

細胞学的現象の一つは、好中球の炎症組織内への浸潤 (aseptic neutrophil infiltration)

と考えられている。この好中球は、特に superoxide 過剰産生好中球としての特徴がある。興味深いことに、ベーチェット病発症に深く関連するとされる遺伝子 *HLA-B51* を導入された Tg マウスでは、FMLP 刺激による superoxide 過剰産生好中球の数が増加していることが示された (Takeno *et al.*, 1995)。しかし、残念ながらこのマウスでは、ベーチェット病に付随する様々な症状 (皮膚の炎症、眼のブドウ膜炎の発症、口腔内アフタ、陰部潰瘍等) は見出されていない (Takeno *et al.*, 1995)。MICB 発現 Tg マウスに見られた白血球数の顕著な増加は、この superoxide 過剰産生好中球の数の増加を反映しているのか、今後、詳細な解析が必要である。

皮膚の角化異常については 1 系統では明確にあらわれ、別の 1 系統では一部の F₁ にのみ認められたため、MICB の過剰発現がこの変化を引き起こす責任遺伝子であるかしばらく観察が必要である。角化異常部位の病理学的検索では、角質層の肥厚、表皮層の肥厚が見られた。基底細胞層の分裂速度が何らかの影響で上昇し角化異常症を引き起こしている可能性がある。細胞表面上に MICA、MICB タンパク質を発現した細胞は腸管上皮に存在する $\gamma\delta$ T 細胞に認識され細胞障害を受けることが明らかになっている。(Groh *et al.*,

1998) マウス皮膚は $\gamma\delta$ T 細胞の豊富に存在する部位であり MICB Tg 皮膚でも同様の変化が起こる可能性がある。皮膚角化異常部の免疫組織学的検索が必要となる。抗マウス $\gamma\delta$ T cell による角化異常部の免疫染色を行ったが、真皮内の炎症細胞が少なく陽性細胞は判定出来なかった。(未公表データ)。今後皮膚の採材部位及び時期を検討し再検する必要があると思われる。また MICB mRNA の過剰発現系の F 2 のうち 2 匹で角膜混濁の所見が見られ、1 週間ほどで消失した。(未公表データ) さらなる観察が必要である。

MICA と MICB は、MHC クラス I 配列と比較した場合、細胞外ドメインである $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ との相同性は 27% と極めて低い、立体構造的には HLA クラス I 抗原と酷似するので、その分子にはペプチド結合部位、T 細胞認識部位があると想像される (Bahram *et al.*, 1994)。しかし、HLA クラス I 抗原とは異なり、 $\beta 2$ -microglobulin とは結合していないとされる (Bahram *et al.*, 1994)。従って、MICA と MICB は、古典的な MHC クラス I 抗原提示の系には関係しないのではないかと予測もある。MICA に対する monoclonal 抗体による免疫組織化学的解析から MICA タンパク質は、小腸上皮にのみ局在することが判明した (Groh *et al.*, 1996) が、これは、MICA が腸上皮細胞内リンパ系における T 細胞サブセットへのリガンドとして機能する、言い換えれば、特殊な T 細胞の免疫監視系において機能することを示唆している。しかも、MICA 及び MICB の発現は熱ショック誘導性を示し、MICA 及び MICB 遺伝子 promoter 内には、熱ショック応答性 element が存在することから (Groh *et al.*, 1996)、一方では、cell stress response 遺伝子の一つではないかとされている。細胞表面上に MICA、MICB 蛋白質を発現した細胞は腸管上皮に存在する $\gamma\delta$ T 細胞に認識され細胞障害を受けることが明らかになっている。(Groh *et al.* 1998)。

今後は Tg を用いて上述のような MICA、MICB 遺伝子の機能を確認したい。またリン

パルプサブセットの変化や血中の蛋白分画などに影響がないか検討が必要である。

また、MICB 発現 Tg マウス, MICA 発現 Tg マウス, HLA-B51 Tg マウスとの掛け合わせにより, よりパーチェット病に近い表現型が現れることが期待できる。また HLA-B51 Tg マウス, ヒト β 2 ミクログロブリン Tg, マウス β 2 ミクログロブリンノックアウトマウスとを交配することで細胞表面での HLA-B51 タンパク質の細胞表面への発現を高くすることを計画している。

MICA 及び MICB の機能は何であるか, 今持ってその実体は明らかでないが, これらタンパクを過剰発現する Tg マウスを用いることにより, その実体解明にいくらかでも接近出来るのではないかと考えている。特に免疫系への影響の解明には個体を用いた研究が必要となる。そして, その解明の過程の先に, これらのタンパク質とパーチェット病発症との因果関係が明らかにされるものと期待される。

[参考文献]

Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, E., and Spies, T. (1994) A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6259-6263.

Bahram, S. and Spies, T. (1996) Nucleotide sequence of a human MHC class I *MICB* cDNA. *Immunogenetics* 43, 230-233.

Bahram, S., Mizuki, N., Inoko, H., and Spies, T. (1996a) Nucleotide sequence of the human MHC class I *MICA* gene. *Immunogenetics* 44, 80-81.

Bahram, S., Shiina, T., Oka, A., Tamiya, G., and Inoko, H. (1996a) Genomic structure of the human MHC class I *MICB* gene. *Immunogenetics* 45, 161-162.

