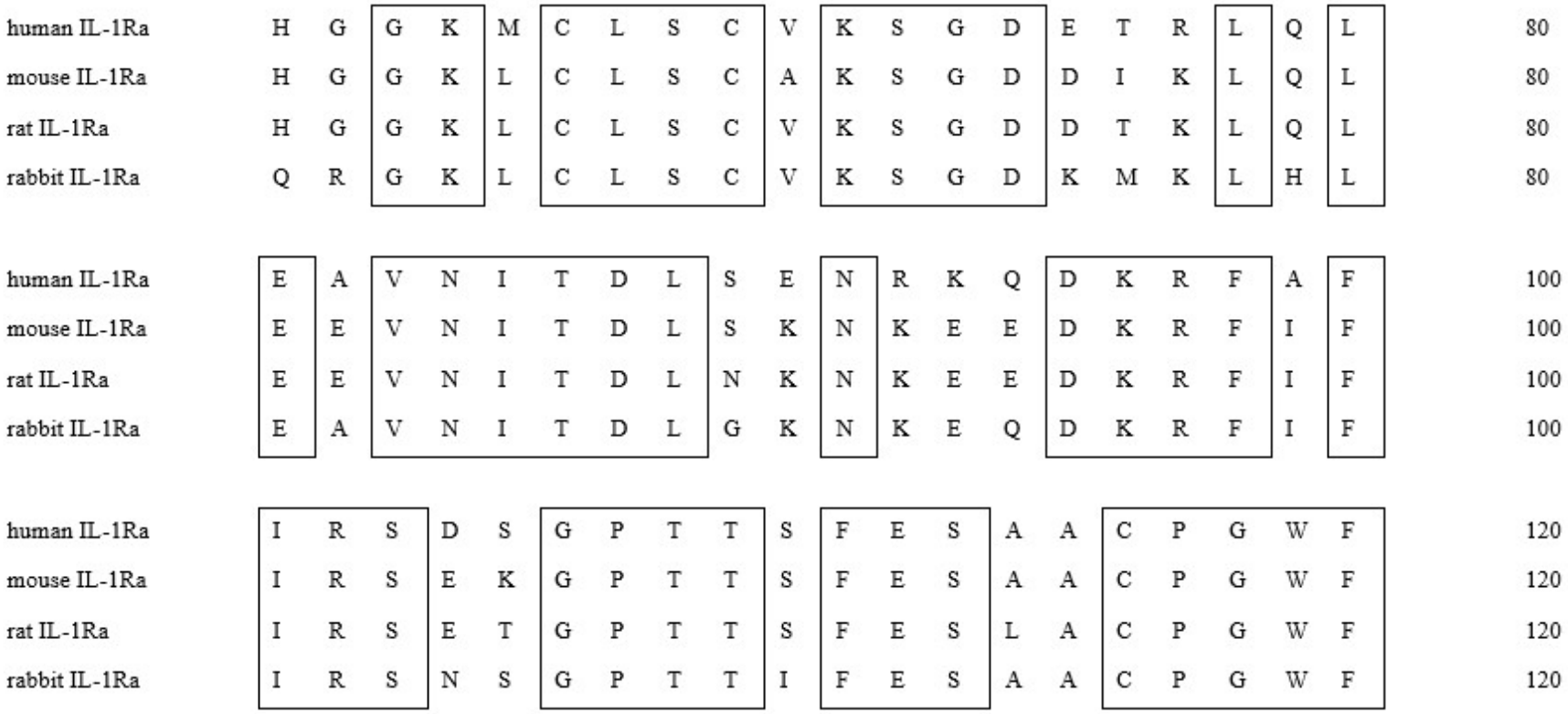
ラットの配列間には非常に高い保存性があり、ヒトの配列とマウス、ラット及びウサギの配列間には中程度の保存性がある。ヒトとカニクイザルの IL-1Ra のアミノ酸配列にはわずか 3%の違いしかない（UniProt、アクセス 2024 年 11 月 5 日）。

この高い相同性は、IL-1 阻害特性を示す分子の配列及び三次構造を維持するための非常に強い進化圧力を示唆している。

注目すべきことに、大腸菌がリジンに置換できるアルギニン残基（77 及び 92 番目のアミノ酸残基）は、検討した他の動物 3 種の IL-1Ra 配列では実際にリジン残基であることが示されている。

図 2.6.2-3　ヒト、マウス、ラット及びウサギの IL-1Ra のアミノ酸配列アラインメント




human IL-1Ra H G G K M C L S C V K S G D E T R L Q L 80
mouse IL-1Ra H G G K L C L S C A K S G D D I K L Q L 80
rat IL-1Ra H G G K L C L S C V K S G D D T K L Q L 80
rabbit IL-1Ra Q R G K L C L S C V K S G D K M K L H L 80
human IL-1Ra E A V N I T D L S E N R K Q D K R F A F 100
mouse IL-1Ra E E V N I T D L S K N K E E D K R F I F 100
rat IL-1Ra E E V N I T D L N K N K E E D K R F I F 100
rabbit IL-1Ra E A V N I T D L G K N K E Q D K R F I F 100
human IL-1Ra I R S D S G P T T S F E S A A C P G W F 120
mouse IL-1Ra I R S E K G P T T S F E S A A C P G W F 120
rat IL-1Ra I R S E T G P T T S F E S L A C P G W F 120
rabbit IL-1Ra I R S N S G P T T I F E S A A C P G W F 120

human IL-1Ra	L	C	T	A	M	E	A	D	Q	P	V	S	L	T	N	M	P	D	E	G	140
mouse IL-1Ra	L	C	T	T	L	E	A	D	R	P	V	S	L	T	N	I	P	E	E	P	140
rat IL-1Ra	L	C	T	T	L	E	A	D	H	P	V	S	L	T	N	I	P	K	E	P	140
rabbit IL-1Ra	L	C	T	A	L	E	A	D	Q	P	V	S	L	T	N	I	P	D	D	S	140

human IL-1Ra	V	M	V	T	K	F	Y	F	Q	E	D	E	152
mouse IL-1Ra	L	I	V	T	K	F	Y	F	Q	E	D	Q	152
rat IL-1Ra	C	T	V	T	K	F	Y	F	Q	E	D	Q	152
rabbit IL-1Ra	I	V	V	T	K	F	Y	F	Q	E	D	Q	152

Abbreviation: IL-1Ra, Interleukin-1 receptor antagonist.
Residues that are conserved among all these species are boxed.

2.6.2.2.5　アナキンラとの結合試験

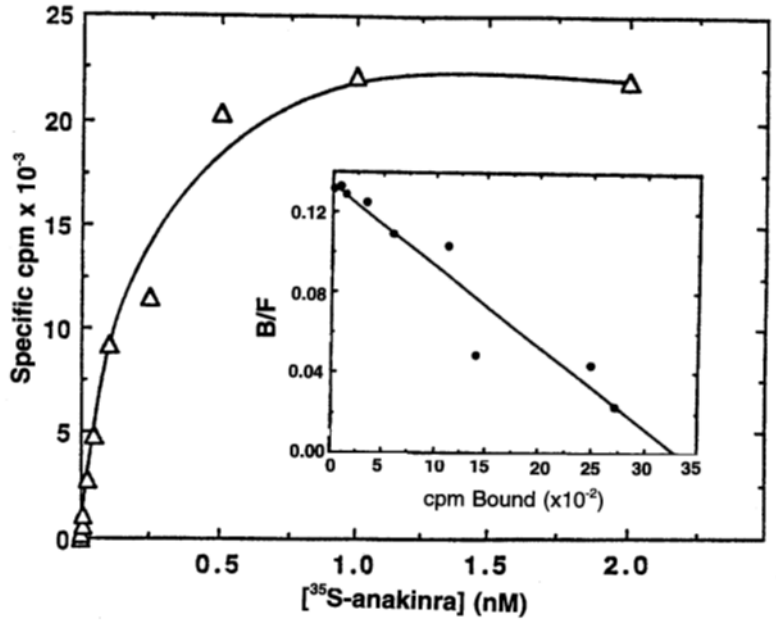
2.6.2.2.5.1　アナキンラの細胞表面 IL-1 受容体への結合特性

IL-1 ファミリーである IL-1Ra、IL-1α 及び IL-1β は全て、多様な細胞種に存在する細胞表面受容体に高い親和性で結合する（Eisenberg 1991; Hannum 1990; Eisenberg 1990; Chizzonite 1989; Dower 1985; Dripps 1991a; Dripps 1991b）。IL-1α 及び IL-1β（*in vivo* 及び *in vitro* の両方でほぼ区別できない活性プロファイルを示す 2 つのサイトカイン）にとって、この結合は、内皮細胞における細胞接着分子の誘導（Granstein 1986; Sayers 1988; Parker 1989; Kishimoto 1989）並びにプロスタグランジン及びプロテアーゼの生成（Gubler 1986; Dukovich 1986）などの炎症反応に関与する細胞活動を誘導する重要な第一歩である。本薬との結合は細胞応答を誘導せず、受容体拮抗薬として作用することにより、IL-1α 及び IL-1β の作用を抑制する（Hannum 1990; Eisenberg 1990; Dripps 1991a; Arend 1990b; Cominelli 1990a; Ohlsson 1990; Eisenberg 1989）。

IL-1 受容体には、IL-1RI 及び IL-1RII の 2 種類が同定されている。IL-1RI は、I 型（80 kDa）受容体であり、T 細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、肝細胞、軟骨細胞及び線維芽細胞に主に発現している（Dinarello 1991）。IL-1RII は、II 型受容体（60 kDa）であり、B 細胞、好中球、単球及び骨髄細胞に発現する（Chizzonite 1989; Bomsztyk 1989; Bensimon 1989; Benjamin 1990; Giri 1990; Symons 1990; Spriggs 1990; McMahan 1991）。しかし、一部の細胞は I 型及び II 型両方の受容体を発現することが明らかになっている（Dripps 1991b; McMahan 1991; Stylianou 1992）。2 報の文献（Sims 1993; Colotta 1993）によると、IL-1RI を介してのみ IL-1 によるシグナル伝達が可能であることを示している。本薬が IL-1RI 又は IL-1RII のいずれかに結合することで、IL-1 との結合が阻害される。IL-1Ra は細胞内で IL-1 反応を誘導しない（Hannum 1990; Eisenberg 1990; Dripps 1991a; Dripps 1991b; Arend 1990b; Cominelli 1990a; Ohlsson 1990; Eisenberg 1989; Stylianou 1992; Sims 1993; Colotta 1993; Kilian 1991; Seckinger 1990; Smith 1991; Carter 1990; Granowitz 1991; Conca 1991）。

平衡結合及び動態実験により、本薬は細胞表面 IL-1 受容体に対し、IL-1α 及び IL-1β と同様の親和性（平衡解離定数［K_D］値：約 200 pmol/L）で結合することが示されている（図 2.6.2-4）。このヒトタンパク質は、マウス及びウサギの細胞上の IL-1RI にも同じ親和性で結合する（Cominelli 1994; Dripps 1991b）。マウス、ラット及びウサギの IL-1Ra はヒト細胞に対し同様の親和性で結合し、IL-1RI に対する本薬の結合は種特異性をほとんど、又は全く示さないことを確認している。

図 2.6.2-4　pH 7.2 における ^{35}S-アナキンラの T 細胞への特異的結合



Source: Based on (Dripps 1991a)
Abbreviations: B/F, Bound/free ratio; K_D, Equilibrium dissociation constant.
Cells were incubated at 4 °C with the indicated concentrations of ^{35}S-anakinra. Scatchard plot analysis of the binding data, shown in inset, gives an apparent K_D of 205 pmol/L and ~ 3300 sites/cell.

本薬の IL-1RI との結合は pH 依存性である。表 2.6.2-2 は、pH が 8.5 から 6.0 に低下すると、本薬の IL-RI との結合がほぼ 3 倍に増加することを示している。これは親和性が 5 倍に増加することに対応する。対照的に、IL-1α の IL-1RI に対する親和性は pH によってわずかにしか影響を受けず、IL-1β の親和性は pH の低下と共に減少する。炎症組織で認められるような軽度の酸性条件下ではより効果的な IL-1 拮抗作用を示し得る可能性があるため、この効果は、生理学的観点から注目に値する（Ward 1978）。

表 2.6.2-2　アナキンラ及び IL-1 と T 細胞との結合に対する pH の影響

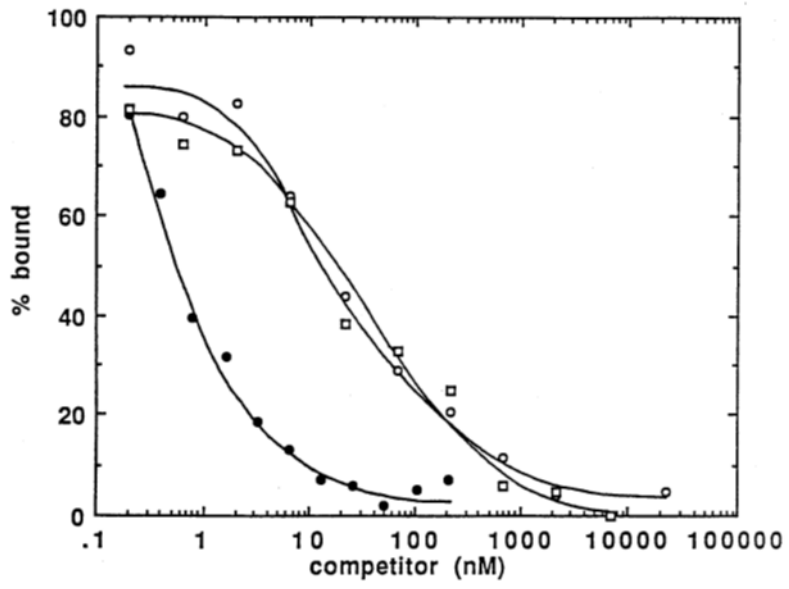
pH	Relative binding[a]			Affinity[b]		
	^{35}S-anakinra[c]	^{125}I-IL-1α[d]	^{35}S-IL-1β[e]	^{35}S-anakinra[c]	^{125}I-IL-1α[d]	^{35}S-IL-1β[e]
6.0	100 ± NA[f]	84	52.6, 49	14 ± 3.9	6.8	2.6 ± 0.1
6.5	88.3 ± 1.5	100	85.5, 83	10.5 ± 2.7	9.4	5.3 ± 0.1
7.0	78.5 ± 7.6	88	96.5, 97	9.1 ± 1.2	7.5	6.6 ± 0.2
7.5	64.3 ± 6.5	75	100, 100	5.7 ± 0.2	5.7	7.0 ± 0.3
8.0	51.5 ± 2.3	72	99.4, 98.3	4.1 ± 0.4	5.4	6.8 ± 0.1
8.5	36.0 ± 1.6	70	75.4, 70.4	2.5 ± 0.5	4.9	4.2 ± 0.1

Source: (Dripps 1991a)
Abbreviations: IL-1, Interleukin-1; IL-1α, Interleukin-1 alpha; IL-1β, Interleukin-1 beta; SD, Standard deviation.
[a]Percent of maximum cpm bound.
[b]Affinity was [ligand receptor complex] / ([free receptor] × [free ligand]), in mol/L^{-1} × 10 ^{9}.
[c]Mean ± SD, number of experiments (N=4).
[d]N=1.

[e]Values obtained from duplicate samples are shown.
T cells were incubated with 100 pmol/L ^{35}S-anakinra, 100 pmol/L ^{125}I-IL-1α, or 100 pmol/L ^{35}S-IL-1β for 4 hours at 4 °C at the indicated pH values. Total specific binding of ^{35}S-anakinra at pH 6.0 averaged 20 844 cpm; total for ^{125}I-IL-1α at pH 6.5 was 2311 cpm; total for ^{35}S-IL-1β at pH 7.5 averaged 9984 cpm.

本薬と IL-1RII との結合は、競合結合及びアフィニティクロスリンク技術によって研究されている。この受容体の 2 つのサブクラスは、IL-1α、IL-1β 及び本薬に対する相対的な親和性に基づいて定義できる（図 2.6.2-5 及び図 2.6.2-6）（Dripps 1991a）。高親和性クラスには、正常なヒトドナーから分離したヒト B 細胞上の受容体が含まれ、本薬は IL-1β よりも 15 倍低い親和性（K_D 値 ＝7～18 nmol/L）で結合するが、IL-1α と同等の親和性を持つ。また、正常なヒトドナーの血液由来の多形核好中球（PMN）上の受容体にも本薬は IL-1β よりも 15 倍低い親和性で結合する。低親和性クラスには、マウスのプレ B 細胞及びマウス骨髄細胞上の受容体が含まれ、本薬は IL-1β よりも約 1500 倍低い親和性（K_D 値 ＝1.4 μmol/L）で結合する。マウス及びラットの IL-1Ra もプレ B 細胞に低親和性で結合するが、ヒト B 細胞及び PMN には高親和性で結合する。したがって、この弱い結合は、種特異性よりも細胞種の影響によるものであると考えられる。これらのプレ B 細胞からの組換え IL-1RII を発現する形質転換細胞は、IL-1α と同じ親和性で本薬と結合する（McMahan 1991）。この結果は、マウスのプレ B 細胞における受容体の翻訳後修飾（例えば、糖鎖付加又は他の膜タンパク質との結合）が、本薬の結合能力に影響を与える可能性があることを示唆している。

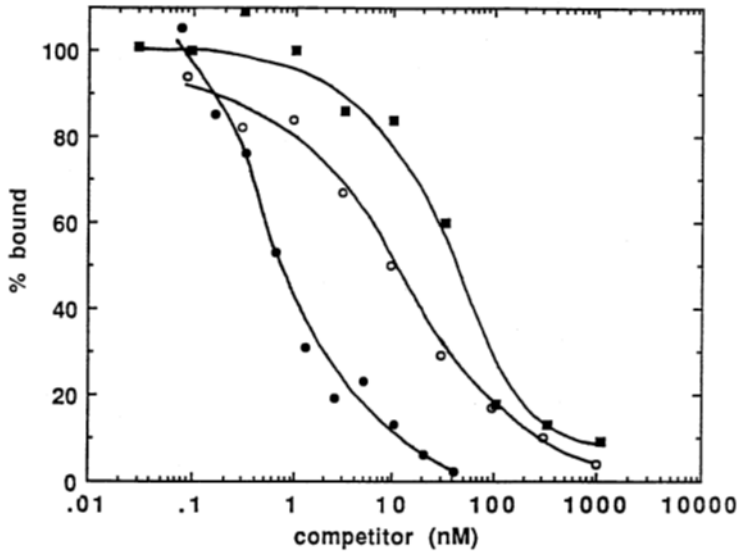
図 2.6.2-5　アナキンラとヒト B 細胞との結合



Source: (Dripps 1991b)
Abbreviations: EC_{50}, concentration that results in half maximal activation of the receptor; K_D, Equilibrium dissociation constant; IL-1α, Interleukin-1 alpha; IL-1β, Interleukin-1 beta.
Human B cells (5×10^6 Raji cells/mL) were incubated with 0.4 nmol/L human 35S-IL-1β in the presence of the indicated concentrations of unlabeled human IL-1β (full circles), anakinra (open circles), or human IL-1α (squares). K_D values were estimated from the EC_{50} values by the Cheng-Prusoff relationship. For both anakinra and IL-1α, the K_D is 18 nmol/L These

estimates are based on a K_D of 1.35 nmol/L for the binding of ^{35}S-IL-1β as determined by Scatchard analysis of direct binding data (data not shown).

図 2.6.2-6　アナキンラとヒト PMN との結合



Source: (Dripps 1991b)
Abbreviations: IL-1β, Interleukin-1 beta; IL-1Ra, Interleukin-1 receptor antagonist; K_D, Equilibrium dissociation constant; PMN, Polymorphonuclear neutrophil.
Human PMNs (10×10^6 cells/mL) were incubated with 0.12 nmol/L human ^{35}S-IL-1β in the presence of the indicated concentrations of unlabeled human IL-1β (full circles), anakinra (open circles), or rat recombinant IL-1Ra (squares). Estimated K_D values are 7.0 nmol/L for anakinra and 28 nmol/L for rat IL-1Ra. These estimates are based on a K_D of 0.3 nmol/L for the binding of ^{35}S-IL-1β to these cells as determined by Scatchard analysis of direct binding data (data not shown).

2.6.2.2.6　細胞培養に対するアナキンラの作用

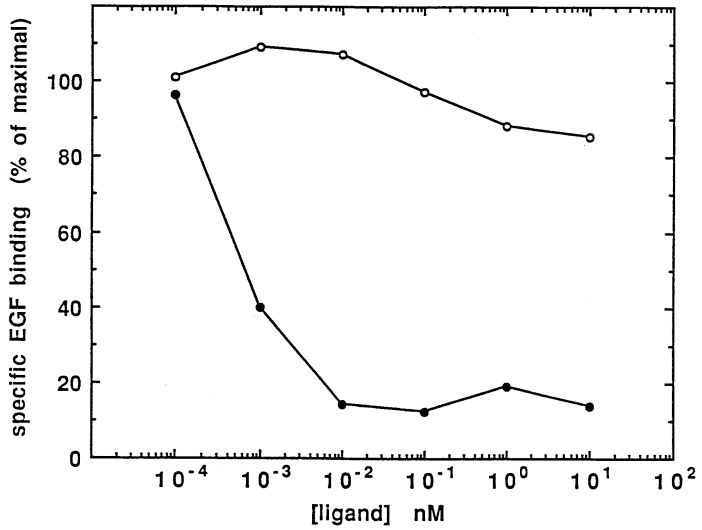
IL-1α 及び IL-1β とは対照的に、本薬は IL-1 受容体に結合しても検出可能な反応を標的細胞に惹起しない。IL-1 作用の初期段階であり、おそらく共通のステップと考えられるものに対する本薬の作用は以前から調査されている。

2.6.2.2.6.1　上皮細胞成長因子（EGF）受容体のリン酸化

IL-1 によって誘発される初期の細胞内現象の一つは、ヒートショックタンパク質 hsp27 又は EGF 受容体などの特定の基質をリン酸化するプロテインキナーゼ活性の誘発である（Bird 1990; Kaur 1989）。ホルモン誘発キナーゼ活性及びその後のタンパク質リン酸化は、一般的に受容体媒介シグナル伝達における重要な作用機序と考えられており、IL-1 誘発反応にとっても重要である可能性がある（O'Neill 1998; Gallis 1989; Hanks 1988; Mizel 1990）。EGF 受容体のリン酸化は、EGF に対する親和性の明らかなダウンモジュレーションを惹起し、4℃で細胞と結合した放射性標識 EGF 濃度の低下によってモニターできる（Bird 1989）。図 2.6.2-7 は、0.1 pmol/L~10 nmol/L の濃度の本薬で線維芽細胞をインキュベートしても、これらの細胞の EGF に対する結合能に影

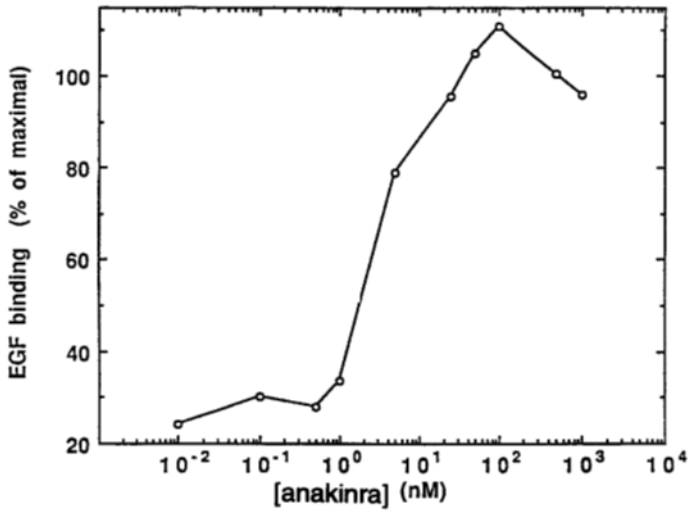
響しないことを示している。対照的に、10 pmol/L の IL-1α により EGF に対する結合が一時的に90%低下する。IL-1α による EGF 受容体の最大のダウンモジュレーションは、このサイトカインに曝露してから 15 分後に認められる。本薬によって EGF 受容体がダウンモジュレーションを示さないのは、単にキナーゼ活性誘発の時間経過の変化に起因するものではない。なぜなら、本薬に最大 2 時間曝露しても EGF 結合の低下は認められないからである。EGF 受容体のダウンモジュレーションに関与するリン酸化現象を本薬は誘発しないとの所見と一致して、IL-1α 誘発 EGF 受容体ダウンモジュレーションを本薬は用量依存的に阻害し得ることが判明した（図 2.6.2-8）。10 pmol/L の IL-1α による作用に対する本薬の 50%阻害作用は、約 3 nmol/L で観察され、この結果は IL-1α に対して本薬が 300 倍のモル濃度で過剰であることを示している。このことから、これら細胞表面上の受容体のごく一部が IL-1α によって占有されるだけでキナーゼ活性が誘発されることを示している。高濃度の本薬による EGF 結合のわずかな減少は、アッセイでの実験変動範囲内である。

図 2.6.2-7 アナキンラは ^{125}I-EGF の線維芽細胞に対する結合に影響しない



Source: (Dripps 1991a)
Abbreviation: EGF, Epidermal growth factor.
Confluent monolayers of fibroblast cells were incubated with the indicated concentrations of anakinra (○) or recombinant human IL-1α (•) for 15 minutes at 37°C. Cells were washed with cold binding medium, and incubated with 160 pmol/L ^{125}I-EGF for 3 hours at 4°C. Subsequently, cells were washed, solubilized, and counted. Maximal binding was 2757 cpm; nonspecific binding was 240 cpm.

図 2.6.2-8　アナキンラによる EGF 受容体の IL-1 誘発ダウンモジュレーションの阻害

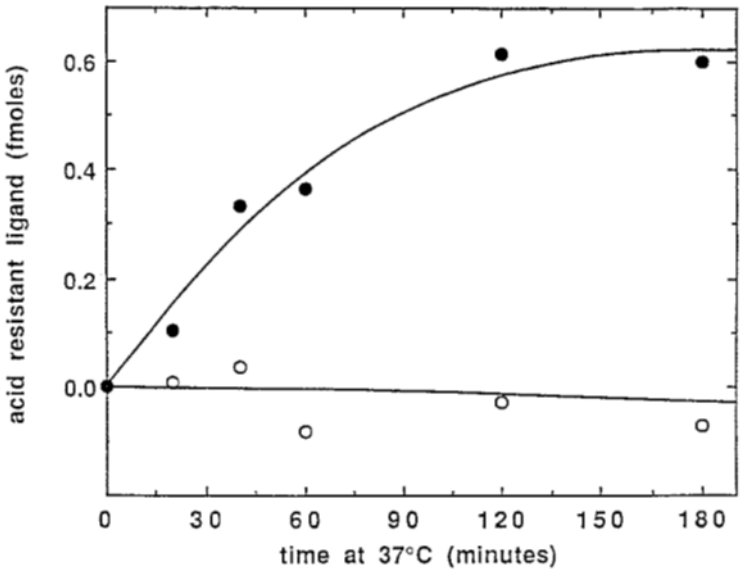


Source: Based on (Dripps 1991a)
Abbreviations: EGF, Epidermal growth factor, IL-1, Interleukin-1; IL-1α, Interleukin-1 alpha.
Fibroblast cells were preincubated with 10 pmol/L IL-1α and the indicated concentrations of anakinra for 15 minutes at 37°C. ^{125}I-EGF binding was determined as in Figure 7. Maximal ^{125}I-EGF binding was 1942 cpm with 236 cpm being nonspecific.

2.6.2.2.6.2　IL-1 及び IL-1 受容体の複合体の内在化

IL-1 の活性に重要と考えられる 2 つ目の初期現象は、IL-1 及び IL-1 受容体の複合体の内在化である（Curtis 1990; Mizel 1987）。内在化は 1～2 時間の半減期で起こり、結果として IL-1 は核内に局在化する（Lowenthal 1986; Qwarnstrom 1988）。IL-1 の内在化がシグナル伝達に重要であることを示唆する遺伝的証拠がある。IL-1 に結合するが内在化しないマウス T 細胞株の変異体は、サイトカインに対する生物学的応答を示さない（Falk 1989）。図 2.6.2-9 は、本薬及び IL-1 受容体の複合体がマウス T 細胞株によって積極的には内在化されないことを示している。同一細胞は、IL-1α 及び IL-1 受容体の複合体を約 1.5 時間の半減期で内在化し、報告されている値と一致する（Lowenthal 1986; Qwarnstrom 1988）。

図 2.6.2-9 ^{35}S-アナキンラは内在化しない



Source: (Dripps 1991a)
Abbreviation: IL-1α, Interleukin-1 alpha.
Internalization of ^{35}S-anakinra (open circles) and ^{125}I-L-1α (full circles) by T cells at 37°C. Plotted is the amount of radiolabeled ligand resistant to acid exposure over time at 37°C. Total bound fmol at time = 0 was approximately 1.46 fmol for both ^{35}S-anakinra and ^{125}I-IL-1α. Acid-resistant fmol was approximately 0.22 fmol for anakinra and approximately 0.015 fmol for IL-1α before incubation at 37°C; these values have been subtracted from each time point.

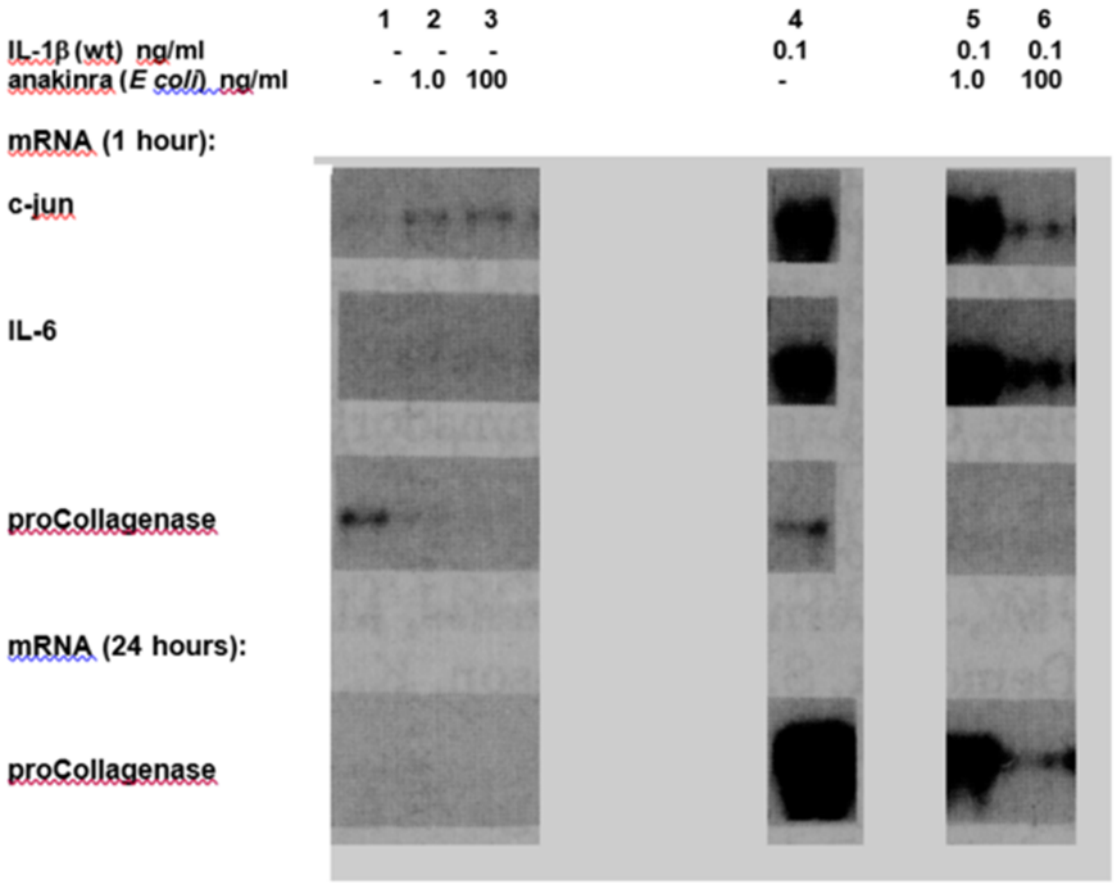
2.6.2.2.6.3 IL-1 の選択された細胞生理学的作用

上記で示した *in vitro* 試験は、リガンド受容体相互作用での数分又は数秒以内に発生する細胞内現象に対応している。多くの細胞に対する IL-1 の作用は、かなり後期に発生し、これらの早期現象の結果である可能性がある。検討した全ての作用は、この受容体拮抗薬によって阻害される（図 2.6.2-9）。これは、細胞に対する IL-1 の測定し得る全作用が、特定の IL-1 受容体を介して直接的又は間接的に媒介されることを示唆している。細胞に対して後期に発生する IL-1 の作用は本薬により阻害されるが、そのいくつかについて以下 2.6.2.2.6.4 項～2.6.2.2.6.12 項に示す。

2.6.2.2.6.4 *c-jun* の転写活性化

IL-1 の細胞に対する作用の一つとして、選択された遺伝子の転写を迅速に誘導することが挙げられる。例えば、線維芽細胞の転写活性化因子 *c-jun* をコードするメッセンジャーリボ核酸（mRNA）レベルの上昇は、IL-1 によって迅速に誘導される。*c-jun* の誘導は、後続するその他の多数の遺伝子誘導に関与し、最終的には細胞生理学で観察される IL-1 に対する複雑な生理学的応答を惹起すると提唱されている。Conca ら（Conca 1991）は、ヒト線維芽細胞培養において、IL-1β 誘導後 1 時間で *c-jun* 及び *IL-6* の転写を、IL-1β 誘導後 24 時間でプロコラゲナーゼの転写を本薬が阻害できることを示した（図 2.6.2-10；レーン 2、3、5 及び 6）。

図 2.6.2-10　IL-1 及び/又はアナキンラへ曝露後の線維芽細胞 mRNA のノーザンブロット解析



Source: (Conca 1991)
Abbreviations: IL-1, Interleukin-1; IL-1β, Interleukin-1 beta; IL-6, Interleukin-6; wt, Wild type.
Fibroblasts were exposed to IL-1β, anakinra, or both, at the doses indicated. mRNA was isolated after 1 hour for the evaluation of *c-jun* and *IL-6* expression, and after 24 hours for the analysis of pro-collagenase expression. Northern blots of the RNA were prepared, probed with labeled cDNA fragments of *c-jun*, *IL-6*, and procollagenase and exposed to film. The resultant image reveals that anakinra blocks IL-1 mediated induction of early (*c-jun, IL-6*) and late (pro-collagenase) gene induction.

2.6.2.2.6.5　IL-1 誘発胸腺細胞増殖作用に対する抑制

本薬は、IL-1α 及び IL-1β により誘発された C3H/HeJ マウス胸腺細胞の増殖を用量依存的に阻害した（Arend 1989; Arend 1990c）。IL-1α 及び IL-1β による増殖作用に対する 50%の阻害は、それぞれ約 2 ng/mL 及び 1 ng/mL の濃度の本薬で観察された。これらの濃度は、胸腺細胞を刺激時に使用した IL-1α 濃度の 40 倍及び IL-1β 濃度の 5 倍に相当する（Arend 1990c）。

2.6.2.2.6.6　培養液中の T リンパ球クローンに対するアナキンラの作用

特定の T 細胞クローンの増殖に対する本薬の作用は、指定した培養条件で正確に測定できる。

Chang ら（Chang 1990）は、B 細胞又はマクロファージが提示する特定抗原に反応するマウスヘルパーT（Th）細胞クローンの増殖に対する本薬の作用を評価した。培養液中で、抗原提示細

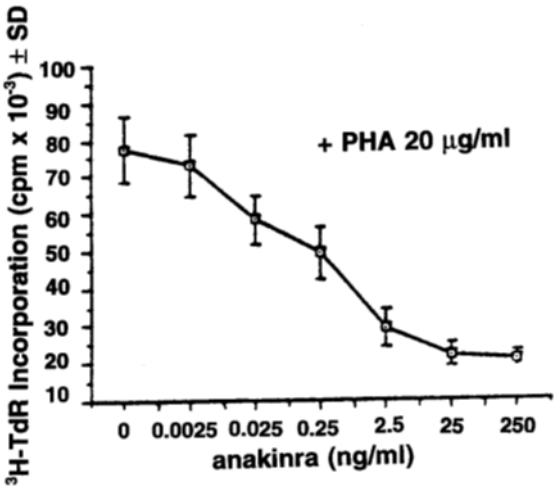
胞としてマクロファージを使用した場合、本薬は Th2 細胞の増殖をさまざまな程度で抑制した。Chang らにより本試験結果は、培養におけるこれらの細胞株の最大の増殖共刺激因子は、内因性に生成された IL-1 であることを示す証拠であると解釈された。本薬により Th2 細胞クローンの増殖を抑制できたが、これらの細胞による IL-4 産生増加は抑制しなかった。本薬により Th1 細胞株の増殖や IL-2 産生に対する影響は認められなかった。

Powers ら（Powers 1991）が実施した別試験もこの結果を裏付けている。抗原特異的又は同種異系刺激を使用して、D10.G4.1 細胞（Th2 細胞クローン）は Chang ら（Chang 1990）の試験結果と同様に反応し、本薬により外因性 IL-1 が存在しなくても増殖は減少した。同種異系増殖応答も同様に本薬により抑制された。同様に、増殖応答は完全には抑制されず、これらの細胞による IL-4 の産生は本薬によって抑制されなかった。

要約すると、本薬は培養における抗原誘発 Th2 細胞クローンの増殖を部分的に抑制したが、これらの細胞によるサイトカイン産生には影響を与えなかった。

別の報告（Conti 1991）では、分裂促進因子刺激アッセイにより本薬を評価した。ヒト末梢血単核細胞（PBMC）の培養液に、最大 250 ng/mL まで様々な濃度の本薬を添加した 30 分後又は 2 時間後にフィトヘマアグルチニン（PHA）で刺激した。本薬による用量依存的な ^{3}H チミジン取り込みの減少が観察され、最高濃度（250 ng/mL）で 70%の減少が認められた（図 2.6.2-11）。本薬を PHA と同時に添加した場合、わずかではあるが有意な増殖抑制が認められた。

図 2.6.2-11　アナキンラによる PHA 刺激 PBMC 増殖に対する抑制作用



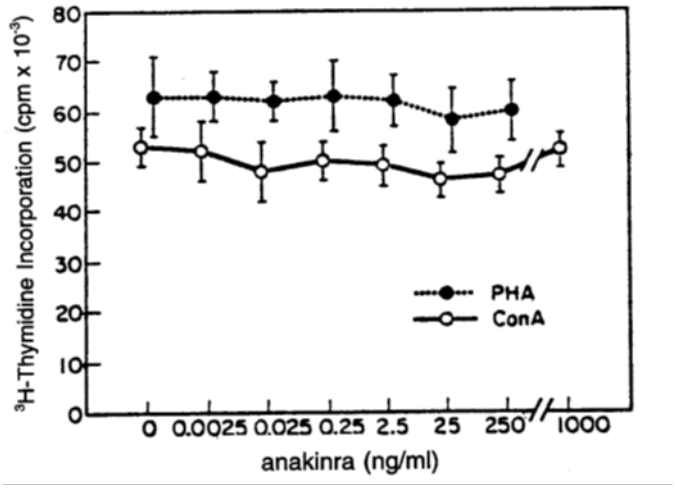
Source: (Conti 1991)

Abbreviations: PBMC, Peripheral blood mononuclear cells; PHA, Phytohemagglutinin; SD, Standard deviation; TdR, Radiolabeled thymidine.