Mizuki N., Ando H., Kimura M., Ohno S., MiyataShoji, Yamazaki M., Tashiro H., Watanabe K., Ono A., Taguchi S., Sugawara C., Fukuzumi Y., Okumura K., Gotoh K., Ishihara M., Nakamura M., Yonemoto J., Kikuti Y. Y., Shina T., Chen L., Ando A., Ikemura T., and Inoko H. (1997) Nucleotide Sequence Analysis of the HLA Class I Region Spanning the 237-kb Segment around the HLA-B and -C Gene. *GENOMICS* 42, 55-66

Miyazaki J., Takaki S., Araki K., Tashiro F., Tominaga A., Takatsu K. and Yamamura K-I. Expression vector system based on the chicken β -actin promoter directs interleukin-5. *Gene* 79, 269-277

Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., and Spies, T. (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal

epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12445-12450.

Mizuki, N., Ota, M., Kimura, M., Ohno, S., Ando, H., Katsuyama, Y., Yamazaki, M., Watanabe, K., Goto, K., Nakamura, S., Bahram, S., and Inoko, H. (1997) Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the *MICA* gene: A strong association of six GCT repetitions with Behcet's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1298-1303.

Takeo, M., Kariyone, A., Yamashita, N., Takiguchi, M., Mizushima, Y., Haneoka, H., and Sakane, T. (1995) Excessive function of peripheral blood neutrophils from patients with Bechet's disease and from HLA-B51 transgenic mice. Arthritis Rheumat. 38, 426-433.

Groh, V., Steinle A., Bauer S., Spies T., Recognition of Stress-induced MHC Molecules by Intestinal Epithelial $\gamma \delta$ T Cells. Science, 279. 1737-1740. 1998

HLA-B*5101 結合ペプチドの低結合性の解析

滝口 雅文 (熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野)

曾場尾 勇司 (熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野)

KEYWORD= ベーチェット病, HLA-B*5101, ペプチド, Bw4 エピトープ

[目的] HLA-B*5101 結合ペプチドの低結合性を解析するために、同じ B5CREG 抗原である HLA-B*5301 に結合するペプチドの結合性を解析し、HLA-B*3501 結合ペプチドと比較、検討した。

[方法] RMA-S-B*5301 細胞を用いた HLA class I stabilization assay により、HLA-B*5301 結合ペプチドの結合能について解析した。また、HLA-B*3501 分子への結合を比較検討した。

[結果] 報告されている HLA-B*5301 拘束性 CTL エピトープペプチドの結合能は、HLA-B*3501 拘束性 CTL エピトープペプチドの結合能と比べて低かった。また多数のペプチドの HLA-B*3501 と HLA-B*5301 への結合を比較した所、B*5301 への結合は著しく低下した。

[結論] HLA-B*5301 と HLA-B*3501 は Bw4/Bw6 エピトープのみ異なっているため、Bw4 エピトープがペプチドの結合性を低めていると考えられた。このことから、同じ B5CREG である HLA-B*5101 結合ペプチドの低結合性は、Bw4 エピトープによって決定されると考えられた。

Analysis of low affinity of HLA-B*5101 binding peptides

Masafumi Takiguchi(Division of Viral Immunology, Center for AIDS Research, Kumamoto University), Yuji Sobao(Division of Viral Immunology, Center for AIDS Research, Kumamoto University)

[Purpose] Affinity of HLA-B*5301 binding peptides was studied and compared to that of HLA-B*3501 binding peptides in order to analyze low affinity of HLA-B*5101 binding peptides.

[Method] Binding of peptides carrying HLA-B*5301 anchor residues to HLA-B*5301 was examined by HLA-B*5301 stabilization assay using RMA-S-B*5301 cells.

[Results] Affinity of HLA-B*5301-restricted CTL epitope peptides was lower than that of HLA-B*3501-restricted CTL epitope peptides. Direct comparison of affinity of a panel of peptides for HLA-B*5301 and HLA-

B*3501 showed that affinity of peptides for HLA-B*5301 is much lower than that for HLA-B*3501.

[Conclusion] Residues associated with Bw4/Bw6 epitopes determine affinity of peptides for these HLA-B molecules.

[はじめに]

HLA-B*5101 とベーチェット病の相関が知られている。HLA-B*5101 のベーチェット病にどのように関わっているかまだ不明だが、HLA-B*5101 分子が提示する T 細胞エピトープの認識によって、この病気が発症する事が1つの可能性として考えられる。よって、HLA-B*5101 分子に結合するペプチドの解析は重要であると考えられる。我々は既に HLA-B*5101, B*5102, B*5103 分子に結合するペプチドのモチーフを明らかにし^{1)~3)}、これらのペプチドが3つの HLA-B51 に低結合性を示す事を明らかにした。一方、HLA-B5, B35CREG 抗原である HLA-B*3501 に結合するペプチドは、モチーフが HLA-B51 に結合するペプチドにきわめて類似しているのに^{4)~6)}、その結合性は HLA-B51 結合ペプチドと比べて著しく高かった。そこで、HLA-B*3501 と HLA-B*5101 とのちょうど中間的な分子である HLA-B*5301 に結合するペプチドに関して、そのモチーフと結合性について検討した。

[方法]