[^{3}H]TdR incorporation (cpm × 10^{-3}) by lymphocytes stimulated with PHA (20 µg/mL) for 72 h and pretreated with increasing concentrations of anakinra for 30 min. The data are representative of 5 experiments and the values represent the mean ± SD of quadruplicate determinations. P values (Student's t test) are calculated by comparing anakinra + PHA treated cells with PHA alone (0). The only nonsignificant inhibition point was when PBMC were pretreated with the lowest concentration of anakinra (0.0025 ng/mL).

Nicod ら（Nicod 1992）は、分裂促進因子、可溶性抗原、又は同種異系決定因子で刺激した正常ヒト T 細胞培養に対する本薬の作用も検討した。リンパ球及び単球の両方を含む精製 PBMC を分裂促進因子である PHA 又はコンカナバリン A と共にインキュベートすると、その増殖が著しく増加した。上記試験とは対照的に、分裂促進因子と共に最大 1 μg/mL の本薬（分裂促進因子の 60 分前に添加した）とインキュベートしても、細胞増殖には影響は認められなかった（図 2.6.2-12）。この結果は、これら非特異的分裂促進因子は IL-1 に依存しない方法で T 細胞に作用することを示している。

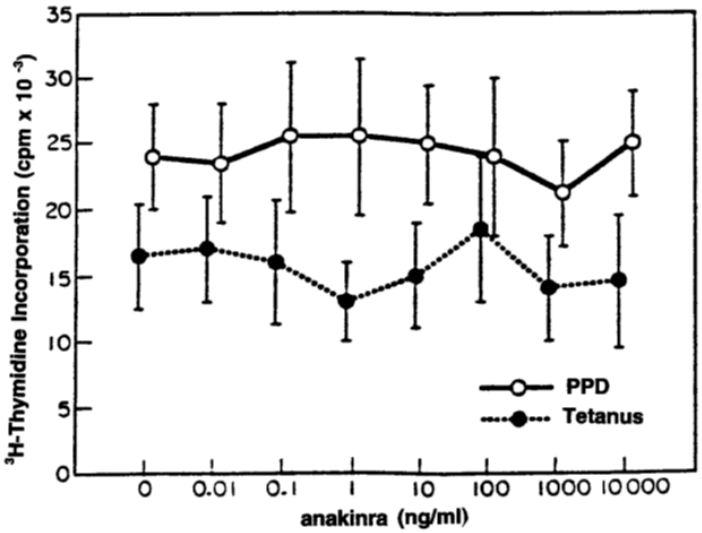
図 2.6.2-12　分裂促進因子誘発 T 細胞増殖に対するアナキンラの作用



Source: (Nicod 1992)
Abbreviations: ConA, Concanavalin A; PHA, Phytohemagglutinin.
Various doses of anakinra were added 60 minutes before the addition of 2.5 μg/mL of ConA or 20 μg/mL of PHA.

破傷風トキソイド又はツベルクリン精製タンパク質誘導体のいずれかの特定抗原を同様の PBMC 培養液に添加すると、細胞増殖の増加が認められた。増殖性の抗原と共に本薬をこれらの培養液に添加した場合、本薬の最高濃度が 10 μg/mL（分裂促進因子の 24 時間前に添加）であっても、これらの細胞における ^{3}H チミジン取り込みの増加には影響が認められなかった（図 2.6.2-13）。

図 2.6.2-13　抗原誘発 T 細胞増殖に対するアナキンラの作用



Source: (Nicod 1992)
Abbreviation: PPD, Purified protein derivative.
Various concentrations of anakinra were added 24 hours before antigen (Nicod 1992).

Nicod らは、2 人の異なるドナー由来の PBMC を共培養することによって、ヒト T 細胞の同種異系刺激（いわゆる混合リンパ球反応［MLR］）における IL-1 の役割も評価した。これらの培養条件下では、^{3}H チミジンの DNA への取り込みによって測定した場合、両方のドナー由来細胞の劇的な増殖応答が認められる。表 2.6.2-3 は、本薬を同種異系細胞の共培養の 30 分前に添加した場合、最大 10 μg/mL の濃度でこの細胞増殖の増加に影響を与えないことを示している。この試験結果は、*in vitro* でのヒト T 細胞増殖において IL-1 が最小限の役割しか果たさないことを示唆している。

表 2.6.2-3　アナキンラは MLR における同種異系 T 細胞増殖を抑制しない

Experiment	Anakinra (μg/mL)				
	0	0.01	0.1	1	10
	^{3}H-thymidine incorporation (cpm[a] × 10^{-3})				
1	22.5 ± 2.4	26.8 ± 1.6	32.9 ± 4.4	22.5 ± 2.3	24.6 ± 6.5
2	21.5 ± 7.2	18.7 ± 4.1	12.4 ± 2.0	18.8 ± 2.7	16.1 ± 3.8
3	7.0 ± 2.7	10.2 ± 1.3	10.9 ± 0.4	6.3 ± 2.1	9.2 ± 1.1
4	19.0 ± 5.1	28.2 ± 1.4	42.0 ± 1.7	34.5 ± 3.5	27.3 ± 6.7
5	12.6 ± 7.5	9.9 ± 2.8	18.6 ± 2.1	17.4 ± 3.4	19.1 ± 4.2
Mean ± SEM	16.5 ± 6.5	18.8 ± 8.7	24.4 ± 13.6	19.9 ± 10.1	19.3 ± 7.1

Source: (Nicod 1992)
Abbreviations: MLR, Mixed leukocyte reaction; PBMC, Peripheral blood mononuclear cells; SEM, Standard error of the mean.
PBMC from various donors were mixed at a ratio of 1:1 (2×10^4 cells/well). Anakinra was added 30 min before co-cultures were performed. Cells were pulsed with ^{3}H-thymidine on Day 5, 18 hours before harvesting (Nicod 1992).
[a] Results are expressed in cpm as means ± SEM of triplicates.

Fleming ら（Fleming 1991a; Fleming 1991b）によって、同種異系細胞、破傷風トキソイド及び PHA の刺激 3 剤を使用した同様の試験が示されている。同様に、これらの刺激条件下で PBMC に対する IL-1Ra の作用は観察されなかった。

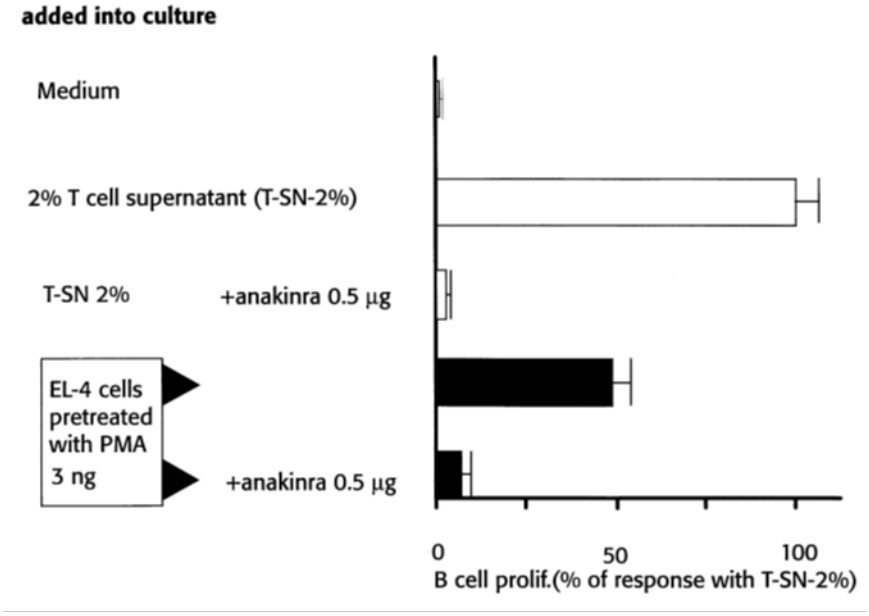
PHA に対する T 細胞の増殖反応が一部の試験では本薬により抑制され、他の研究者によっては作用が認められなかった理由は不明である。種々の試験における実験条件は非常に類似していた。これらの矛盾する結果に対する可能な説明として、これらの実験が PBMC を用いて行われたため、培養中に単球が存在するという事実に起因することが挙げられる。単球はエンドトキシンに非常に感受性があり、反応して他のタンパク質と共に IL-1β を分泌する。本薬が作用を示した試験で使用した試薬が少量のリポ多糖類（LPS）で汚染されていた場合、試験で培養中の単球が IL-1 を分泌するように刺激された可能性がある。IL-1 は T 細胞の増殖に強力な共刺激作用を示すため、単球が産生及び分泌した IL-1 を阻害することで、PHA 刺激による PBMC の増殖に対して本薬は抑制作用を示す可能性があるが、この作用は必ずしも *in vivo* での特定の免疫反応に関連するものではない。

IL-1 は MLR アッセイにおける T 細胞増殖の共刺激因子として使用でき、基本条件下よりも高いレベルの増殖を惹起する。Nicod ら（Nicod 1992）は、MLR において本薬が外因性 IL-1 により誘発された増殖のみを阻害し、IL-1 が存在しない場合の基本反応を阻害しないことを示した。したがって、IL-1 は MLR において T 細胞の増殖を増加させることができるが、本来の MLR には必須ではないことが示唆されている。Powers ら（Powers 1991）によっても同様の所見が示されている。

2.6.2.2.6.7　B 細胞増殖に対するアナキンラの *in vitro* での作用

B 細胞の増殖は、活性化 T 細胞（主に Th2 系統）との接触又はサイトカインへの曝露、又はその両方によって刺激される。*In vitro* で B 細胞の増殖に対する本薬の作用に関する論文が 1 報ある（Tucci 1992）。図 2.6.2-14 は、本薬が少なくとも部分的に、精製ヒト B 細胞の増殖を抑制できることを示している。この試験は、^{3}H チミジン取り込みにより測定し、2 種類の方法のいずれかで精製ヒト B 細胞を刺激した。活性化ヒト T 細胞由来のサイトカイン混合物又は活性化後に照射処理したマウス T 細胞株 EL-4 により誘導した B 細胞の増殖を本薬は阻害した。

図 2.6.2-14　B 細胞増殖に対するアナキンラの作用



Source: (Tucci 1992)
Abbreviations: PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate; prolif., Proliferation; SEM, Standard error of the mean; T-SN, T cell supernatant.
The black bars show partial inhibition by anakinra of B-cell proliferation in cultures with 300 B cells and 50000 PMA-preactivated EL-4 cells, indicated concentrations are per mL. Mean data from 3 experiments for each culture condition are presented and error bars represent 1 SEM value.

2.6.2.2.6.8　NK 細胞に対するアナキンラの *in vitro* での作用

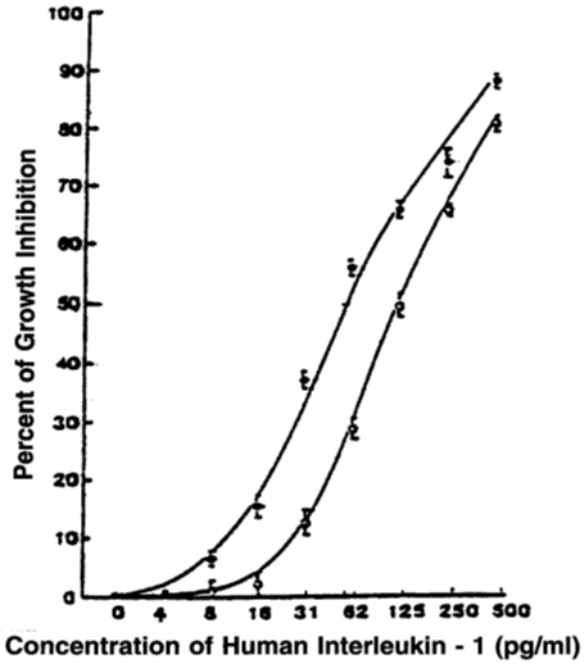
ナチュラルキラー（NK）細胞は、表面免疫グロブリン及び T 細胞受容体のいずれも発現せず、非抗原特異的な方法で細胞殺傷を行うリンパ球である。これらの細胞は、例えば腫瘍細胞に対して活性を示し、この活性は IL-2 やγインターフェロンなどのサイトカインによって増強される。外因性 IL-1 は、特定の種類の腫瘍細胞に対する NK 細胞の細胞傷害活性に影響しない（Lauzon 1991）。ヒト T 細胞白血病由来の MOLT-4 細胞株に対する NK 細胞の IL-2 媒介細胞傷害性を IL-1Ra は増強したが（Conti 1992）、IL-2 非存在下では NK 細胞に影響しなかった。

リンホカイン活性化キラー（LAK）細胞は NK 細胞と同じ特性をいくつか示し、実際には NK 細胞から派生したものである可能性がある。Fujiwara 及び Grimm（Fujiwara 1992）は、IL-1（IL-1α 又は IL-1β のいずれか）が LAK 活性の共刺激因子として作用できることを示した。彼らはまた、IL-2 で処理した LAK 細胞の NK 抵抗性腫瘍細胞株 DAUDI 細胞に対する溶解活性が本薬（10～1000 ng/mL の濃度）により 30～50%減少したことを示した。本薬は、末梢血リンパ球培養での IL-2 誘発増殖には影響しないにもかかわらず、腫瘍細胞殺傷活性に対してこの作用を示した。著者らは、IL-1 が *in vitro* での LAK 細胞の産生に寄与していると結論づけた。この現象が *in vivo* での病原体又は腫瘍形成に対する免疫反応の正常な調節に役割を果たしているかどうかは不明である。

2.6.2.2.6.9 ヒトメラノーマ細胞株における細胞毒性

IL-1 は多くのヒトがん細胞に対して細胞毒性を示すことがある。この種の細胞の一例がヒトメラノーマ細胞株 A375 である。IL-1 とインキュベートすると、これらの細胞は死滅する（図 2.6.2-15）（Nakai 1988）。

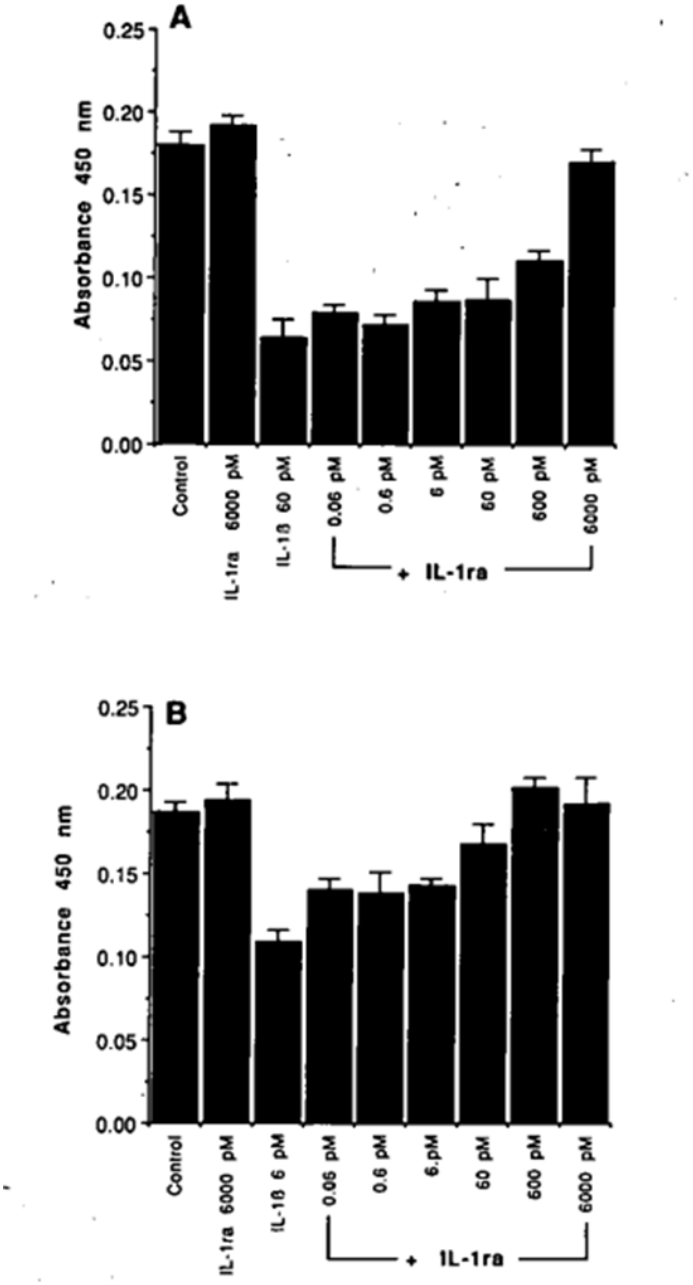
図 2.6.2-15 ヒトメラノーマ A375 細胞の増殖抑制アッセイによって得られたヒト遺伝子組換え IL-1 の用量反応曲線



Source: (Nakai 1988)
Abbreviations: IL-1, Interleukin-1; IL-1α, Interleukin-1 alpha; IL-1β, Interleukin-1 beta.
The IL-1α (○) and the IL-1β (●) standard were serially 2 fold diluted on micro culture plates containing 2×10^3 A375 cells in 100 μL seeded in each well and cultured for 96 hours. Neutral red solution was added to each well and cultured for an additional 1 hour. Each point and vertical line show the mean and standard error of triplicate samples. Results were expressed as percent of maximal neutral red uptake.