(1)B*5301 結合自己抗原ペプチドのモチーフ解析より、HLA-B*5301 結合ペプチドのアンカーは2番目が Pro である事が明らかになっている。一方、C 末端のアンカーは HLA-B*3501 および B*5101 とともに疎水性のアミノ酸のため、HLA-B*5301 も疎水性のアミノ酸がアンカーになっている可能性が大きい。そこで、2番目が Pro, C 末端が疎水性のアミノ酸である 62 個の HIV-1 9-mer ペプチドを合成し、その結合能を HLA-B*5301 stabilization assay を用いて調べた。さらに C 末端アンカーを確定するために、C 末端のミュータントペプチドを作成して調べた。(2)報告されている HLA-B*5301 拘束性 CTL エピトープペプチドの結合能と HLA-B*3501 拘束性 CTL エピトープペプチドの結合能を、合成ペプチドを用いて比較検討した。(3)18 種類のペプチドの HLA-B*5301 と HLA-B*3501 に対する結合能を比較検討した。

[結果]

(1) 62 種類の 9-mer ペプチドの結合能の解析より、34 ペプチドが HLA-B*5301 に結合した。C 末端が Phe, Ile, Tyr, Leu であるペプチドの結合能は高かったが、Met であるペプチドの結合能は低かった。これらの4つのアミノ酸

は C 末端でアンカーとして働いていると考えられた (表-1)。これらのアンカーは、ミュータントペプチドの解析より確認できた。

表 1 9-mer ペプチドの C 末端アミノ酸の HLA-B*5301 への結合におよぼす影響

	Amino acid of the C-terminus					Total
	F	I	Y	L	M	
N.B.P./N.T.P.*	6/7	10/17	7/12	10/17	1/9	34/62
(percentage)	(85.7%)	(58.8%)	(58.3%)	(58.8%)	(11.1%)	(54.8%)
MBR**	1.43	1.18	1.00	0.94	0.22	0.97

* N. B. P : number of binding peptide, N. T. P : number of total peptide tested.

** mean binding rank

(2) HLA-B*5301 拘束性 CTL エピトープの HLA-B*5301 への結合能は、HLA-B*3501 拘束性 CTL エピトープの HLA-B*3501 への結合能と比べて低かった (表-2)。

表 2 CTL エピトープペプチドの HLA クラス I の結合

HLA-B*5301- restricted epitopes	BL ₅₀ *	HLA-B*3501- restricted epitopes	BL ₅₀	HLA-B*5101- restricted epitopes	BL ₅₀
TPYDINQML	2.4×10^{-5}	EPIVGAETF	7.4×10^{-8}	LPPVVAKEI	6.1×10^{-6}
KPIVQYDNF	2.9×10^{-5}	FPVRPQVPL	1.2×10^{-7}	TAFTIPSI	6.8×10^{-6}
		IPLTEEAEL	1.4×10^{-7}	DAYFSVPL	2.3×10^{-5}
		NPDIVIYQY	3.7×10^{-7}	LPCRIKQII	7.3×10^{-5}
		DPNPQEVVL	7.5×10^{-6}	NANPDCKTI	4.0×10^{-4}
		EPIVGAETFY	1.2×10^{-5}	QGWKGS PAI	$>10^{-3}$
		RPQVPLRPMTY	2.7×10^{-5}		
		VPLDKDFRKY	4.5×10^{-5}		
		RPIVSTQLL	1.1×10^{-4}		

* 50% 結合能を与えるペプチド濃度 (M)

(3) 18 種類のペプチドの HLA-B*5301 と HLA-B*3501 への結合を比較した所、3 種類のペプチドはいずれの HLA クラス I にも結合しなかったが、他の 15 種類のペプチドはすべて HLA-B*5301 への結合が B*3501 と比べて著しく低かった (表-3)。

表3 HLA-B*5301およびHLA-B*3501へのペプチド結合能の比較

nonamer peptides	BL ₅₀	
	HLA-B*5301	HLA-B*3501
<u>peptides carrying Phe at P9</u>		
E P I V G A E T F	4.3×10^{-5}	7.4×10^{-8}
D P E I V M H S F	$>10^{-3}$	2.9×10^{-4}
P P H S A K S K F	NB	NB
<u>peptides carrying Ile at P9</u>		
Y P C T V N F T I	1.4×10^{-5}	3.9×10^{-6}
L P C R I K Q I I	1.6×10^{-4}	6.6×10^{-6}
L P P T T G P P I	$>10^{-3}$	2.2×10^{-4}
Q P R G R R Q P I	NB	NB
<u>peptides carrying Tyr at P9</u>		
S P S S T P L L Y	1.5×10^{-5}	4.4×10^{-7}
L P I V G A E T Y	2.0×10^{-4}	5.2×10^{-7}
V P G A A Y A L Y	$>10^{-3}$	1.1×10^{-4}
G P K E P F R D Y	NB	NB
<u>peptides carrying Leu at P9</u>		
F P V R P Q V P L	1.2×10^{-5}	1.2×10^{-7}
D P N P Q E V V L	3.8×10^{-4}	7.5×10^{-6}
Y P L T S L R S L	$>10^{-3}$	3.5×10^{-6}
P P A V H G C P L	NB	$>10^{-3}$
<u>peptides carrying Met at P9</u>		
R P I V S T Q L M	1.5×10^{-4}	3.2×10^{-5}
A P P P S W D Q M	NB	7.5×10^{-5}

[考察]

HLA-B*5301 結合ペプチドの C 末端のアンカーは明らかになっていなかったが、今回の研究で 4 つの疎水性のアミノ酸がアンカーになっている事が明らかになった。また CTL エピトープペプチドの結合能の解析より、HLA-B*5301 結合ペプチドの結合能は、HLA-B*3501 結合ペプチドの結合能より低い事が明らかになった。この事は異なったアンカーをもった 15 種類の同一ペプチドの両 HLA クラス I 分子への結合を調べた実験でも明らかになった。

HLA-B*5301 と HLA-B*3501 間の違いは、 α 1 ドメイン上の Bw4/Bw6 エピトープである 5 つのアミノ酸 (77, 80, 81, 82, 83 番目)で見られる⁸⁾。この事

よりペプチドの結合性は違い(HLA-B*3501 結合ペプチド：高結合性、HLA-B*5101 結合ペプチド：低結合性)は、Bw4/Bw6 エピトープによって決定されていると考えられる。この事から判断してHLA-B*5101 結合ペプチドの低結合性は、Bw4 エピトープによって決定されていると考えられる。しかしこれは、HLA-B*5101 結合ペプチドの低結合性は、特有なものでない事を意味しており、ベーチェット発症の機序には HLA-B*5101 結合ペプチドの低結合性は関与していない事を示唆している。

[参考文献]

- 1)Falk K, Rötzschke O, Takiguchi M, et al: Peptide motifs of HLA-B51, -B52 and -B78 molecules, and implications for Behçet's disease. *Int immunol* 1995;7: 223-228.
- 2)Kikuchi A, Sakaguchi T, Miwa K, et al; Binding of nonamer peptides to three HLA-B51 molecules which differ by a single amino acid substitution in the A-pocket. *Immunogenetics* 1996;43: 268-273.
- 3)Sakaguchi T, Ibe M, Miwa K, et al; Binding of 8-mer to 11-mer peptides carrying the anchor residues to slow assembling HLA-class I molecules (HLA-B*5101). *Immunogenetics* 1997;45: 226-228.
- 4)Falk K, Rötzschke O, Grahovac B, et al: Peptide motifs of HLA-B35 and -B37 molecules. *Immunogenetics* 1993;38: 161-162.
- 5)Schönbach C, Ibe M, Shiga H, et al; Fine tuning of peptide binding to HLA-B*3501 molecules by nonanchor residues. *J Immunol* 1995;154: 5951-5958.
- 6)Schönbach C, Miwa K, Ibe M, et al; Refined peptide-HLA-B*3501 binding motif reveals differences in 9-mer to 11-mer peptide binding. *Immunogenetics* 1996;45: 121-129.
- 7)Hill AVS, Elvin J, Willis AC, et al; Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 1992;360: 434-439.
- 8)Hayashi H, Ooba T, Nakayama S, et al; Allospecificities between HLA-B35 and HLA-Bw53 are generated by substitution of the residues associated with HLA-Bw4/Bw6 public epitopes. *Immunogenetics* 1990;32:195-199.

ベーチェット病患者の抗リポテイコ酸抗体価

藤野 雄次郎 (東京大学医学部, 眼科)

陳 軍 (東京大学医学部, 眼科)

蕪城 俊克 (東京大学医学部, 眼科)

KEYWORD ベーチェット病、グラム陽性菌、抗リポテイコ酸抗体価

[目的]ベーチェット病の原因として、グラム陽性菌の連鎖球菌の関与が指摘されている。我々は、グラム陽性菌に存在するリポテイコ酸が動物にぶどう膜炎を惹起しうることを報告した。今回、ベーチェット病におけるリポテイコ酸の関与を調べる目的で、リポテイコ酸に対する抗体価を測定した。[方法]ベーチェット病患者30例、急性虹彩毛様体炎患者16例、正常人25例を対象とした。Streptococcus (Str) sanguis と Str. pyogenes のリポテイコ酸を抗原として、血清中の抗リポテイコ酸 IgGおよびIgA抗体をELISA法にて測定した。抗LPS抗体価も調べた。[結果]ベーチェット病患者の抗LTA IgA抗体価は正常人に比べ有意に高く、また活動期の患者は非活動期の患者に比べ有意に高値であった。抗LTA IgG抗体価は患者全体では正常人と差はなかったが、活動期の患者は非活動期の患者より高値であった。抗LPS抗体価はIgG、IgAともに正常人と差がなかった。[結論]ベーチェット病とリポテイコ酸の関連が示唆された。

Antibody to LTA in patients with BD

Fujino Yujiro, Chen Jun, Kaburaki Toshikatsu

(Tokyo University School of Medicine, Department of Ophthalmology)

[Purpose] Streptococcal infection is thought to be one of the important causative factors in Behçet's disease(BD). Previously we reported that lipoteichoic acid (LTA) from Gram-positive bacteria could induce experimental uveitis in animals. Therefore, we examined anti-LTA antibody titres from serum samples of patients with BD to investigate the relationship between streptococcal infection and BD. [Methods] Thirty patients with BD, 16 patients with acute iridocyclitis and 25 healthy controls were included in this study. LTAs from Streptococcus sanguis (S sanguis) and Streptococcus pyogenes (S pyogenes), and LPS were used as antigens. Serum anti-LTA or LPS antibodies were measured by ELISA. [Results] Anti-LTA IgA titers elevated significantly in patients with BD compared with normal controls ($P<0.01$). A significant increase of anti-LTA IgG titers was also determined in patients with active BD compared with normal controls ($P<0.05$). No significant elevation of anti-LPS antibodies was shown between BD and normals. [Conclusions] LTA may play important roles in Behçet's disease.