IL-1Ra の濃度が IL-1 の 100 倍の場合、IL-1 による細胞致死作用を完全に抑制する（図 2.6.2-16）。

図 2.6.2-16　IL-1Ra は A375 細胞に対する IL-1 の細胞致死作用を抑制する



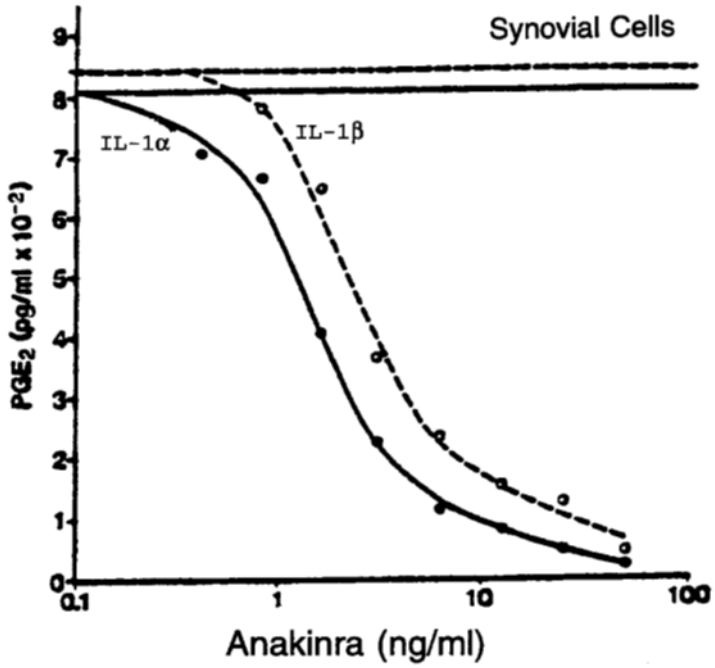
Source: (Baumann 1993)
Abbreviations: IL-1, Interleukin-1; IL-1β, Interleukin-1 beta; IL-1ra, Interleukin-1 receptor antagonist.
Effect of increasing doses of IL-1Ra on A 60 pmol/L and B 6.0 pmol/L recombinant human IL-1β.

2.6.2.2.6.10　IL-1 誘発プロスタグランジン及びコラゲナーゼ産生に対する抑制作用

本薬は、ヒト包皮線維芽細胞による IL-1 誘発プロスタグランジン E_2（PGE_2）合成を抑制し、ヒト滑膜細胞及びウサギ関節軟骨細胞における IL-1 誘発生物学的反応も用量依存的に抑制した（Eisenberg 1990; Arend 1990c）。滑膜細胞を IL-1α 又は IL-1β とインキュベートすると、これらの

細胞は PGE_2 を培地中に放出する。このプロスタグランジン放出は、本薬を同時に添加することで完全に抑制される（Arend 1990c）。図 2.6.2-17 は、固定した濃度の IL-1α 又は IL-1β の存在下でこれらの細胞に対する本薬の用量反応を示している。これら IL-1α 及び IL-1β の濃度は、滑膜細胞を刺激するのに要する IL-1α 濃度の 30 倍及び IL-1β 濃度の 10 倍に相当する。本薬は、ヒト滑膜細胞によるコラゲナーゼ産生を同様に抑制した。ウサギ軟骨細胞による産生に対する抑制には、より高濃度の本薬を必要とした。具体的には、IL-1α 誘発 PGE_2 産生を 50%抑制するために 5.7 ng/mL、IL-1β 誘発 PGE_2 産生を 50%抑制するために 15.5 ng/mL の本薬が必要であった。本薬は、5～1000 ng/mL の濃度で、ウシ、マウス及びラットの摘出結合組織に対する IL-1 の作用も抑制した（Seckinger1990; Carmichael 1989）。

図 2.6.2-17　培養接着ヒト滑膜細胞における IL-1 誘発 PGE_2 産生に対するアナキンラの抑制作用



Source: Based on (Arend 1990c)
Abbreviations: IL-1, Interleukin-1; IL-1α, Interleukin-1 alpha; IL-1β, Interleukin-1 beta; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; PGE_2, Prostaglandin E_2.
Synovial cells were incubated in the presence of increasing amounts of anakinra with 3 U/mL of IL-1α (●), or β (○) for 16 hours. PGE_2 concentrations in cell supernatants were determined by ELISA. The data are expressed as pg per mL PGE_2 produced versus ng per mL anakinra present during culture. The horizontal lines represent the baseline levels of IL-1 induced PGE_2 production. Representative results are shown from 1 of 3 experiments.

2.6.2.2.6.11　白血球増殖に対する抑制作用

慢性骨髄性白血病患者由来の腫瘍細胞は、造血コロニー増殖活性を有しており、IL-1Ra はこの活性を濃度依存的に低下させる。IL-1Ra は 500 ng/mL の濃度で最大 65%の抑制率で抑制作用を示す（Estrov 1991）。急性骨髄性白血病患者から単離した白血病芽球細胞では、50 ng/mL の本

薬を添加することで、自然細胞増殖及びIL-1で刺激した細胞増殖を最大85%まで抑制することが可能である（Rambaldi 1993）。

2.6.2.2.6.12　細胞培養におけるアナキンラ活性の概要

表 2.6.2-4は、本薬が *in vitro* でIL-1活性に対する抑制能を示す多数の試験の概要を示す。ごくわずかな例外（Kilian 1991; Smith 1991; Carter 1990及びBaumann1993）を除いて、これまでに研究された全てのIL-1の *in vitro* 作用は本薬によって抑制されている。混合培養におけるヒト脱落膜細胞は、IL-1βに反応してPGE_2を産生する。Mitchellら（Mitchell 1993）は、IL-1Raがこれらの細胞によるIL-1β誘発PGE_2産生を抑制できないだけでなく、IL-1Ra自体がPGE_2産生を誘発することを報告している。これらの試験（Kilian 1991; Smith 1991; Carter 1990; Baumann 1993及びMitchell 1993）で使用したIL-1Raは[redacted]又は[redacted]で製造したものではないため、調製物の純度又は結果の意味を判断することは困難である。

表 2.6.2-4　アナキンラが抑制するIL-1の *in vitro* 作用

IL-1 activity	References
Lymphocyte proliferation	(Eisenberg1990); (Arend 1998); (McIntyre 1991)
Collagenase production by rabbit chondrocytes	(Arend 1990b)
Collagenase production by human dermal and synovial fibroblasts	(Burger 1995)
PGE_2 synthesis in fibroblasts and synovial cells	(Hannum 1990); (Arend 1990b); (Burger1995)
Bone resorption in mice and rats	(Seckinger 1990)
Cartilage matrix degradation	(Smith 1991) [IL-1Ra]
Adhesiveness of endothelial cells for neutrophils and eosinophils	(Eisenberg 1989); (Carter 1990) [IL-1Ra]
Synthesis of IL-1, TNF, IL-6, and GM-CSF by monocytes	(Granowitz 1991)
Antiproliferative effect on a human ovarian carcinoma cell line	(Kilian 1991) [IL-1Ra]
Cytocidal effect on a human melanoma cell line	(Baumann 1993) [IL-1Ra]
Induction of *fos* and *jun* expression	(Conca 1991)
Induction of fibroblast metalloproteinase expression	(Conca 1991)
Induction of NF-κB expression in B and T cells	(Stylianou 1992)

Abbreviations: GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL-1, Interleukin-1; IL-6, Interleukin-6; NF-κB, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; PGE_2, Prostaglandin E_2; TNF, tumor necrosis factor.

2.6.2.2.7 アナキンラの *in vivo* 作用

2.6.2.2.7.1 *In vivo* での IL-1 作用に対するアナキンラの抑制作用

動物において IL-1 投与により惹起される病態生理学的反応を本薬は大幅に低下させる。これらの反応には、IL-6 及び急性期反応物質の生成、好中球遊走、好中球数増加、血圧低下、白血球数減少、肺炎及び神経行動の異常などが含まれる。

ウサギの膝に 25 ng の IL-1β を関節内投与して誘発した滑膜炎及び関節軟骨プロテオグリカンの損失は、1 時間前及び 4 時間後に 3 mg/kg の IL-1Ra を静脈内投与することにより抑制された（Henderson 1991）。

ウサギに遺伝子組換えヒトインターロイキン-1 アルファ（r-HuIL-1α）を皮下投与すると、好中球が皮内部位に遊走する。本薬の投与によりこの好中球反応を抑制した 1.4×10^{-14} mol/site の本薬の同時投与により、5.3×10^{-12} mol/site の r-HuIL-1α による刺激から注射部位を 4 時間超保護した（Von Uexkull 1992）。

ウサギに 15 µg/kg の遺伝子組換えヒトインターロイキン-1 ベータ（r-HuIL-1β）を静脈内投与する直前に 4 mg/kg の本薬を静脈内投与すると、血圧低下、白血球減少及びその後の白血球増加を阻止した（Ohlsson 1990; Ohlsson 1989）。ウサギに r-HuIL-1β を投与後 3 時間に投与した本薬は、r-HuIL-1β 投与による作用の一部しか抑制しなかった。

r-HuIL-1β はラットに気管内投与すると、肺の急性好中球性炎症を惹起した。r-HuIL-1β と同時に 500 µg の本薬を気管内投与すると、肺における好中球の蓄積を 95%抑制した（Ulich 1991）。

Bluthé らが実施した試験では、ラットに IL-1α 又は IL-1β を腹腔内投与すると、著明な社会行動の変化、及び摂食行動の指標である体重減少が認められた（Bluthé 1991）。IL-1β の投与は IL-1α 投与に比べて明らかに強い効果を示した。

一般に、摂食量低下は細菌感染後によく見られる現象であり、これは、グラム陰性菌の LPS や LPS 活性化マクロファージから放出される炎症性サイトカインである IL-1β を末梢投与することで再現される。また、脳室内投与の IL-1β でも、摂食量低下を含む病的生理及び行動が再現される（Bluthé 1997; Kent 1992）。

Kent らの研究によると、組換えヒト IL-1β 投与によるラット体温上昇及び酸素消費量増加は、IL-1Ra によって遮断されたが、この抑制作用がみられたのは両方を腹腔内投与した時のみであった（Kent 1992）。一方、IL-1β と IL-1Ra を同じ経路（腹腔内又は脳室内）で投与した場合には、IL-1Ra は、IL-1β による摂食動機づけ行動及び社会的探索行動の低下を抑制した。さらに、IL-1β の腹腔内投与と IL-1Ra の脳室内投与との組み合わせでは、社会的探索行動の低下は遮断されたが、摂食動機づけ行動の低下は部分的に抑制されたのみであった。

最近の Chaskiel らの研究では、視床下部弓状核（ARH）が摂食調節に重要な役割を果たすことが示されている（Chaskiel 2019）。ARH は IL-1RI を発現しているが、Chaskiel らは、IL-1β 又

はLPSをラットに投与することで、IL-1β末梢投与による摂食抑制作用にはARHが介在するが、LPSによる作用には介在しないことを示した。この試験において、Chaskielらは海馬のIL-RI発現ニューロンを障害するためにIL-1β-サポリン複合体を用いた。すなわち、IL-1β及びLPSの全身投与の前にIL-1β-サポリン複合体をARHにマイクロインジェクションすると、ニューロペプチドY含有細胞が失われ、IL-1β腹腔内投与による摂食低下及び体重減少作用は軽減するが、LPSによる作用は影響されないことを示した。この研究では、IL-1βの腹腔内及び脳室内投与が行われている。

2.6.2.2.7.2　動物モデルにおける関節炎に対するアナキンラの作用

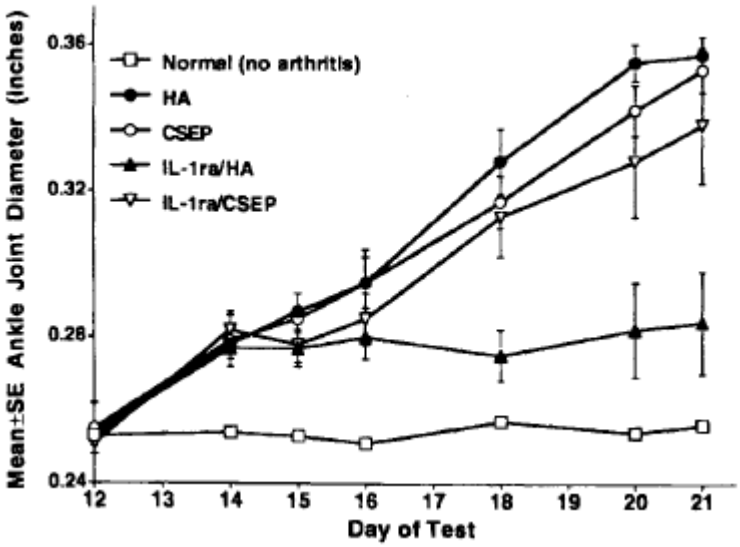
IL-1及び腫瘍壊死因子アルファ（TNFα）は、関節リウマチにおける重要なメディエーターである（Arend 1990a; Brennan 1991; Feldmann 1996; Feldmann 1998）。同様に、両方のメディエーターは関節炎の動物モデルにも関与している（van den Berg 1998）。IL-1の投与により関節炎の発症を促進する（Hom 1988; Hom 1990）。ほとんどのモデルでは、抗IL-1又は抗TNF治療によって炎症反応を完全に抑制したが、Lewisラットを用いたマイコバクテリア誘発アジュバント関節炎などの他のモデルでは、抗IL-1及び抗TNF治療のいずれも疾患を完全に抑制することはできなかった。抗IL-1及び抗TNF治療を併用すると、相加作用又は相乗作用が得られることがある。一部のモデルでは、炎症並びに骨及び軟骨の保護に対する抗IL-1及び抗TNFの作用を区別することが可能である（van den Berg 1998）。

2.6.2.2.7.3　ラットコラーゲン誘発関節炎における徐放性溶媒の影響

ラットⅡ型コラーゲン関節炎は、ラットに同種又は異種のⅡ型コラーゲンを用いて免疫することにより発症する関節リウマチの動物モデルである。本モデルにより発症する多発性関節炎は、関節表面への免疫複合体沈着を伴う著明な軟骨破壊、骨吸収、骨膜増殖、並びに中等度から重度の滑膜炎及び関節周囲の炎症を特徴とする（Trentham 1977）。

水溶性溶媒としてエチレンジアミン四酢酸及びポリソルベート含有クエン酸緩衝生理食塩液（CSEP）、徐放性溶媒としてヒラン液（HA）を配合した本薬について比較した（Bendele 1998）。CSEPを配合した本薬とは対照的に、HAを配合した本薬の100 mg/kgを毎日皮下投与すると、足蹠浮腫が74%抑制され（図 2.6.2-18）、顕微鏡による評価で軟組織及び骨格構造に対する広範な保護作用が確認された。

図 2.6.2-18　雌の Lewis ラットを用いた II 型コラーゲン関節炎の肢関節直径に対して連日皮下投与した、CSEP を配合したアナキンラ及び HA を配合したアナキンラの作用



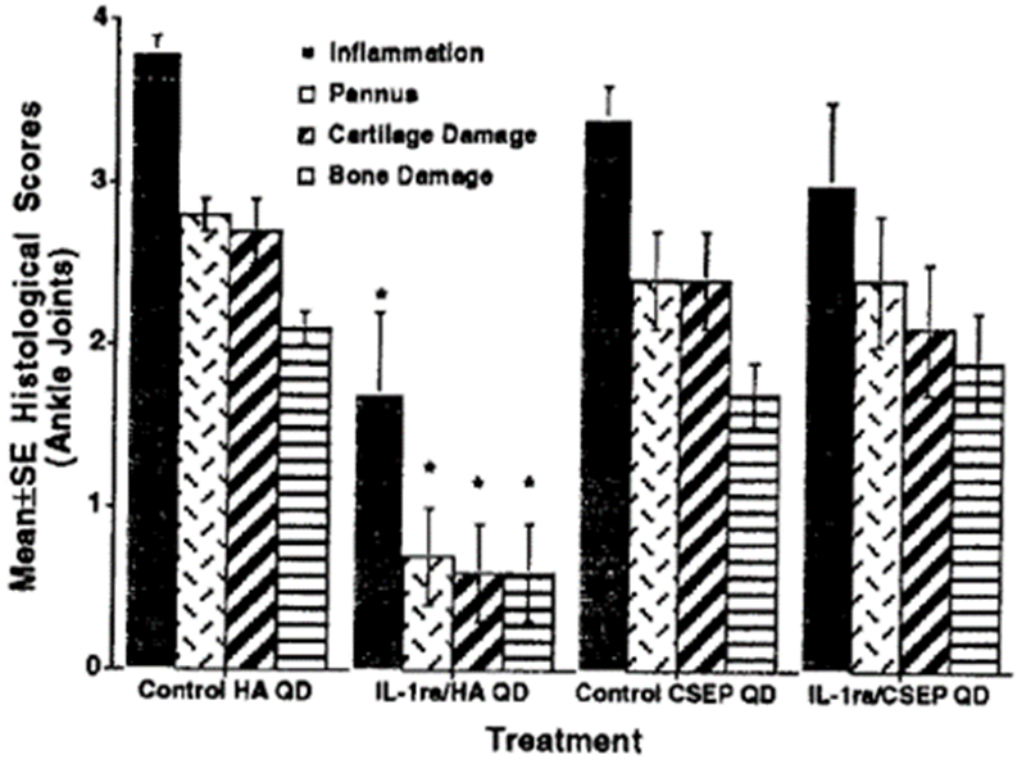
Source: (Bendele 1998)

Abbreviations: ANOVA, Analysis of variance; CSEP, Citrate-buffered saline with EDTA and polysorbate; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; HA, Hylan fluid; IL-1ra, Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra refers to anakinra); s.c., Subcutaneous; SEM, Standard error of the mean.

Lewis rats were injected with bovine type II collagen in incomplete Freund's adjuvant s.c. on Days 0 and 7. Anakinra was administered by daily s.c. injection starting on the day of onset of clinical signs of arthritis (Days 13 to 15). Anakinra was dosed at 100 mg/kg/day in either an HA or CSEP vehicle. Anakinra (100 mg/kg/day) in HA vehicle was effective in significantly inhibiting paw swelling ($p < 0.05$, ANOVA). Symbols represent the mean ± SEM for 8 animals per group.

炎症、パンヌス、骨及び軟骨の破壊など関節破壊の全ての組織学的パラメーターは、HA を配合した本薬の投与で有意に減少した（図 2.6.2-19）。HA を配合した本薬を 100 mg/kg で 2 日毎に皮下投与すると、関節炎を 62%抑制し、同製剤を 3 日毎に投与すると 19%の抑制を示した（図 2.6.2-20）。

図 2.6.2-19　雌の Lewis ラットを用いた II 型コラーゲン関節炎の組織学的スコアに対して連日皮下投与した、CSEP を配合したアナキンラの作用対 HA を配合したアナキンラの作用



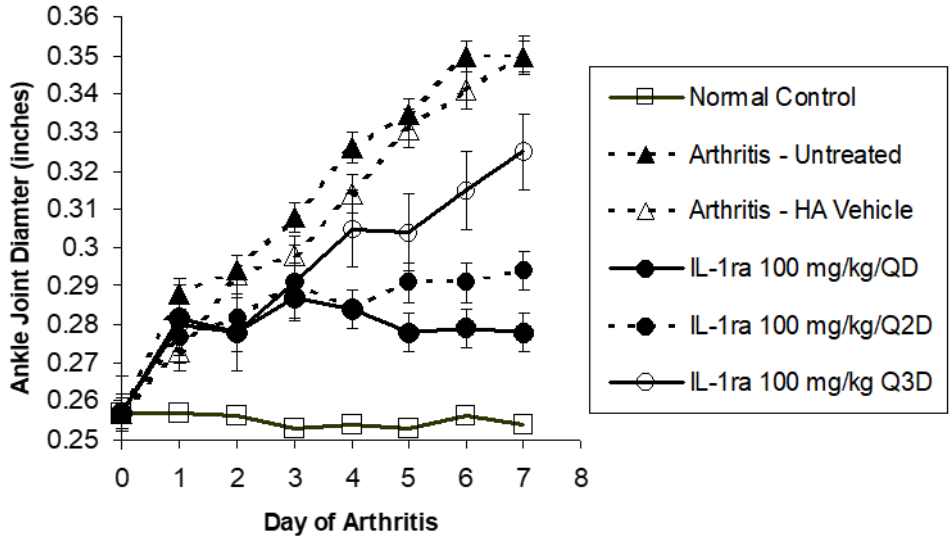
Source: (Bendele 1998)

Abbreviations: CSEP, Citrate-buffered saline with EDTA and polysorbate; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; HA, Hylan fluid; IL-1ra, Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra refers to anakinra); QD, Once daily; s.c., Subcutaneous; SE, Standard error.