〔はじめに〕 ベーチェット病の原因として、グラム陽性菌の連鎖球菌の関与が指摘されている。我々は、グラム陽性菌に存在するリポテイコ酸 (Lipoteichoic acid; LTA) が動物にぶどう膜炎を惹起しうることを報告した¹⁾。今回、ベーチェット病におけるリポテイコ酸の関与を調べる目的で、リポテイコ酸に対する抗体価を測定した。

〔対象と方法〕 1998年3月から9月の間に東大眼科を受診したベーチェット病患者30例を対象とした。その内訳は、男性25例、女性5例で、年齢は27~68才 (平均43才) であった。採血は患者からの同意を得た後で眼発作、全身症状の有無に関わらず無作為に行った。また、ベーチェット病以外のぶどう膜炎患者として急性前部ぶどう膜炎16例 (男性12例、女性4例) から同様に採血した。また正常コントロールとして健常人25例 (男性18例、女性7例) を用いた。抗体価の測定は過去の報告に基づきELISA法で行った²⁾。抗原として、Streptococcus sanguis と Streptococcus pyogenes のLTAを用いた。また、対照としてE. coli LPSを用いた。2次抗体としてalkaline phosphatase labeled の抗ヒトIgG またはIgAを用いた。予備実験として、LTAとLPSに交差反応のないことを確かめた。

〔結果〕 ベーチェット病患者の血清は正常人に比べ、抗Streptococcus sanguis と Streptococcus pyogenes LTA IgA抗体価が高値であった (いずれも $P<0.01$ 、表1)。またベーチェット病患者を活動期の患者 (13例) と非活動期の患者 (17例) に分けて検討すると、活動期の患者は非活動期の患者に比べ有意に高値であった ($P<0.01$ 、表2)。抗IgG抗体はベーチェット病患者全体では正常人と比べ差はなかったが、活動性患者は非活動性患者に比べ有意に高値であった ($P<0.05$)。抗LPS抗体はIgG、IgAとも正常人と差がなかった。急性虹彩毛様体炎患者は、抗LTA抗体は正常人と差がなかったが、抗LPS IgG抗体が有意に高値であった ($P<0.05$ 、表3)。

表1 LTA, LPS に対するIgA抗体価

	S. sanguis-LTA	S. pyogenes-LTA	LPS
BD	0.495±0.269**	0.645±0.395**	1.075±0.770
AIC	0.345±0.148	0.428±0.125	0.859±0.582
健常人	0.308±0.142	0.377±0.198	0.888±0.760

(mean±SD、** $P<0.01$)

BD: ベーチェット病, AIC: 急性虹彩毛様体炎

表2 活動性と非活動性ペーチェット病のIgA抗体価

	S. sanguis-LTA	S. pyogens-LTA
活動性BD	0.697±0.198**	0.962±0.392**
非活動性BD	0.351±0.221	0.419±0.214
健常人	0.308±0.142	0.377±0.198

** P<0.01

表3 LTA, LPS に対するIgG抗体価

	S. sanguis-LTA	S. pyogens-LTA	LPS
BD	0.234±0.115	0.284±0.151	0.155± 0.141
AIC	0.317±0.190	0.437±0.276	0.193± 0.087*
健常人	0.250±0.115	0.258±0.097	0.096± 0.066

* P<0.05

[考案・結論] これまでペーチェット病の原因としてStreptococcus pyogenes、Streptococcus sanguisの関与が報告されている。また、ペーチェット病患者ではIgA抗体価が高いことが報告されている。今回、抗LTA IgA抗体がペーチェット病患者で正常人に比べ有意に高かったが、抗LPS抗体価は正常人と差がなかったことから、これはIgA全体の増加による見かけの増加ではないものと考えられる。LTAはグラム陽性菌の細胞膜に存在し、LPSと類似の単球、マクロファージ活性化能を持つ事が知られており、我々は、LTAが実験的にぶどう膜炎を起こしうること、活動性ペーチェット病患者の末梢血単核球は、LPS刺激では正常人との間でIL-8産生能に有意差が認められなかったのに対し、LTA刺激では有意に高いIL-8産生能を示したことを報告した^{1),3)}。今回、ペーチェット病患者血清がこれらの細菌のもつLTAに対して高い抗体価を示したことは、これらの細菌あるいはLTAがペーチェット病の発症機序に関与している可能性を示唆するものと考えられる。

[参考文献]

- 1) Guillermo Merino, Yujiro Fujino, Rodolfo K Hanashiro: Lipoteichoic acid as an inducer of acute uveitis in the rat IOVS 39: 1251-1256, 1998.
- 2) Monefeldt K, Tollefsen T, Assev S, Rolla G: Increased serum IgG antibodies reactive with lipoteichoic acids in subjects with gingivitis. J Periodontal Res 22: 114-118, 1987
- 3) 藤野雄次郎、蕪城俊克、陳軍、ギシエルモメリノ：ペーチェット病とIL-8 厚生省特定疾患 免疫疾患調査研究班 ペーチェット病分科会 平成9年度研究班報告書 105-108, 1998