Lewis rats were injected with bovine type II collagen in incomplete Freund's adjuvant s.c. on Days 0 and 7, and with endotoxin on Day 12. Anakinra was administered by daily s.c. injection starting on the day of onset of clinical signs of arthritis (Days 13 to 15). Rats were euthanized 7 days following onset of arthritis. Hind paws were processed for histology (hematoxylin and eosin stain for general evaluation of inflammation and bone damage, or toluidine blue stain for evaluation of cartilage changes). All lesions (inflammation, pannus, bone destruction, and cartilage degeneration) were scored separately in axial paw sections through the tibiotarsal joint. Histopathology scoring criteria: 0 = absent, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, and 4 = marked. N=8 rats per treatment group.

*$p \leq 0.05$, Two tailed t-test, compared to the corresponding arthritis control.

図 2.6.2-20　雌の Lewis ラットを用いた II 型コラーゲン関節炎での肢関節直径に対して皮下ボーラス投与した、HA を配合したアナキンラの作用



Source: (Bendele 1998)
Abbreviations: HA, Hylan fluid; IL-1ra, Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra refers to anakinra); QD, Once daily; Q2D, Every other day; Q3D, Every 3 days; s.c., Subcutaneous; SEM, standard error of the mean.
Lewis rats were injected with bovine type II collagen on Days 0 and 7. Anakinra was administered by daily s.c. injection starting on the day of onset of clinical signs of arthritis (Days 13 to 15). Anakinra given at 100 mg/kg every day or 100 mg/kg every second day in HA vehicles was effective in significantly inhibiting paw swelling ($p > 0.05$ Students t-test). Symbols represent the mean ± SEM for 8 animals per group.

2.6.2.2.7.4　ラット及びマウスを用いた連鎖球菌細胞壁誘発関節炎

精製ペプチドグリカンポリ多糖類（PG-PS）ポリマーを A 群連鎖球菌細胞壁から単離し、肢関節内に投与してラットに誘発した滑膜炎は、24 時間でピークに達し、その後数日間で減退する（Esser 1985）。1～8 週間後に通常の関節炎誘発量以下の PG-PS 又はリポ多糖を静脈内投与すると、肢関節の炎症が再活性化され、著しい腫れと関節破壊を惹起する（Esser 1985; Stimpson 1987）。PG-PS ポリマーによる関節炎再燃モデルを用いたラット試験において、PG-PS ポリマーポリマー投与時に 2 mg/kg の遺伝子組換えヒトインターロイキン-1 受容体拮抗薬（rhIL-1Ra）を投与し、その後 84 時間にわたり 6 時間間隔で投与した場合、関節腫脹の増加は最大 64%抑制され、再燃後最初の 5 日間における平均抑制率は 55%であった。また、投与間隔を 12 時間とした場合、再燃誘発時に初回投与を行った場合、さらに IL-1Ra の投与量を 8 mg/kg とした場合にも、関節腫脹は有効に抑制された（Schwab 1991）。同様に、本薬を 8 mg/kg でラットに 1 日 2 回皮下投与すると、PG-PS を漿膜下に投与した後の肢関節のサイズが顕著に減少した（Stimpson 1987）。

マウスの連鎖球菌細胞壁誘発性関節炎において、本薬及び抗 IL-1 抗体の投与により、関節炎発症マウスから採取した膝蓋骨を *ex vivo* で培養して測定した軟骨細胞のプロテオグリカン合成阻害が抑制されたが、TNF 抗体投与では抑制されなかった（Kuiper1998）。

2.6.2.2.7.5　マウスを用いた抗原及びコラーゲン誘発関節炎

IL-1 抑制作用は、いくつかの関節炎マウスモデルで検討されている（van Lent 1995; Joosten 1996; Wooley 1993）。抗原誘発関節炎マウスに IL-1Ra（約 1.5 mg/kg/hour）を投与すると、関節炎関連の軟骨プロテオグリカン合成抑制に対して 100%の抑制作用を示した（van de Loo 1995b）。このモデルでは、IL-1Ra を使用した IL-1 抑制作用によって急性炎症を抑制しなかったが、慢性炎症をわずかに抑制した。

免疫複合体関節炎を示すマウスでは、IL-1Ra を持続注入（約 1.7 mg/kg/hour）で投与すると、炎症誘発性軟骨プロテオグリカン合成抑制を完全に抑制した（van Lent 1995）。このモデルでは、IL-1Ra 投与により、浮腫（80～90%）及び関節の炎症細胞浸潤を抑制した。

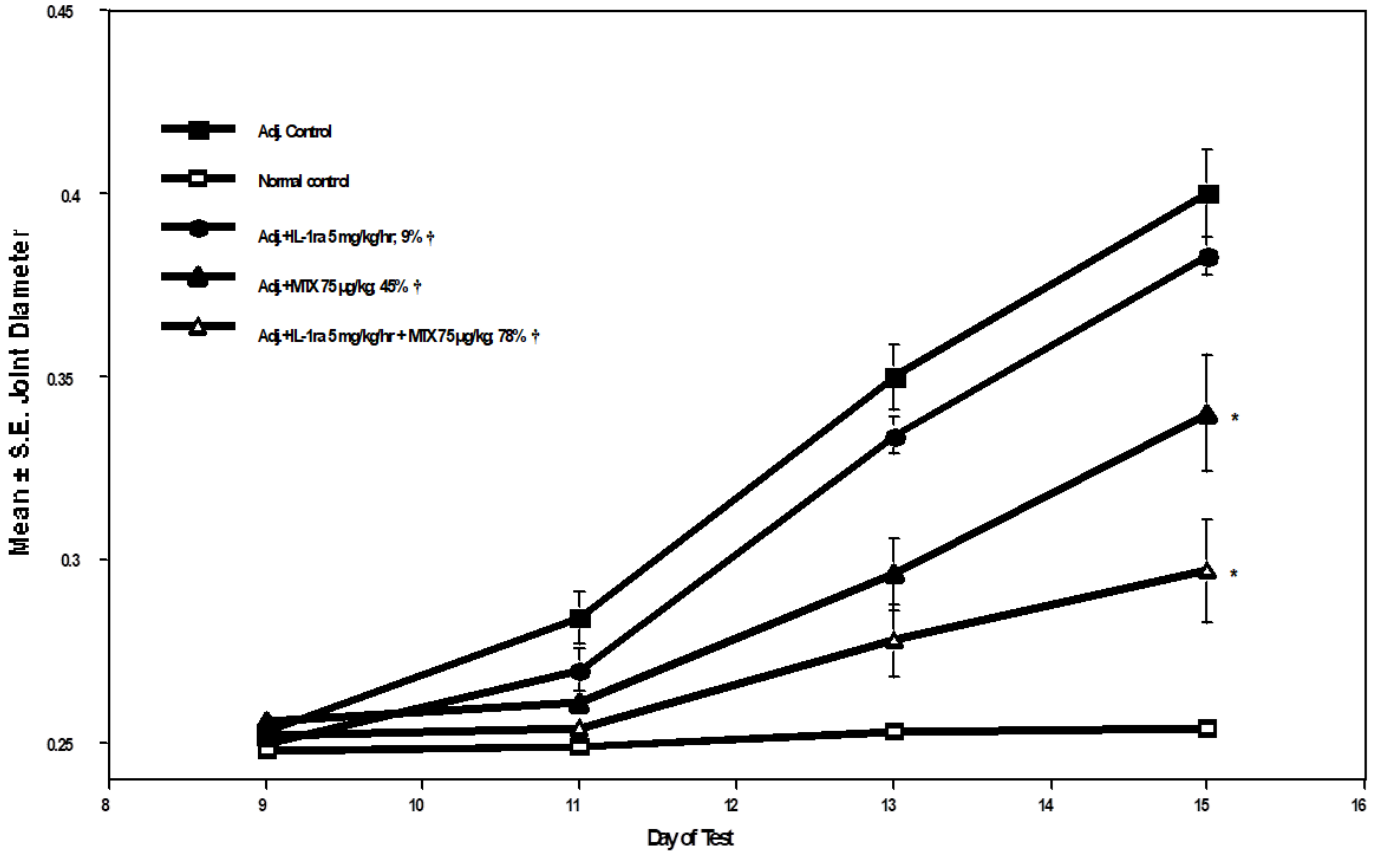
最も劇的な IL-1 抑制作用が観察されたマウスモデルは、II 型コラーゲン関節炎である。IL-1 抗体投与は、予防的投与の場合、関節炎の発症を著しく抑制する（Joosten 1996）。ラットコラーゲン関節炎モデルで以前に確立された結果と同様の結果が、既に発症したマウスコラーゲン関節炎でも IL-1Ra を持続投与した動物で観察されている（Joosten 1996 参照）。このモデルでは、II 型コラーゲン疾患の全ての側面、すなわち一般状態、軟骨の代謝的健全性及び組織に IL-1 抑制が効果的である。

II 型コラーゲン誘発関節炎に対する DBA/1 マウスの感受性は、IL-1Ra を異常発現させたトランスジェニックマウスでは変化する（Ma 1998）。IL-1Ra を過剰発現するマウスでは、関節炎の発生率及び重症度が顕著に減少した。対照的に、IL-1Ra の欠損マウスは、関節炎の発症が顕著に早く、重症度が悪化した。

2.6.2.2.7.6　ラットアジュバント誘発関節炎

アジュバント関節炎ラットにおける本薬と MTX の併用作用を評価した（Bendele 1999）。75 μg/kg/日の MTX 投与により、骨髄を抑制せずにアジュバント関節炎ラットの足蹠浮腫に対して軽度から中等度の抑制を示した。したがって、この試験は、本薬と MTX の併用投与が各薬剤の単独投与よりも大きな作用を示すか判断するために実施した（図 2.6.2-21）。アジュバント関節炎ラットに 5 mg/kg/hour の持続静脈内投与で 8 日目から 15 日目にかけて本薬を投与し、0 日目から 15 日目にかけて 75 μg/kg/日の MTX を経口投与した。足蹠浮腫に対する抑制作用は、本薬単独投与では 9%であり、MTX 単独投与では 45%、本薬及び MTX の併用投与では 78%であった（Bendele 1999）。

図 2.6.2-21　雄の Lewis ラットを用いたアジュバント関節炎に対するアナキンラ（5 mg/kg/hour、8 日目から 15 日目まで）の持続静脈内投与及びメトトレキサート（75 μg/kg、0 日目から 15 日目まで）の連日経口投与の作用



Source: (Bendele 1999)

Abbreviations: Adj., Adjuvant arthritis; ANOVA, Analysis of variance; AUC, Area under the curve; CFA/LA, Complete Freund's Adjuvant/Lipoidal amine; IL-1ra, Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra refers to anakinra); MTX, Methotrexate; s.c., Subcutaneous.

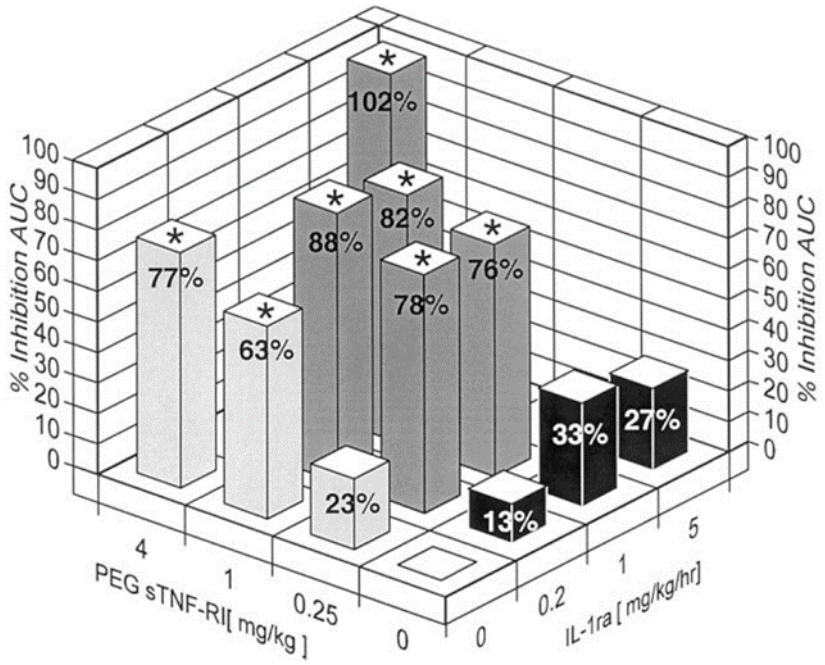
Adjuvant arthritis was induced by s.c. injection of CFA/LA. Rats were treated from Days 9 to 15 by continuous infusion of IL-1Ra. N=7 rats per group.

*p < 0.05 ANOVA on AUC for Adj.

† % = inhibition from adjuvant arthritis control.

IL-1 及び TNFα は、Lewis ラットのアジュバント関節炎に関与している。したがって、マイコバクテリアで誘発したアジュバント関節炎を示す Lewis ラットに、本薬（持続静脈内投与）及び PEG-sTNF-RI（皮下投与）を併用投与した。0.2 mg/kg/hour の本薬又は 0.25 mg/kg の PEG-sTNF-RI を投与しても、アジュバント関節炎ラットの炎症、体重減少及び骨密度減少を抑制しない。しかし、これらの低用量の併用投与により、炎症（足蹠浮腫）を 78 ± 10%、骨密度減少を 64 ± 14%抑制した（図 2.6.2-22 及び図 2.6.2-23）。低用量での足蹠浮腫に対する併用投与の作用は非常に顕著であり、相乗作用を示した。高用量の本薬（5 mg/kg/hour）及び PEG-sTNF-RI（4 mg/kg）の併用投与により、疾患を完全に抑制した。これらのラットの運動性、肢の体積、体重（図 2.6.2-24）及び骨密度は、正常な対照ラットと同等であった。これら 2 つの薬剤の種々組み合わせで認められた顕著な骨保護作用（骨密度の X 線評価によって定義される）は、顕微鏡評価でも観察された。盲検パラダイムを使用した組織病理学的評価により、本薬及び PEG-sTNF-RI の高用量を使用した場合のみ（各薬剤単独又は併用で投与したいずれの場合も）、炎症及び骨破壊が大幅に減弱することが明らかになったが、本薬及び PEG-sTNF-RI の低用量を併用した場合には部分的な改善が見られた。

図 2.6.2-22　雄の Lewis ラットを用いたアジュバント関節炎の炎症に対するアナキンラ及び PEG-sTNF-RI の併用投与の作用



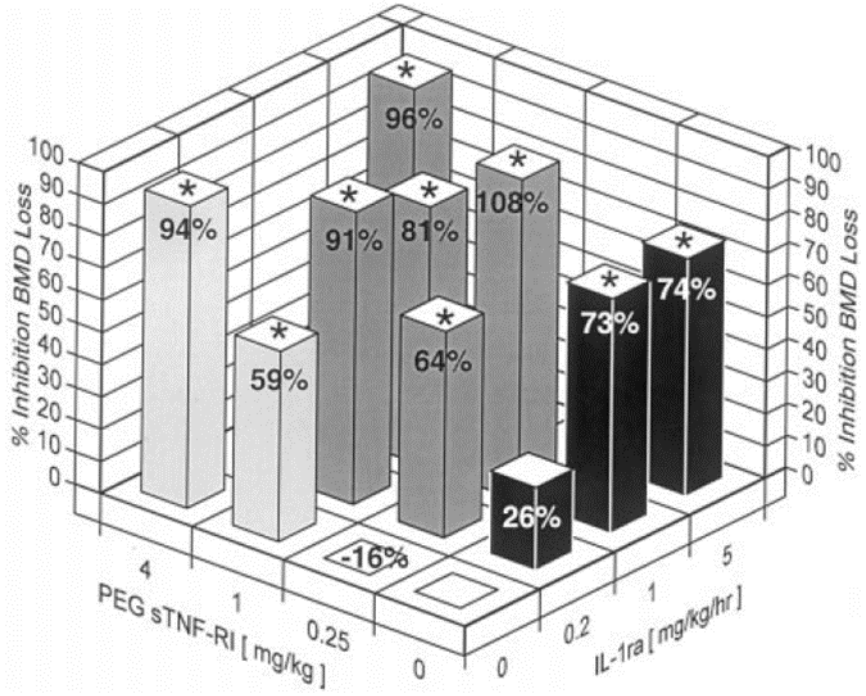
Source: (Feige 2000)

Abbreviations: AUC, Area under the curve; CSEP, Citrate-buffered saline with EDTA and polysorbate; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; IL-1ra, Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra refers to anakinra); PEG-sTNF-RI, Polyethylene glycosylated soluble tumor necrosis factor-receptor type I; s.c., Subcutaneous.

Male Lewis rats were injected with 0.5 mg heat killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra in mineral oil at the base of the tail. Rats were treated from Days 9 to 16 with anakinra in CSEP in Alzet osmotic minipumps and/or daily s.c. with PEG-sTNF-RI. Volume of hind paws was measured daily and the AUC from Days 9 to 16 was calculated. Results are given as % inhibition of AUC relative to control group, 6 rats per group. The data were analyzed by the isobologram method of Berenbaum using a model proposed by (Carter 1988). The results of this analysis indicated synergy for all combinations of doses of 0.2 or 1 mg/kg/hour anakinra with 0.25 or 1 mg/kg PEG-sTNF-RI.

*p < 0.05 Mann Whitney test.