ベーチェット病の治療成績

藤野 雄次郎、平岡 美依奈、北川 真由美（東京大学医学部、眼科）
蕪城 俊克、陳 軍、林 清文（東京大学医学部、眼科）
伊澤 保穂、沼賀 二郎（東京大学医学部、眼科）

KEYWORD ベーチェット病、コルヒチン、シクロスポリン

[目的] ベーチェット病患者の眼症に対する内服治療薬として、主にコルヒチンとシクロスポリンが用いられている。当科では原則としてコルヒチンを第一選択薬としている。当科の治療成績を調べた。[対象] 1992年から97年の間に東大眼科を初診した眼症状を有するベーチェット病患者81例のうち、1年以上経過観察のできた53例について、眼症に対する内服治療薬と眼症のコントロールの良否について調べた。[結果] 経過観察中、内服治療なしの患者は9例のみであった。コルヒチン単独治療を行なった患者は40例で、うち眼発作コントロール良好例は24例（60%）であった。最初にシクロスポリン単独治療が行なわれていた4例では2例がコントロール良好であった。コルヒチンでコントロールが不良であったためにシクロスポリン単独治療に切り替えた12症例ではコントロール良好例は1例のみであった。コルヒチンとシクロスポリンの併用は14例で行われ、うちコントロール良好例は8例（57%）であった。シクロスポリンを使用した患者19例中4例（21%）に神経ベーチェット病様症状が出現した。[結論] コルヒチン治療で半数以上の患者の眼症コントロールができる。シクロスポリンとの併用により眼症コントロール良好例は増加するが、なおコントロール不良例が多数存在する。

Treatment of Behcet's disease

Fujino Yujiro, Hiraoka Miina, Kitagawa Mayumi, Kaburaki Toshikatsu,
Chen Jun, Hayashi Kiyofumi, Izawa Yasuho, Numaga Jiro
(Tokyo University School of Medicine, Department of Ophthalmology)

[Purpose] Colchicine and ciclosporine are used for the major treatment of Behcet's disease(BD). We selected colchicine as the first choice of medication. We investigated the efficacy of these drugs in BD patients in our clinic.[Methods] From 1992 to 1997, 53 of 81 patients who continued to visit our clinic for more than 1 year, were investigated to the clinical effects of medication. [Results] Nine patients did not need any systemic treatments. Sixty % of patients (24 in 40) receiving colchicine only had good efficacy from drugs. One of 12 patients who was treated with cyclosporine instead of colchicine was controlled

effectively. Fifty-seven % of patients (8 of 14) were controlled under the treatment of colchicine with ciclosporine. Additionally, 21% of patients (4 of 19) receiving ciclosporine suffered from the appearance of neurological manifestations. [Conclusions] In our series, more than half of BD patients showed a good efficacy under the treatment with colchicine. The combined therapy with ciclosporine increased the number of effective cases, but some of cases failed to be controlled by these medications.

〔はじめに〕 眼症状を有するベーチェット病患者の治療目的のひとつは眼炎症発作を抑制することである。そのための治療薬として、コルヒチンおよびシクロスポリンの内服が主に行なわれている。今回、東大眼科でのベーチェット病患者の治療状況を調べ、第1選択としてコルヒチン治療を行なった場合の結果が得られたので報告する。

〔対象と方法〕 1992年から1997年の間に東大眼科を初診したベーチェット病患者80例中1年以上経過観察ができた患者53例を対象とした。その内訳は男性43例、女性10例で、平均年齢は 37.9 ± 11.1 才であった。病型は完全型17例、不全型36例である。治療は、網膜ぶどう膜炎型の眼発作をくり返す患者、あるいは視力が0.1以下に低下する眼発作を起こした患者に対して、コルヒチンの内服1日2錠から開始した。一部の患者ではシクロスポリンから治療を開始した。コルヒチン治療によっても眼発作の頻度を抑制できない場合はシクロスポリン治療に切り替えた。シクロスポリン治療は原則として5mg/kgで開始し、治療効果および副作用状況に応じて減量した。それでも抑制できない患者に対してはシクロスポリンとコルヒチンの併用を行った。眼症のコントロールの良否はカルテを調べた。

〔結果〕 経過観察中、内服治療なしの患者は9例のみであった。コルヒチン単独治療を行なった患者は40例で、うち眼発作コントロール良好例は24例（60%）であった。うち眼発作がなくなった症例は11例、年1回以下4例、年1～2回が8例、年3回が1例であった。コントロール不良例は16例であった。コルヒチンからシクロスポリンに切り換えた症例は12例で、うちコントロールが良好な症例は1例のみで、他の11例は年4回以上の眼発作があり不良であった。最初にシクロスポリン単独治療が行なわれていた4例では2例がコントロール良好であった。コルヒチンとシクロスポリンの併用は14例で行われ、うちコントロール良好例は8例（57%）であった。シクロスポリンを使用した患者19例中4例（21%）に神経ベーチェット病様症状が出現した。

〔考案・結論〕 現在、ベーチェット病の眼発作抑制に用いられる薬剤としては、シクロスポリンとコルヒチンが代表的なものである。これまでの報告から、シクロスポリンが眼発作抑制に対してはより効果があるが、全身の副作用、特に神経ベーチェット病様症状の出現が懸念されるため、当初の治療としてはコルヒチン治療を行ない、無効例にシクロスポリンを使用することが奨められている。我々も原則的にコルヒチンを第一選