図 2.6.2-23　雄の Lewis ラットを用いたアジュバント関節炎の脛肢関節領域の骨密度減少に対するアナキンラ及び PEG-sTNF-RI の併用投与の作用



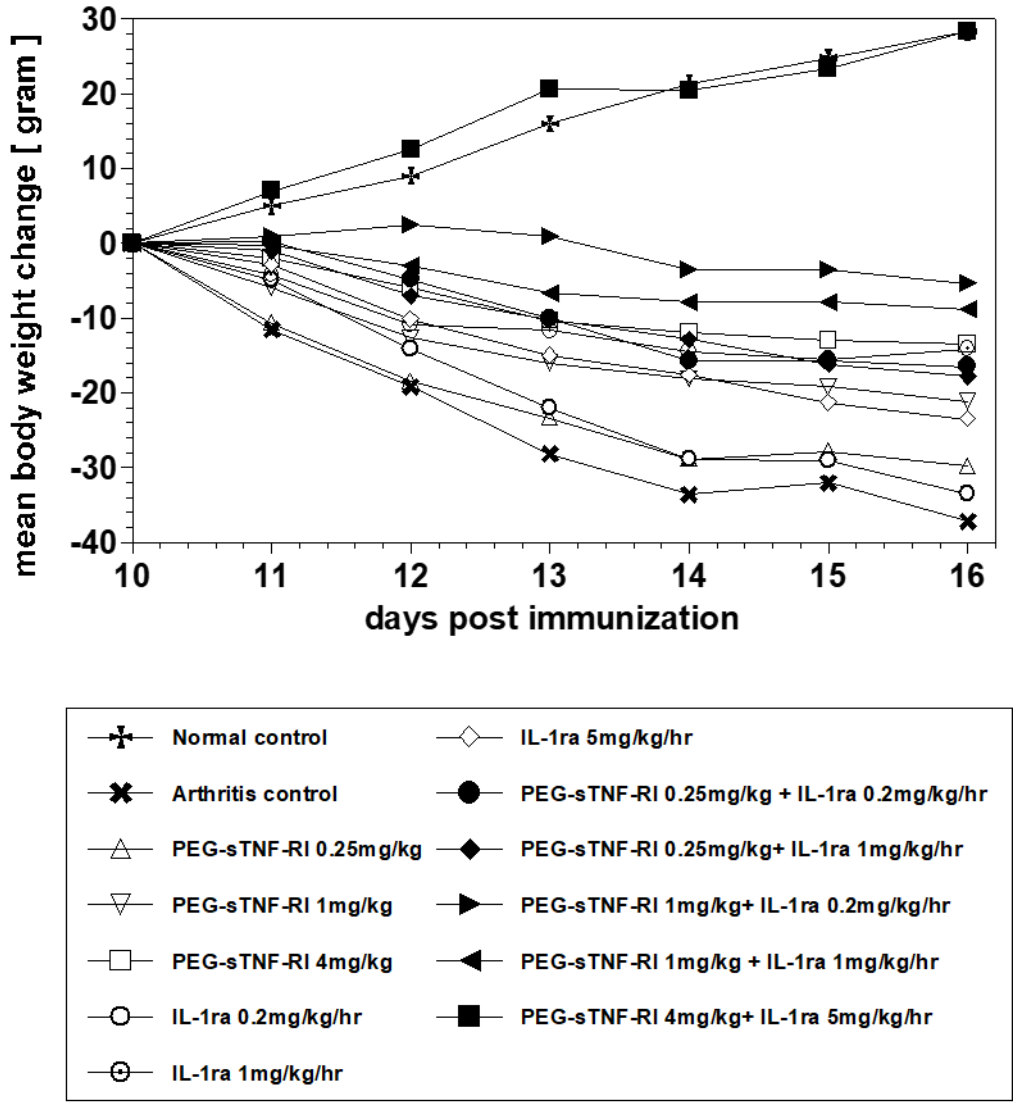
Source: (Feige 2000)

Abbreviations: BMD, Bone mineral density; CSEP, Citrate-buffered saline with EDTA and polysorbate; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; IL-1ra, Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra refers to anakinra); PEG-sTNF-RI, Polyethylene glycosylated soluble tumor necrosis factor receptor type I; s.c., Subcutaneous.

Male Lewis rats were injected with 0.5 mg heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra in mineral oil at the base of the tail. Rats were treated from Days 9 to 16 with anakinra in CSEP in Alzet osmotic minipumps and/or daily s.c. with PEG-sTNF-RI. On Day 16, at necropsy, BMD in the tibiotarsal region was assessed using DexaScan. The bone protective effects were well correlated with histopathological data derived by subsequent microscopic analysis of axial sections from each paw, 6 rats per group. The data were analyzed by the isobologram method of Berenbaum using a model proposed by (Carter 1988) The results of this analysis indicated synergy for all combinations of doses of 0.2 or 1 mg/kg/hour anakinra with 0.25 or 1 mg/kg PEG-sTNF-RI.

*p < 0.05 compared to the 0,0 control group, Mann Whitney test.

図 2.6.2-24　雄の Lewis ラットを用いたアジュバント関節炎による体重減少に対するアナキンラ及び PEG-sTNF-RI の併用投与の作用



Source: (Feige 2000)

Abbreviations: AUC, Area under the curve; CSEP, Citrate-buffered saline with EDTA and polysorbate; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; IL-1ra, Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra refers to anakinra); PEG-sTNF-RI, Polyethylene glycosylated soluble tumor necrosis factor receptor type I; s.c., Subcutaneous.

Male Lewis rats (N=6) were injected with 0.5 mg heat killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra in mineral oil at the base of the tail. Rats were treated from Days 9 to 16 with anakinra in CSEP in Alzet osmotic minipumps and daily s.c. with PEG-sTNF-RI. Rats were weighed daily. Individual treatment with anakinra or PEG-sTNF-RI is shown by open symbols, combination treatment by filled symbols. A statistical analysis of the results shown in this figure was performed based on the AUC from Days 10 to 16 with the Mann Whitney U-test. All treatment groups with the exception of the high dose combination are different ($p < 0.05$) from the normal rat group. All treatments except both individual treatments at the lowest doses resulted in statistically significant ($p < 0.05$) beneficial effects on body weight. Combination treatment with both the low and the high dose combination is better ($p < 0.05$) than treatment with either anakinra or PEG-sTNF-R1 alone. The data were analyzed by the isobologram method of Berenbaum using a model proposed by (Carter 1988) The results of this analysis indicated synergy for all combinations of doses of 0.2 or 1 mg/kg/hour anakinra with 0.25 or 1 mg/kg PEG-sTNF-RI.

2.6.2.2.7.7 IL-1Ra トランスジェニックマウス、IL-1Ra ノックアウトマウスに対する関節炎に関連する結果及び IL-1Ra を用いた遺伝子治療アプローチ

DBA/1 マウス（H2q）は、コラーゲン誘発関節炎に感受性がある。DBA/1 系統に IL-1Ra を過剰発現させると、同腹仔と比較して関節炎の発生率及び重症度が低下した。対照的に、IL-1Ra 欠損マウスは、正常な同腹仔よりも早期発症、高発生率及び重症化を示した（Ma 1998）。

変形性関節症の半月板切除ウサギモデルでは、IL-1Ra プラスミドを関節内投与した群で組織学的軟骨病変の重症度が顕著に減弱した（Fernandes 1999）。

雑種犬に、右膝の前十字靭帯を切断して変形性関節症を誘発した。ヒト IL-1Ra 遺伝子を有するレトロウイルス MFG を使用して *in vitro* で形質導入した滑膜細胞をイヌに移植した。その結果、脛骨プラトー及び大腿骨顆の肉眼的病変の重症度が著しく減弱した。さらに、組織学的病変の重症度もプラトー及び顆の両方で減弱した（Pelletier 1997）。

2.6.2.2.7.8 その他の動物モデル（非リウマチ性関節炎）に対するアナキンラの作用

表 2.6.2-5 に、種々の動物疾患モデルに対する本薬の有効性の概要を示す。これらについては議論しないが、本薬は多くの動物モデルで有益な効果を示している。

表 2.6.2-5 選択動物を用いたリウマチ性関節炎以外の疾患モデルに対するアナキンラの非臨床有効性プロファイル

Disease model/efficacy effect	Anakinra dose	Route	References
Bone loss			
Decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats	2 and 10 mg/kg/day for 4 weeks	s.c. infusion	(Kimble 1994)
Decreases osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice			
Corneal transplants			
Promotes corneal allograft survival	40 µL (20 mg/mL) administered t.i.d. for 8 weeks after transplant	Topical	(Dana 1997); (Yamada 1998)
Suppresses corneal neovascularization if initiated sufficiently early after inflammatory neovascular stimulus	40 µL (20 mg/mL) administered t.i.d. for up to 35 days after inflammatory neovascular stimulus	Topical	(Dana 1998)
Stroke			
Inhibits neuronal death after middle cerebral artery occlusion in rats	10 µg 30 min before and 10 min after injury	ICV	(Relton 1992)
Inhibits neuronal death after middle cerebral artery occlusion in rats	100 mg/kg i.v. loading followed by t.i.d.	s.c.	(Garcia 1995); (Relton 1996)
Protects against neuronal loss in the striatum after ischemia-hypoxia	100 mg/kg, may be delayed until 1 hour after injury	s.c.	(Martin 1994)

Disease model/efficacy effect	Anakinra dose	Route	References
damage in rats			
Head trauma			
Inhibits neuronal damage caused by fluid percussion injury in rats	10 μg, may be delayed until 4 hours after injury	ICV	(Toulmond 1995)
Multiple sclerosis			
Reduced symptoms of myelin basic protein-induced experimental allergic encephalomyelitis in rats	100 mg/kg q.i.d., Days 9 to 12	s.c.	(Badovinac 1998); (Martin 1995); (Wiemann 1998)
Diabetes			
Delays spontaneous autoimmune diabetes in rats	1.0 mg/kg b.i.d.	i.p.	(Dayer-Metroz 1992)
Graft versus host disease			
80 % Survival of GVHD in mice	3 mg/kg i.p. b.i.d. for 10 days following transplantation	i.p.	(McCarthy 1991); (Abhyankar 1993)
Others			
Decreases antigen-induced airway hyper-reactivity in guinea pigs	30 mg/kg	i.p.	(Watson 1993)
Reduces colitis, enterocolitis, intestinal ulceration severity in rabbits and rats	7.5 to 15 mg/kg/day	i.v.	(Cominelli 1990b); (Sartor 1991); (Thomas 1991)
Reduces *Escherichia coli* endotoxin lethality in rabbits	7.7 mg/kg every 2 hours	i.v.	(Ohlsson 1990)
Reduces heat-killed E. *coli*-induced lethality in rabbits	10 mg/kg, then 15 μg/kg/min	i.v.	(Wakabayashi 1991)
Reduces endotoxin lethality in mice	25 mg/kg every 4 hours	i.v.	(Alexander 1991)
Reduces shock and tissue damage of *E. coli* infusion in baboons	10 mg/kg, then 25 μg/kg/min	i.v.	(Fischer 1992)
Prevents shock from heat-killed *Staphylococcus epidermidis* in rabbits	10 mg/kg, then 30 μg/kg/min	i.v.	(Aiura 1993)

Abbreviations: b.i.d., Twice per day; GVHD, Graft-versus-host disease; ICV, Intracerebroventricular; i.p., Intraperitoneal; i.v., Intravenous; q.i.d., 4 times daily; s.c., Subcutaneous; t.i.d., 3 times daily.

2.6.2.2.7.9 感染症モデルに関する IL-1/IL-1Ra のその他の試験

IL-1 及び/又は IL-1Ra が感染に対する宿主防御の構成要素として果たす役割を調査するために、種々の実験技術が使用されている。特に、ノックアウト又はトランスジェニック動物を使用する試験が行われている。IL-1Ra 遺伝子をノックアウトしたマウス又は遺伝子組換えにより発現を亢進したマウスが作成されている（Hirsch 1996）。IL-1Ra ノックアウトマウスはエンドトキ

シン負荷に対してより高い感受性を示したが、IL-1Ra 過剰発現マウスはこの負荷に対して耐性を示した。逆に、IL-1Ra ノックアウトマウスは IL-1Ra トランスジェニックマウスと比較して、リステリア・モノサイトゲネス負荷に対して肝臓及び脾臓での細菌培養が顕著に少なく、生存率が顕著に高かった。これらの試験結果は、IL-1Ra トランスジェニックマウスを用いた追加試験で確認され、更に調査されている（Irikura 1999）。IL-1Ra トランスジェニックマウスを用いた追加試験の結果は、高濃度の IL-1Ra（内因性濃度の約 16 倍）により、末梢白血球数、感染部位への白血球浸潤及びマクロファージ活性化などの自然免疫の側面が損なわれ得ることを示唆している。

IL-1 関連サイトカインが感染において果たし得る役割も、IL-1RI ノックアウトマウス及び IL-1β ノックアウトマウスを用いて調べられている。両方の研究で、リステリア・モノサイトゲネスをモデル感染因子として使用した。リステリア・モノサイトゲネスに対する感受性の上昇は、IL-1RI ノックアウトマウスで示されたが、IL-1β ノックアウトマウスは、肝臓及び脾臓の細菌コロニーに関して感受性が対照マウスと同等であった（Labow 1997; Zheng 1995）。

本薬の臨床使用に対するこれらの所見の影響は明確ではないが、本薬により細菌負荷に対する宿主防御が大幅に損われることはないと考えられる。医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）非適用試験でラットに 200 mg/kg/日で 3 日間、1 日 2 回皮下投与した本薬により血液、肝臓及び脾臓でのリステリア・モノサイトゲネスのコロニー形成に対する影響は認められなかった。さらに、ラットを用いた黄色ブドウ球菌の局所膿瘍モデルのデータは、細菌負荷に対する宿主防御に対して、皮下投与した本薬による障害を示さなかった（Colagiovanni 1996）。これらの結果及び 2.6.2.2.7.10 項に示した結果は、本薬が宿主抵抗性を損なう強力な活性を示さないことを示唆している。トランスジェニック動物で認められたリステリアに対する感受性の上昇は、本薬で得られた結果と矛盾しているように見える。しかし、IL-1Ra トランスジェニックのデータに関して 2 つの重要な考慮すべき事項がある。まず、IL-1Ra はこれらの動物内で変化した唯一のサイトカインではない。Hirsch ら（Hirsch 1996）は、IL-1Ra が IL-1 濃度に悪影響を与えるとの従来の報告に反して、IL-1Ra トランスジェニックマウスで IL-1Ra 及び IL-1 の発現が並行して上昇したことを報告した。さらに、Labow ら（Labow 1997）も、IL-1RI ノックアウトマウスを用いてサイトカイン応答（例えば、TNF 刺激による IL-6 産生）の想定しない変化を報告した。これらの変化したサイトカインプロファイルの背後にある作用機序は不明であるが、ノックアウト又はトランスジェニック動物は妊娠初期から濃度が変化していることに留意することが重要である。これらの変化したサイトカインプロファイルが免疫系の発達に与える影響は非常に複雑であり、十分に理解されていない可能性が高い。次に、感染負荷と IL-1Ra 濃度との時間的関係が重要である可能性がある。トランスジェニックマウスで達成された持続的な濃度とは対照的に、本薬の投与では、時間に応じて変動する濃度プロファイルを示す。Mancilla ら（Mancilla 1993）による試験では、感染負荷に対する本薬投与のタイミングが疾患の転帰に重要であることを示唆している。

要約すると、IL-1Ra 及び場合によって本薬は、いくつかの宿主防御モデルで研究されてきている。IL-1Ra トランスジェニックマウスでは宿主防御の障害が観察されているが、外因性に投与した本薬の試験では、障害が顕著ではないか、全く観察されていない。

2.6.2.2.7.10　免疫系に対するアナキンラの作用

特異的免疫反応、すなわち特定の抗原に対する細胞性又は体液性応答を調節する IL-1 の役割は十分に解明されていない。しかし、IL-1 の拮抗薬である本薬が免疫系に及ぼす影響を *in vivo* 及び *in vitro* でリンパ球細胞に対して評価することは可能であった。本項では、本薬の免疫系に対する影響について *in vivo* 及び *in vitro* の試験結果を評価する。本薬は、特定の抗原に対する動物の免疫応答に対して *in vivo* で一貫性のない作用を示した。免疫系には種差が存在し、非臨床データのヒトへの外挿は困難な場合が多いことが知られているが、複数モデルのデータを組み合わせて総合的に考察した結果、非臨床においては、本薬は免疫応答にはほとんど、若しくは全く影響しないと考えられる。*In vitro* 試験では、本薬は不死化リンパ球細胞株及び血液から分離した正常リンパ球の増殖特性に顕著な影響を与える可能性を示した。しかし、*in vitro* 試験で認められたこれらの本薬の作用と *in vivo* 試験で認められた作用との関連性は不明である。

2.6.2.2.7.11　*In vivo* 免疫反応に対するアナキンラの作用

本薬の作用を、T リンパ球及び B リンパ球の両方が関与する *in vivo* 免疫反応で評価している。以下に説明する免疫反応には、$CD8^+$細胞傷害性 T 細胞（CTL）、2 つの $CD4^+$Th 細胞（Th1 及び Th2 細胞）及び B 細胞がさまざまな程度で関与している（Parker 1993）。*In vivo* での免疫応答は複雑であるため、本薬が *in vivo* 作用を及ぼすリンパ球の細胞タイプを特定することは困難である。培養中の特定のタイプのリンパ球に対する本薬の作用については、本項の後半で説明する。

2.6.2.2.7.11.1　同種抗原に対する細胞溶解性 T リンパ球の反応

Faherty ら（Faherty 1992）は、アロ抗原に対する CTL 反応に対する本薬投与の作用を検討した。同種異系脾細胞を足裏に注射して免疫する 2 日前から、マウスに本薬を 1 日 20 mg/kg の用量で皮下投与（1 日 2 回注射）を 4 日間継続し、P815 細胞（同種異系マウス由来の細胞株）に対する局所リンパ節細胞の CTL 活性を測定した。本薬を投与したマウスでは、この CTL 反応に影響は認められなかった。ミニ浸透圧ポンプを使用して本薬を 1 日 20 mg/kg の用量で試験期間中持続的に投与する方法で再度試験を実施した。この投与法により、本薬の血清中濃度は約 250 ng/mL で一定に保たれた。この投与法でも CTL 反応を抑制しなかった。

2.6.2.2.7.11.2　遅延型過敏反応

抗原に対する遅延型過敏（DTH）反応は、*in vivo* での T 細胞媒介反応の指標として使用している。Faherty ら（Faherty 1992）は、オキサゾロンを局所塗布してマウスを感作した。7 日後、マウスの耳にオキサゾロンを塗布し、DTH 反応の程度は耳の腫れ（耳の重量）を測定すること

で評価した。感作の 2 日前から 1 日 20 mg/kg の用量で 7 日間、1 日 2 回皮下投与した本薬により、DTH 反応に対する影響は認められなかった。

2.6.2.2.7.11.3 *In vivo* での抗体産生

以下の試験は、その他の抗原に対する本薬の作用を示している。動物により惹起された抗体反応は、前項で説明している。

動物の抗体反応を惹起する能力に対する本薬の作用を *in vivo* で評価するために、独立した 2 試験を実施した。これらの試験は、体液性免疫応答に対する本薬の作用は一貫性がないことを示している。

体液性免疫反応に対する本薬の作用を最も徹底的に *in vivo* で検討したのは、Faherty ら（Faherty 1992）が報告した 2 試験である。その最初の試験では、本薬の存在下又は非存在下で、ヒツジ赤血球（SRBC）をマウスに腹腔内投与した（皮下 Alzet ミニ浸透圧ポンプを介して最大 30 mg/kg/日で 7 日間本薬を投与した。本薬の推定血中濃度は 1～2 μg/mL であった）。これらの動物の脾臓における SRBC 特異的抗体産生 B 細胞数は、脾細胞を SRBC 及び補体と混合し、これらの細胞を寒天に播種し、生成されたプラークの数を数えることによって測定した。これらの動物における SRBC 特異的抗体産生細胞の増殖に対する本薬の作用は認められなかった。Faherty らの 2 番目の試験では、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に結合させたトリニトロフェニル（TNP）ハプテンをマウスに腹腔内投与し、免疫後 5 日目にこの抗原に対する血清抗体価を測定した。これらの動物に本薬 5 mg/kg（免疫の 2 日前から 7 日間、1 日 2 回投与）を皮下投与した場合、TNP ハプテンに対する IgG 又は IgM の抗体価の低下は認められなかった。

別の試験では、本薬の抗体産生に対する作用が認められた（Wooley 1993）。マウスに完全フロイントアジュバントと混和したトリ II 型コラーゲンを皮下投与し、免疫後数週間で関節リウマチ様疾患を惹起した。マウスには、コラーゲン投与後 14 日から 1 日 1 回、300 μg/投与の用量で rhIL-1Ra（独立した研究施設で製造）を腹腔内投与し、48 日目の試験終了まで継続した。rhIL-1Ra 投与群の動物から 42 日目又は 48 日目に得た血清では、生理食塩液投与対照群と比較して、抗 II 型コラーゲン IgG の血清濃度の低下はわずかではあったが、統計学的に有意であった。しかし、既に報告されているように、IL-1Ra はマウスの II 型コラーゲン誘発関節炎を抑制し、II 型コラーゲンに対する抗体反応は疾患プロセスの一部である。Wooley ら（Wooley 1993）の実施したメチル化ウシ血清アルブミン（BSA）投与などの同様の試験では、BSA 特異的 IgG 又は IgM 濃度に対する影響は認められなかった。

最後に、本薬は、PEG-sTNF-RI（2.6.2.2.7.6 項）などの併用投与したタンパク質薬剤に対する抗体反応を阻害しないことが示唆された。

2.6.2.2.7.12　骨髄細胞に対するアナキンラの *in vivo* 作用

IL-1 は骨髄細胞の増殖、特に造血前駆細胞の増殖を促進することができる（Marley 1992; Fibbe 1991）。この IL-1 は、主として、骨髄内のストローマ細胞（造血支持細胞）によって産生されるコロニー刺激因子などの造血成長因子の誘導、及びこれら造血成長因子との相乗的相互作用を通してこの作用を発揮している可能性がある。IL-1 は、定常状態における造血への関与は限定的であるものの、炎症や骨髄障害などによる造血ストレス状態においては、前駆細胞の活性化及び動員に寄与する重要な調節因子となる（Fibbe 1991; Yang 1988）。

骨髄細胞に対するこの既知の IL-1 の作用のため、Fibbe ら（Fibbe 1992）は、マウスの骨髄細胞に対して本薬の長期皮下投与（1～2 週間）の作用を検討する一連の試験を実施した。1 群 6 匹のマウスに対し、浸透圧ポンプを使用して皮下に本薬を 7～14 日間連続投与した。投与量は 8、20、30 mg/kg/日と段階的に増量し、最大 30 mg/kg/日をマウスに投与し、血清中の本薬の定常状態循環濃度を 2 µg/mL にした。これらの定常状態条件下において、本薬は骨髄細胞性並びに造血前駆細胞である、顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞（CFU-GM）及び顆粒球・赤血球・巨核球・単球コロニー形成細胞（CFU-GEMM）などの造血前駆細胞サブセットに対して影響を及ぼさなかった。さらに、脾臓並びに末梢血中の白血球数、血小板数、及び前駆細胞数にも変化は認められず、これらの結果から、本薬は定常状態の造血に影響を及ぼさないことが示唆された。上記の投与用量では、これらの定常状態の造血パラメーターのいずれにも本薬の顕著な作用は認められなかった。本試験条件における本薬の薬理活性を確認するため、IL-1 誘発による好中球及び CFU-GM の骨髄から循環血液への移行について検討した。その結果、同用量及び同様の方法で投与した本薬による阻害作用が認められた。IL-1 投与前に投与した場合には、本薬の腹腔内投与により、IL-1 誘発好中球数の増加及び循環血中 CFU-GM 数の増加も抑制できた。対照的に、本薬の腹腔内投与により、循環血中の PMN 及び CFU-GM に対する LPS の作用を抑制することはできなかった。

本薬は定常状態、すなわち、感染又はストレスのない状態の造血には影響を与えないことが示唆される。しかし、本薬は外因性 IL-1 誘発による骨髄前駆細胞の増殖及び移行を抑制することができるが、LPS 誘発による骨髄前駆細胞の増殖及び移行は抑制できない。IL-1 はエンドトキシンに対するこの適応反応の余剰なメディエーターの 1 つである可能性がある。したがって、本薬が感染に対する骨髄の応答を損なう可能性は低い。

2.6.2.3　副次的薬理試験

本薬を用いた副次的薬理試験は本項で実施していない。

2.6.2.4　安全性薬理試験

2.6.2.4.1　安全性薬理試験の評価項目を含むアナキンラの一般薬理試験（試験番号：[　66-80]）

　66-80 試験は、本薬の *in vivo* 及び *ex vivo* での薬理活性及び安全性プロファイルを評価することを目的として実施した。本試験は GLP に準拠して　日本、　）で実施した。

本試験で使用した本薬（ロット　、ロット　、ロット　、ロット　、ロット　、ロット　、及びロット　）は、10 mmol/L クエン酸ナトリウム、140 mmol/L 塩化ナトリウム及び 0.1%（w/w）ポリソルベート 80 に pH 6.5 で溶解した。対照物質（ロット　）は上記の添加剤を含んでおり、プラセボとして、また希釈のために使用した。

In vivo 試験では、本薬をマウス及びラット各雄 6 匹にそれぞれ 20、70 及び 200 mg/kg の用量で静脈内投与し、3 匹の雄ビーグル犬には 10、30 及び 90 mg/kg の用量で漸増投与した。*Ex vivo* 試験では、単離したモルモット回腸を設置したマグヌス装置に本薬を直接添加し、最終濃度は 0.1、0.3 及び 0.9 mg/mL に達した。さらに、マウスの一般的な活動及び一般行動に対する評価のため、本薬を 70、200 及び 720 mg/kg の用量で静脈内投与した。動物への影響を最小限に抑えて高用量の投与を行うために、静脈内投与経路を使用した。

安全性薬理試験の結果

マウスの一般的な活動、一般行動及び自発運動量に対して本薬による影響は認められなかった。マウスのチオペンタール誘発睡眠時間及びラットの体温に対して本薬による影響は認められなかった。さらに、本薬により、マウスにおいて鎮痛、抗けいれん及びけいれん誘発作用は認められなかった。マウスの腸内炭末輸送並びにラットの尿量、尿中電解質、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ及びクレアチニンクリアランスに対して本薬による影響は認められなかった。

麻酔下のビーグル犬の呼吸数、心拍数、血流量、収縮期及び拡張期血圧、平均血圧並びに心電図に対して本薬による影響は認められなかった。溶媒に対する血圧低下反応は、初回静脈内投与後にのみイヌで観察された（溶媒投与後に本薬を投与した）。この製剤にはポリソルベート 80 が含まれているため、これらのイヌの血圧低下反応はこの溶媒成分に起因すると考えられた。

Ex vivo 試験では、単離したモルモット回腸の自発運動に対して本薬による影響は認められず、アセチルコリン、ヒスタミン及びバリウム誘発収縮にも影響は認められなかった。

結論

これらのモデルにおいて、本薬は主要な中枢/自律神経系、呼吸系、心血管系、消化器系及び腎臓に対する薬理作用を示さなかった。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.2.7.6 項に示されているように、本薬の薬力学的薬物相互作用は、アジュバント関節炎ラットにおいて MTX（Bendele 1999）又は PEG-sTNF-RI（Feige 2000）との併用で評価した。本薬単独投与では足蹠浮腫に対する抑制作用は 9%であり、MTX 単独投与では 45%、本薬と MTX（Bendele 1999）の併用投与では 78%の抑制が認められた。さらに、低用量の本薬又は PEG-sTNF-RI の単独投与では、アジュバント関節炎ラットにおける炎症、体重減少及び骨密度の低下に対する抑制作用は認められなかった。しかし、これらの低用量の併用投与により、炎症（足蹠浮腫）に対する 78 ± 10%の抑制及び骨密度低下に対する 64 ± 14%の抑制が認められた。低用量の併用投与による足蹠浮腫に対する作用は非常に顕著であり、相乗作用を示した。高用量の本薬と PEG-sTNF-RI の併用投与により、疾患の完全な抑制が認められ、これらのラットの運動能力、足の体積、体重及び骨密度は正常な対照ラットと同等であった。これら 2 つの薬剤の種々組み合わせで見られた顕著な骨保護作用は、顕微鏡評価でも観察された。組織病理学的評価では、本薬及び PEG-sTNF-RI の高用量を単独投与又は併用投与した場合にのみ、炎症と骨破壊が大幅に減少することが明らかになったが、本薬及び PEG-sTNF-RI の低用量を併用投与した場合には部分的な改善が認められた。

2.6.2.6　考察及び結論

IL-1 は免疫及び炎症反応の主要なメディエーターである。IL-1 は好中球増加、マクロファージの活性化並びに T 細胞及び B 細胞の増殖及び分化を促進することにより炎症を惹起する。IL-1 が示す作用には、T 細胞によるサイトカイン（例：IL-2）の産生増加、線維芽細胞によるプロスタグランジン及びコラゲナーゼの産生増加、血管内皮による接着タンパク質の産生増加並びにヒスタミン及びトロンボキサンの遊離が含まれる。IL-1 は、好中球、単球及びマクロファージなどの循環血中白血球を含む多くの種類の細胞によって産生される。

通常の条件下では、血清及び他の体液には検出可能な濃度の IL-1 は含まれていない。IL-1 の産生は、炎症、免疫反応、微生物侵入及び組織損傷に応じて誘発され、急性又は慢性の炎症を惹起する可能性がある。IL-1 活性上昇に関連する急性及び慢性の炎症性疾患には、関節リウマチ、クリオピリン関連周期熱症候群、家族性地中海熱、全身型若年性特発性関節炎及び成人発症スチル病などの IL-1 が起因となる他の疾患が含まれる。

本薬は遺伝子組換えヒト IL-1 受容体拮抗薬であり、IL-1α 及び IL-1β と同等の親和性で IL-1 受容体に結合するが、解離速度は遅い。本薬は、*in vitro* 及び *in vivo* の両方で IL-1α 及び IL-1β により誘発される反応を抑制する。本薬の主な生物学的作用は、IL-1 サイトカインの作用に対して拮抗することであり、上記のような IL-1 が誘発する疾患の症状を軽減するために有用である。

本項で報告している薬理試験では、本薬が局所及び全身の炎症を誘発する炎症性サイトカイン IL-1α 及び IL-1β の作用を効率的に抑制することを示している。本薬が IL-1 受容体に結合しても、シグナル伝達を引き起こすリガンド受容体複合体を形成できないことが示唆されている。腫瘍細胞株を用いた本薬の *in vitro* 試験では、本薬による増殖作用は示されていない。IL-1 誘発の

in vitro 反応、例えば胸腺細胞の増殖、滑膜細胞、包皮線維芽細胞及び軟骨細胞による PGE_2 及び/又はコラゲナーゼの産生並びに臍帯静脈内皮細胞での接着分子 mRNA の発現量増加は、全て本薬によって抑制される。

In vivo 試験では、本薬は複数の動物関節炎モデルにおいて炎症、骨破壊及び軟骨変性に対する抑制作用を示している。本薬は、実験的アレルギー性脳脊髄炎などの多発性硬化症のラット及びモルモットモデル、脳卒中及び頭部外傷のラットモデル、移植片対宿主病及び角膜同種移植生存のマウスモデルなど、他の自己免疫疾患の動物モデルでも活性を示している。

安全性薬理試験は、マウス、ラット、イヌ及び *ex vivo* 試験のモルモット回腸で実施した。中枢/自律神経機能、鎮痛活性、心血管、消化器及び腎機能の試験では、本薬関連の影響は認められなかった。

本薬の薬力学的薬物相互作用は、アジュバント関節炎ラットにおいて MTX（Bendele 1999）又は PEG-sTNF-RI（Feige 2000）との併用投与により評価した。本薬単独投与では足蹠浮腫に対して 9%抑制したのに対し、MTX 単独投与では 45%、本薬と MTX（Bendele 1999）の併用投与では 78%の抑制が認められた。さらに、低用量の本薬又は PEG-sTNF-RI の単独投与では、アジュバント関節炎ラットにおける炎症、体重減少及び骨密度の低下に対する抑制作用は認められなかった。しかし、これらの低用量の併用投与により、炎症（足蹠浮腫）に対する 78 ± 10%の抑制及び骨密度低下に対する 64 ± 14%の抑制が認められた。低用量の併用投与による足蹠浮腫に対する作用は非常に顕著であり、相乗作用を示した。

本薬は IL-1Ra として、関節リウマチ、クリオピリン関連周期熱症候群、家族性地中海熱、全身型若年性特発性関節炎及び成人発症スチル病などの IL-1 が誘発する疾患に見られる慢性炎症及びそれに伴う組織破壊を制御するために皮下投与用に開発した。本薬はこれらの適応症の治療を目的としており、単独投与又は疾患修飾性抗リウマチ薬など他の抗リウマチ薬と併用投与して、症状を軽減し、構造的損傷を遅延させる。

2.6.2.7　図表

本文中に示した。

2.6.2.8　参考文献

Abhyankar S, Gilliland DG, Ferrara JLM. Interleukin-1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft versus host disease to minor histocompatibility antigens. Transplantation 1993; 56:1518-1523.

Aiura K, Gelfand JA, Burke JF, Thompson RC, Dinarello CA. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist prevents Staphylococcus epidermidis-induced hypotension and reduces circulating levels of tumour necrosis factor and IL-1β in rabbits. Infect Immun 1993; 61:3342-3350.

Alexander HR, Doherty GM, Buresh CM, Venzon DJ, Norton JA. A recombinant human receptor antagonist to interleukin 1 improves survival after lethal endotoxemia in mice. J Exp Med 1991; 173:1029-1032.

Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1990a; 33:305-315.

Arend WP, Joslin FG, Thompson RC, Hannum CH. An IL-1 inhibitor from human monocytes. Production and characterization of biologic properties. J Immunol. 1989;143(6):1851-1858.

Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. Ann Rev Immunol 1998; 16:27-55.

Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist: discovery, structure and properties. Prog Growth Factor Res 1990b; 2:193-205.

Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. J Clin Invest 1990c; 85:1694-1697.

Auron PE. The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. Cytokine Growth Factor Rev 1998; 9:221-237.

Badovinac V, Mostarica SM, Dinarello CA, Stosic GS. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in rats by influencing the activation and proliferation of encephalitogenic cells. J Neuro Immunol 1998; 85:87-95.

Baumann JB, Christen E, Gamboni G, et al. Receptor binding and biological activity of IL-1α, IL-1β, IL-1β analogues and an IL-1 antagonist in A375 human melanoma cells. J Recept Res 1993; 13:245-262.

Bendele A, McAbee T, Woodward M, et al. Effects of interleukin-1 receptor antagonist in a slow-release hylan vehicle on rat type II collagen arthritis. Pharm Res 1998; 15:1557-1561.

Bendele A, Sennello G, McAbee T, Frazier J, Chlipala E, Rich B. Effects of interleukin 1 receptor antagonist alone and in combination with methotrexate in adjuvant arthritic rats. J Rheumatol 1999; 26:1225-1229.

Benjamin D, Wormsley S, Dower SK. Heterogeneity in interleukin (IL)-1 receptors expressed on human B cell lines: Differences in the molecular properties of IL-1.alpha. and IL-1.beta. binding sites. J Biol Chem 1990; 265:9943-9951.

Bensimon C, Wakasugi N, Tagaya Y, et al. Two distinct affinity binding sites for IL-1 on human cell lines. J Immunol 1989; 143:1168-1174.

Bird TA, Saklatvala J. Down-modulation of epidermal growth factor receptor affinity in fibroblasts treated with interleukin 1 or tumour necrosis factor is associated with phosphorylation at a site other than threonine 654. J Biol Chem 1990; 265:235-240.

Bird TA, Saklatvala J. Il-1 and TNF transmodulate epidermal growth factor receptors by a protein kinase C-independent mechanism. J Immunol 1989; 142:126-133.

Bluthé RM, Parnet P, Dantzer R, Kelley KW. Interleukin-1 receptor antagonist blocks effects of IL-1α and IL-1β on social behaviour and body weight in mice. Neurosci Res Commun 1991; 15(3):151-158.

Bluthé RM, Dantzer R, Kelley KW. Central mediation of the effects of interleukin-1 on social exploration and body weight in mice. Psychoneuroendocrinology. 1997;22(1)1-11.

Bomsztyk K, Sims JE, Stanton TH, et al. Evidence for different interleukin 1 receptors in murine B- and T-cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:8034-8038.

Brennan FM, Field M, Chu CQ, Feldmann M, Maini RN. Cytokine expression in rheumatoid arthritis. Br J Rheumatol 1991; 30:76-80.

Burger D, Chicheportiche R, Giri JG, Dayer JM. The inhibitory activity of human interleukin-1 receptor antagonist is enhanced by type II interleukin-1 soluble receptor and hindered by type I interleukin-1 soluble receptor. J Clin Invest 1995; 96:38-41.

Carmichael DF, Smith C.G., Thompson RC. Demonstration of the effect of human interleukin-1 inhibitor in cultured bovine nasal cartilage explant. Second International Workshop on Cytokines 1989; 1:89. Abstract.

Carter DB, Deibel MR, Jr., Dunn CJ, et al. Purification, cloning, expression and biological characterisation of an interleukin-1 receptor antagonist protein. Nature 1990; 344:633-638.

Carter WHJr, Gennings C, Staniswalis J, Campbell E, White KLJr. A statistical approach to the construction and analysis of isobolograms. J Am Coll Toxicol 1988; 7:963-973.

Chang TL, Shea CM, Urioste S, Thompson RC, Boom WH, Abbas A. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes: III. Responses of IL-2- and IL-4-producing (Th1 and Th2) clones to antigens presented by different accessory cells. J Immunol 1990; 145:2803-2808.

Chaskiel L, Bristow AD, Bluthé RM, Dantzer R, Blomqvist A, Konsman JP. Interleukin-1 reduces food intake and body weight in rat by acting in the arcuate hypothalamus. Brain Behav Immun. 2019;81:560-573.

Chizzonite R, Truitt T, Kilian PL, et al. Two high-affinity interleukin 1 receptors represent separate gene products. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:8029-8033.

Colagiovanni DB, Shopp GM. Evaluation of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and tumour necrosis factor binding protein (TNF-BP) in a rodent abscess model of host resistance. Immunopharmacol Immunotoxicol 1996; 18:397-419.

Colotta F, Re F, Muzio M, et al. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. Science 1993; 261:472-475.

Cominelli F, Bortolami M, Pizarro TT, Monsacchi L, Ferretti M, Brewer MT, Eisenberg SP, Ng RK. Rabbit Interleukin-1 receptor antagonist. Cloning, expression, functional characterisation, regulation during intestinal inflammation. J Biol Chem 1994; 269;9:6962-6971.

Cominelli F, Llerena R, Clark BD, et al. In vivo anti-inflammatory properties of recombinant interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra). Lymph Res. 1990a; 597. Abstract.

Cominelli F, Nast CC, Clark BD, et al. Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. J Clin Invest 1990b; 86:972-980.

Conca W, Auron PE, Aoun WM, et al. An interleukin 1beta point mutant demonstrates that jun/fos expression is not sufficient for fibroblast metalloproteinase expression. J Biol Chem 1991; 266:16265-16268.