択薬として用いたが、その結果、治療を必要とする患者の約60%に眼発作の抑制が得られ、眼症コントロール良好と判断された。この結果は、過去の報告と一致し、内服治療のいない患者を合わせると、眼症を有する患者の約70%は無治療またはコルヒチンまでの治療で眼症を抑えられると考えられる。

今回の検討では、コルヒチンで眼症コントロールのできない患者にシクロスポリンの単独治療を行なったところ、コントロール良好となった患者は12人中わずかに1人であった。現在のシクロスポリン治療は5mg/kgの量で開始することが推奨されており、我々もこの量で開始した。シクロスポリンは、コルヒチンとの2重盲検試験で、コルヒチンより優れた効果のあることが明かにされているが、その時のシクロスポリンの用量は10mg/kgであった¹⁾。実際にシクロスポリン5mg/kgとコルヒチンの効果を比較した報告はなく、5mg/kgの量では眼症に対する抑制効果はコルヒチンとそれほど大きな差がないのかもしれない。コルヒチンとシクロスポリンの併用療法はこれら2剤が無効な14症例中8例で有用と判断された。先に我々はコルヒチンとシクロスポリンの併用療法において眼発作回数を減らせることを報告したが²⁾、今回の結果はそれと一致する結果と考えられた。シクロスポリンを内服する患者では、神経ベーチェット病様症状の出現する率が極めて高いことが知られている³⁾。今回の検討でも、そのために入院治療を必要とした患者が19例中4例に見られており、注意が必要である。

以上、眼症に対する治療の必要な患者のうち、コルヒチン治療により半数以上で眼症のコントロールができた。次の段階としてのCYA単独治療は効果的でなく、CYAとコルヒチンの併用により残りの半数弱で眼症コントロールが可能であった。

[参考文献]

- 1) Masuda et al: Double-masked trial of cyclosporin versus colchicine and long-term open study of cyclosporin in Behcet's disease. Lancet 8647: 1093-1095, 1989.
- 2) 北沢万里子、沼賀二郎、藤野雄次郎、林清文、伊沢保穂、増田寛次郎：ベーチェット病のシクロスポリンとコルヒチンの併用療法 臨眼 48：1401-1404, 1994.
- 3) 増田寛次郎、佐村雅義、林清文、藤野雄次郎：ベーチェット病患者の神経症状発現例の検討 ベーチェット病調査研究班平成7年度研究業績 p74-75, 1996.

サイトカイン機能阻害によるベーチェット病の新しい治療へのアプローチ

吉崎和幸（大阪大学健康体育部健康医学第一部門）

西本憲弘（大阪大学健康体育部健康医学第一部門）

青木千恵子（大阪大学健康体育部健康医学第一部門）

中村秀次（大阪大学医学部第三内科）

松野博明（富山医科薬科大学医学部整形外科）

松島綱治（東京大学医学系研究科社会医学専攻社会予防医学講座衛生学分野）

KEY WORD=サイトカイン、キメラ型抗TNF- α 抗体、ヒト抗IL-8抗体、ゼノマウス、性ホルモン

〔目的〕

我々はベーチェット病の病態にサイトカインの異常産生が関与していることを示し、サイトカインの作用を阻害することによるベーチェット病の新しい治療へのアプローチを模索している。TNF- α の異常産生に対してゼノマウスを用いてヒト抗IL-8抗体を作成し、ウサギ関節炎モデルを用いた抗IL-8抗体の有用性を検討する。また女性ベーチェット病患者で見られる性周期に伴う症状の増悪に注目し、性ホルモンとIL-6の関連を検討する。

〔方法と結果〕

1. TNF α 阻害によるベーチェット病治療へのアプローチ

前及び現班長と検討した結果、セントコア社の開発したキメラ型抗TNF α 抗体（cA2）による重症ブドウ膜炎を認めるベーチェット病患者への治療研究を計画し、先ず大野先生を中心とする臨床研究グループで行う予定にしている。

2. ヒト抗IL-8抗体の作成

ヒト免疫グロブリン遺伝子（H鎖とL鎖）を導入したマウスとマウス免疫グロブリン遺伝子を欠失したマウスとを交配して作成したゼノマウスにrecombinantのヒトIL-8を免疫し、ハイブリドーマを作成した。4種の特異抗IL-8抗体IgG-2(K)を得た。

3. 抗IL-8抗体によるウサギ関節炎モデルに対する作用

共同研究者の松島らはヒトIL-8と同様の抗原と作用を示すウサギIL-8に注目し、LPS又はIL-1の関節腔内への投与によるウサギ関節炎モデルを作成した。マウス抗ヒトIL-8抗体を関節内注入したところ関節内好中球浸潤を抑制し、関節軟骨破壊を阻止した。我々は患者手術時に得た関節組織をSCIDマウスの背筋に移植しSCID-HuRAを作成した。現在このモデルを用いてヒト抗IL-8抗体の投与による治療実験を行い、免疫組織化学染色による病変局所浸潤細胞の同定と治療による変化を解析している。

4. 腸管ベーチェット患者におけるLH、FSHによるIL-6の産生

50才女性の腸管ベーチェット患者での生理開始前に一過性の発熱と発熱時に血中のCRPとIL-6の上昇が見られた。次にLH又はFSH、エストロゲンによるIL-6の産生を末梢単核球を用いて検索した。その結果本患者のPBMCではLH、FSH刺激でIL-6が産生誘導されることが示された。エストロゲン刺激では全く誘導されなかった。