Conti P, Barbacane RC, Panara MR, et al. Human recombinant interleukin-1 receptor antagonist (hrIL-1Ra) enhances the stimulatory effect of interleukin-2 on natural killer cell activity against MOLT-4 target cells. Int Rev Immunol Pathol 1992; 14:987-993.

Conti P, Reale M, Barbacane RC, et al. Reduced mitogen stimulation of DNA synthesis in human lymphocytes by a human recombinant interleukin-1 receptor antagonist. Immunol Lett 1991; 28:19-25.

Curtis BM, Widmer MB, deRoos P, Qwarnstrom EE. IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. J Immunol 1990; 144:1295-1303.

Dana MR, Yamada J, Streilein JW. Topical interleukin 1 receptor antagonist promotes corneal transplant survival. Transplantation 1997; 63.:1501-1507.

Dana MR, Zhu SN, Yamada J. Topical modulation of interleukin-1 activity in corneal neovascularisation. Cornea 1998; 17:403-409.

Dayer-Metroz MD, Duhamel D, Rufer N, et al. IL-1 receptor antagonist delays spontaneous autoimmune diabetes in BB rats. Eur J Clin Invest 1992; 22: A50. Abstract.

Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. Blood 1991; 77:1627-1652.

Dower SK, Kronheim SR, March CJ, et al. Detection and characterisation of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. J Exp Med 1985; 162:501-515.

Dripps DJ, Brandhuber BJ, Thompson RC, Eisenberg SP. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. J Biol Chem 1991a; 266:10331-10336.

Dripps DJ, Verderber E, Ng RK, Thompson RC, Eisenberg SP. Interleukin-1 receptor antagonist binds to the type II interleukin-1 receptor on B cell and neutrophils. J Biol Chem 1991b; 266:20311-20315.

Dukovich M, Severin JM, White SJ, Yamazaki S, Mizel SB. Stimulation of fibroblast proliferation and prostaglandin production by purified recombinant murine interleukin 1. Clin Immunol Immunopathol 1986; 38:381-389.

Eisenberg SP, Brewer MT, Verderber E, Heimdal P, Brandhuber BJ, Thompson RC. Interleukin 1 receptor antagonist is a member of the interleukin 1 gene family: evolution of a cytokine control mechanism. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:5232-5236.

Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, et al. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. Nature 1990; 343:341-346.

Eisenberg SP, Thompson R, Cos G. An interleukin-1 inhibitor (IL-li) blocks IL-1 induced adhesion of neutrophils to endothelial cells. Second International Workshop on Cytokines 1989; 90. Abstract.

Esser RE, Stimpson SA, Cromartie WJ, Schwab JH. Reactivation of streptococcal cell wall-induced arthritis by homologous and heterologous cell wall polymers. Arthritis Rheum 1985; 28:1402-1411.

Estrov Z, Kurzrock R, Wetzler M, et al. Suppression of chronic myelogenous leukaemia colony growth by interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors: a novel application for inhibitors of IL-1 activity. Blood 1991; 78:1476-1484.

Evans RJ, Bray J, Childs JD, Vigers GPA, Brandhuber BJ, Skalicky JJ, et al. Mapping receptor binding sites in interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1β by site-directed mutagenesis. J Biol Chem. 1995;270(19):11477-11483.

Faherty DA, Claudy V, Plocinski JM, et al. Failure of IL-1 receptor antagonist and monoclonal anti-IL-1 receptor antibody to inhibit antigen-specific immune responses in vivo. J Immunol 1992; 148:766-771.

Falk W, Von Hoegen I, Krammer PH. Activation of T cells by interleukin1 involves internalisation of interleukin1. Lymphokine Res 1989; 8:263-268.

Feige U, Hu YL, Gasser J, Campagnuolo G, Munyakazi L, Bolon B. Anti-interleukin-1 and anti-tumor necrosis factor-alpha synergistically inhibit adjuvant arthritis in Lewis rats. Cell Mol Life Sci. 2000; 57:1457-1470.

Feldmann M, Brennan F, Maini R. Cytokines in autoimmune disorders. Int Rev Immunol 1998; 17:217-228.

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Ann Rev Immunol 1996; 14:397-440.

Fernandes J, Tardif G, Martel PJ, et al. In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints: prevention of osteoarthritis progression. Am J Pathol 1999; 154:1159-1169.

Fibbe W, Hamilton MS, Laterveer L, et al. Continuous infusion (CI) of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) blocks inducible haematopoietic effects of interleukin-1 but has no effect on murine steady state haematopoiesis. Blood 1992; 80:10 suppl pg 91A. Abstract.

Fibbe W, Willemze R. The role of interleukin-1 in haematopoiesis. Acta Haematol 1991; 86:148-154.

Fischer E, Marano MA, Van-Zee KJ, et al. Interleukin-1 receptor blockade improves survival and hemodynamic performance in Escherichia coli septic shock but fails to alter host responses to sublethal endotoxemia. J Clin Invest 1992; 89:1551-1557.

Fleming WE, Winterrowd GE, Sanders ME. Non-IL-1-driven activation of T-lymphocytes is not inhibited by an IL-1 receptor antagonist. J Cell Biochem Supp 1991a; 15:172

Fleming WE, Winterrowd GE, Sanders ME. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist protein IRAP does not inhibit activation of resting human T-cells. Arthritis Rheum 1991b; 34: S120

Fujiwara T, Grimm EA. Regulation of lymphokine-activated killer cell induction by human recombinant IL-1 receptor antagonist. Obligate paracrine pathway of IL-1 during lymphokine-activated killer cell induction. J Immunol 1992; 148:2941-2946.

Gallis B, Prickett KS, Jackson J, et al. IL-1 induces rapid phosphorylation of the IL-1 receptor. J Immunol 1989; 143:3235-3240.

Garcia JH, Liu KF, Relton JK. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. Am J Pathol 1995; 147:1477-1486.

Giri JG, Newton RC, Horuk R. Identification of soluble interleukin-1 binding protein in cell-free supernatants: Evidence for soluble interleukin-1 receptor. J Biol Chem 1990; 265:17416-17419.

Granowitz EV, Clark BD, Vannier E, Callahan MV, Dinarello CA. IL-1 receptor antagonist inhibits IL-1 induced cytokine synthesis and the binding of IL-1 to the type II IL-1 receptor in human monocytes. Cytokine 1991; 3:496

Granstein RD, Margolis R, Mizel SB, Sauder DN. In vivo inflammatory activity of epidermal cell-derived thymocyte activating factor and recombinant interleukin 1 in the mouse. J Clin Invest 1986; 77:1020-1027.

Gubler U, Chua AO, Stern AS, et al. Recombinant human interleukin 1.alpha.: Purification and biological characterisation. J Immunol 1986; 136:2492-2497.

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science 1988; 241:42-52.

Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, et al. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. Nature 1990; 343:336-340.

Henderson B, Thompson RC, Hardingham T, Lewthwaite J. Inhibition of interleukin-1-induced synovitis and articular cartilage proteoglycan loss in the rabbit knee by recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. Cytokine 1991; 3:246-249.

Hirsch E, Irikura VM, Paul SM, Hirsh D. Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:11008-13.

Hom JT, Bendele AM, Carlson DG. In vivo administration with IL-1 accelerates the development of collagen-induced arthritis in mice. J Immunol 1988; 141:834-841.

Hom JT, Cole H, Bendele AM. Interleukin 1 enhances the development of spontaneous arthritis in MRL/lpr mice. Clin Immunol Immunopathol 1990; 55:109-119.

Irikura VM, Hirsch E, Hirsh D. Effects of interleukin-1 receptor antagonist overexpression on infection by Listeria monocytogenes. Infect Immun 1999; 67:1901-1909.

Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, van den Berg WB. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. Arthritis Rheum 1996; 39:797-809.

Kaur P, Welch WJ, Saklatvala J. Interleukin 1 and tumour necrosis factor increase phosphorylation of the small heat shock protein effects in fibroblast HEP G2 and U937 cells. Febs Letters 1989; 258:269-273.

Kent S, Bluthé RM, Dantzer R, Hardwick AJ, Kelley KW, Rothwell NJ, et al. Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin 1. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89(19):9117-9120.

Kilian PL, Kaffka KL, Biondi DA, et al. Antiproliferative effect of interleukin-1 on human ovarian carcinoma cell line (NIH: OVCAR-3). Cancer Res 1991; 51:1823-1828.

Kimble RB, Vannice JL, Bloedow DC, et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomised rats. J Clin Invest 1994; 93:1959-67.

Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. Science 1989; 245:1238-1241.

Kuiper S, Joosten LA, Bendele AM, et al. Different roles of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 in murine streptococcal cell wall arthritis. Cytokine 1998; 10:690-702.

Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, et al. Absence of IL-1 signalling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. J Immunol 1997; 159:2452-2461.

Lauzon W, Lemaire I. Effects of biological response modifiers on lung natural killer activity. Immunopharmacol Immunotoxicol 1991; 13:237-250.

Lowenthal JW, MacDonald HR. Binding and internalisation of interleukin 1 by T cells: Direct evidence for high-affinity and low-affinity classes of interleukin 1 receptor. J Exp Med 1986; 164:1060-1074.

Ma Y, Thornton S, Boivin GP, Hirsh D, Hirsch R, Hirsch E. Altered susceptibility to collagen-induced arthritis in transgenic mice with aberrant expression of interleukin-1 receptor antagonist. Arthritis Rheum 1998; 41:1798-1805.

Mancilla J, Garcia P, Dinarello CA. The interleukin-1 receptor antagonist can either reduce or enhance the lethality of Klebsiella pneumoniae sepsis in newborn rats. Infect Immun 1993; 61:926-932.

Marley S, Reilly I, Russell N. Interleukin 1 has positive and negative regulatory effects in human long-term bone marrow culture. Exp Hematol 1992; 20:75-79.

Martin D, Chinookoswong N, Miller G. The interleukin-1 receptor antagonist (rhIL-1Ra) protects against cerebral infarction in a rat model of hypoxia-ischemia. Exp Neurol 1994; 130:362-367.

Martin D, Near SL. Protective effect of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) on experimental allergic encephalomyelitis in rats. J Neuro Immunol 1995; 61:241-245.

McCarthy PL, Jr., Abhyankar S, Neben S, et al. Inhibition of interleukin-1 by an interleukin-1 receptor antagonist prevents graft-versus-host disease. Blood 1991; 78:1915-1918.

McIntyre KW, Stepan GJ, Kolinsky KD, et al. Inhibition of interleukin 1 (IL-1) binding and bioactivity in vitro and modulation of acute inflammation in vivo by IL-1 receptor antagonist and anti-IL-1 receptor monoclonal antibody. J Exp Med 1991; 173 (4):931-939.

McMahan C, Slack JL, Mosley B, et al. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. EMBO J 1991; 10:2821-2832.

Mitchell MD, Edwin SS, Silver RM, Romero RJ. Potential agonist of the interleukin-1 receptor antagonist protein implications for treatment of women. J Clin Endocrinol Metab 1993; 76:1386-1388.

Mizel SB, Kilian PL, Lewis JC, Paganelli KA, Chizzonite RA. The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalisation in T cells and fibroblasts. J Immunol 1987; 138:2906-2912.

Mizel SB. Cyclic AMP and interleukin 1 signal transduction. Immunol Today. 1990; 11:390-391.

Nakai S, Mizuno K, Kaneta M, Hirai Y. A simple, sensitive bioassay for the detection of interleukin-1 using human melanoma A375 cell line. Biochem Biophys Res Commun 1988; 154:1189-1196.

Nicod LP, El Habre F, Dayer J-M. Natural and recombinant interleukin-1 receptor antagonist does not inhibit human T-cell proliferation induced by mitogens, soluble antigens or allogeneic determinants. Cytokine 1992; 4:29-35.

Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. Nature 1990; 348:550-552.

Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M. Human IL-1 inhibitor (IL-1I) blocks the effects of IL-1ß in the rabbit. Cytokine 1989; 1:351 Abstract

O'Neill LA, Greene C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signalling machinery in mammals, insects, and plants. J Leukoc Biol 1998; 63:650-657.

Parker DC, Paul-WE e. T cell-dependent B cell activation. Ann Rev Immunol 1993;11:331-360.

Parker KP, Benjamin WR, Kaffka KL, Kilian PL. Presence of IL-1 receptors on human and murine neutrophils: Relevance to IL-1-mediated effects in inflammation. J Immunol 1989; 142:537-542.

Pelletier JP, Caron JP, Evans C, et al. In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. Arthritis Rheum. 1997; 40:1012-1019.

Powers GD, Varnell TA, Kaffka KL, Kilian PL. IL-1 inhibitors block antigen-specific and alloreative proliferative responses of mouse D10.G4.1 TH-2 helper cells. FASEB J 1991; 5: A1091

Qwarnstrom EE, Page RC, Gillis S, Dower SK. Binding, internalisation, and intracellular localisation of interleukin-1β in human diploid fibroblasts. J Biol Chem 1988; 263:8261-8269.

Rambaldi A, Torcia M, Dinarello CA, Barbui T, Cozzolino F. Modulation of cell proliferation and cytokine production in AML by recombinant interleukin-1 receptor antagonist. Leukaemia 1993; 7 Suppl 2: S10-S12

Relton JK, Martin D, Thompson RC, Russell DA. Peripheral administration of Interleukin-1 Receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat. Exp Neurol 1996; 138:206-213.

Relton JK, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. Brain Res Bull 1992; 29:243-246.

Sartor RB, Holt LC, Bender DE, et al. Prevention and treatment of experimental enterocolitis with a recombinant interleukin-1 receptor antagonist. Gastroenterology 1991; 100: A613. Abstract.

Sayers TJ, Wiltrout TA, Bull CA, Denn-AC III, Pilaro AM, Lokesh B. Effect of cytokines on polymorphonuclear neutrophil infiltration in the mouse: Prostaglandin- and leukotriene-independent induction of infiltration by IL-1 and tumour necrosis factor. J Immunol 1988; 141:1670-1677.

Schreuder H, Tardif C, Trump-Kallmeyer S, et al. A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. Nature 1997; 386:194-200.

Schwab JH, Anderle SK, Brown RR, Dalldorf FG, Thompson RC. Pro- and anti-inflammatory roles of interleukin-1 in recurrence of bacterial cell wall-induced arthritis in rats. Infect Immun. 1991;59(12):4436-4442.

Seckinger P, Klein NJ, Alander C, Thompson RC, Dayer JM, Raisz LG. Natural and recombinant human IL-1 receptor antagonists block the effects of IL-1 on bone resorption and prostaglandin production. J Immunol 1990; 145:4181-4184.

Sims JE, Gayle MA, Slack JL, et al. Interleukin 1 signalling occurs exclusively via the type I receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:6155-6159.

Smith SR, Terminelli C, Kenworthy BL, Phillips DL. A study of cytokine production in acute graft-vs-host disease. Cell Immunol 1991; 134:336-348.

Spriggs MK, Lioubin PJ, Slack J, et al. Induction of an interleukin-1 receptor (IL-1R) on monocytic cells: Evidence that the receptor is not encoded by a T cell-type IL-1R messenger RNA. J Biol Chem 1990; 265:22499-22505.

Stimpson SA, Esser RE, Carter PB, Sartor RB, Cromartie WJ, Schwab JH Lipopolysaccharide induces recurrence of arthritis in rat joints previously injured by peptidoglycan-polysaccharide. J Exp Med 1987; 165:1688-1702.

Stylianou E, Neill LAJ, Rawlinson L, Edbrooke MR, Woo P, Saklatvala J. Interleukin 1 induces NF-κB through its type I but not its type II receptor in lymphocytes. J Biol Chem 1992; 267:15836-15841.

Symons JA, Eastgate JE, Duff GW. A soluble binding protein specific for interleukin 1β is produced by activation mononuclear cells. Cytokine. 1990; 2:190-198.

Thomas TK, Will PC, Srivastava A, et al. Evaluation of an interleukin-1 receptor antagonist in the rat acetic acid-induced colitis model. Agents Actions 1991; 34:187-190.

Toulmond S, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits neuronal damage caused by fluid percussion injury in the rat. Brain Res 1995; 671:261-266.

Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. J Exp Med. 1977;146:857-868.

Tucci A, James H, Chicheportiche R, Bonnefoy JY, Dayer JM, Zubler RH. Effects of eleven cytokines and of IL-1 and tumour necrosis factor inhibitors in a human B cell assay. J Immunol 1992; 148:2778-2784.

Ulich TR, Yin S, Guo K, Del-Castillo J, Eisenberg SP, Thompson RC. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines: III. The interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist inhibits endotoxin- and IL-1-induced acute inflammation. Am J Pathol 1991; 138:521-524.

van de Loo AA, Arntz OJ, Bakker AC, van Lent PL, Jacobs MJ, van den Berg WB. Role of interleukin 1 in antigen-induced exacerbations of murine arthritis. Am J Pathol 1995a; 146:239-249.

van de Loo FAJ, Joosten LAB, van Lent PLEM, Arntz OJ, van den Berg WB. Role of interleukin-1, tumour necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. Arthritis Rheum 1995b; 38:164-172.

van den Berg WB. Joint inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled. Springer Semin Immunopathol 1998; 20:149-164.

van Lent PL, van de Loo FA, Holthuysen AE, van den Bersselaar LA, Vermeer H, van den Berg WB. Major role for interleukin 1 but not for tumor necrosis factor in early cartilage damage in immune complex arthritis in mice. J Rheumatol 1995; 22:2250-2258.

Vigers GPA, Anderson LJ, Caffes P, Brandhuber BJ. Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta. Nature 1997; 386:190-194.

Von Uexkull C, Nourshargh S, Williams TJ. Comparative responses of human and rabbit interleukin-1 in vivo: Effect of a recombinant interleukin-1 receptor antagonist. Immunology 1992; 77:483-487.

Wakabayashi G, Gelfand JA, Burke JF, Thompson RC, Dinarello CA. A specific receptor antagonist for interleukin -1 prevents Escherichia coli induced shock in rabbits. FASEB J 1991; 5:338-343.

Ward TT, Steigbigel RT. Acidosis of synovial fluid correlates with synovial fluid leukocytosis. Am J Med 1978; 64:933-936.

Watson ML, Smith D, Bourne AD, Thompson RC, Westwick J. Cytokines contribute to airway dysfunction in antigen-challenged guinea pigs: inhibition of airway hyperreactivity, pulmonary eosinophil accumulation, and tumour necrosis factor generation by pretreatment with an interleukin-1 receptor antagonist. Am J Respir Cell Mol Biol 1993; 8:365-369.

Wiemann B, Van GY, Danilenko DM, et al. Combined treatment of acute EAE in Lewis rats with TNF-binding protein and interleukin-1 receptor antagonist. Exp Neurol 1998; 149:455-463.

Wooley PH, Whalen JD, Chapman DL, et al. The effect of an interleukin-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis and antigen-induced arthritis in mice. Arthritis Rheum 1993; 36:1305-1314.

Yamada J, Dana MR, Zhu SN, Alard P, Streilein JW. Interleukin 1 receptor antagonist suppresses allosensitization in corneal transplantation. Arch Opthalmol 1998; 116:1351-1357.

Yang YC, Tsai S, Wong GG, Clark SC. Interleukin 1 regulation of haematopoietic growth factor production by human stromal fibroblasts. J Cell Physiol 1988; 134:292-296.

Zheng H, Fletcher D, Kozak W, et al. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in Interleukin-1β-deficient mice. Immunity 1995; 3:9-19.