〔考察〕

1) キメラ型抗TNF- α 抗体（cA2）による治療研究は、現在導入のための問題点を解決

している過程である。

- 2) ヒト抗サイトカイン抗体として今後ヒト抗TNF- α 抗体あるいはヒト抗IL-6レセプター抗体を作成する。
- 3) マウス抗IL-8抗体はウサギ関節炎に対して炎症初期ばかりでなく慢性化した時期にも有効であることが示唆された。組織への好中球浸潤阻害が認められることから、IL-8活性阻害によるベーチェット病治療の可能性も示唆された。
- 4) 予備実験ではあるが、女性におけるベーチェット病の生理直前における症状増悪を、性周期に伴うペプチドホルモンの産生とIL-6との関連で説明できることを示唆した。

New therapeutic ways by the inhibition of cytokine function for Behçet's disease

Kazuyuki Yoshizaki¹⁾, Norihiro Nishimoto¹⁾, Chieko Aoki¹⁾, Hidetsugu Nakamura²⁾, Hiroaki Matsuno³⁾, Kouji Matsushima⁴⁾

1) Department of Medical Science I, School of Health and Sport Sciences, Osaka University

2) Osaka University School of Medicine, Internal Medicine III

3) Department of Orthopaedic Surgery, Toyama Medical and Pharmaceutical University

4) Occupational, Environment and Preventive Medicine, Social Medicine, Graduate School of Medicine Faculty, Tokyo University

[Purpose]

The experimental final purposes of our research are to investigate the pathogenic significance of abnormal cytokine production in Behçet's disease and to show the therapeutic approach by the inhibition of cytokine function for Behçet's disease.

- 1) To start the clinical research by using a chimeric antibody to TNF- α for Behçet's disease.
- 2) Establishment of human antibody to human IL-8 utilizing the xenomice which can produce human antibodies.
- 3) To know the therapeutic effect of anti IL-8 antibody on the experimental arthritis model in rabbit.
- 4) To elucidate the role of IL-6 in the Behçet's symptoms associated with menstrual cycle.

[Methods and results]

- 1) Prof. Ohno, the chief investigator of this project, is dissolving the problems concerning the clinical trial with anti TNF- α antibody, cA2.
- 2) Four human monoclonal IL-8 antibodies were established from the xenomice which was immunized with recombinant human IL-8.
- 3) The mouse anti IL-8 antibody inhibited the infiltration of neutrophils in the synovium of experimental rabbit arthritis and protected the destruction of articular cartilage. The established human monoclonal anti IL-8 antibody is now investigated the pathological effects on the in vivo experimental human arthritis in SCID-Hu model mice which are transplanted with human joint tissue from RA patient.
- 4) A fifty year old female patient with entero behçet's disease showed transit fever with elevation of serum CRP and IL-6 in the early period of menstruation.

The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from the patient were stimulated with LH, FSH and estrogen, respectively. LH and FSH induced the production of IL-6, but estrogen did not. PBMC from a healthy women did not produce IL-6 stimulated with either LH, FSH or estrogen.

[Discussion]

- 1) Human antibodies against other human cytokines than IL-8 are establishing utilizing

を産生しない、多様なヒト抗体を産生し得るゼノマウスを作成する。ゼノマウスに抗原を免疫し、型の如く脾細胞とP3U1との細胞融合にて求めたい抗体を作成する。今回、IL-8に対するヒトモノクローナル抗体を作成した。

3. ヒト抗IL-8抗体を用いた慢性炎症疾患治療へのアプローチ

IL-8は好中球走化性因子として同定され遺伝子がクローニングされたが、IL-8が生体内における炎症反応の成立に重要であり好中球活性化による組織破壊に関与することが明らかになった。ベーチェット病では好中球の組織への浸潤が特徴的である。また慢性関節リウマチ (RA) においても炎症活動期に好中球を中心とする白血球増多が血中ならびに関節内で認められる。これらのことは一部の慢性炎症性疾患の病態にIL-8深く関わっていることが示唆される。本年はゼノマウスを用いて作成したヒト抗IL-8抗体による慢性炎症性疾患の実験的RAモデル動物に対する作用を検討する。

4. 性周期に伴うベーチェット病症状増悪とIL-6の関連性の検討

女性のベーチェット病患者において、臨床上生理前から初期にかけて口内炎、陰部潰瘍等の増悪が頻発することはよく知られている。しかしながらこの現象の機序は全く不明であった。我々は生理開始直前に一過性の高熱を発す50才の腸管ベーチェット女性患者を経験し、発熱と同時にIL-6やCRPの上昇も認められたため、本ベーチェット患者における性ホルモンのIL-6産生増加の有無を検討した。

[方法と結果]

1. ヒト抗IL-8抗体の作成

ヒト免疫グロブリン遺伝子 (H鎖とL鎖) を導入したマウスとマウス免疫グロブリン遺伝子を欠失したマウスとを交配して作成したゼノマウスにrecombinantのヒトIL-8を免疫した。血清中に抗ヒトIL-8抗体が産生されていることをElisa法にて確認した後、型の如く免疫したマウスの脾細胞又はリンパ節細胞とP3U1ミエローマ細胞とを融合させハイブリドーマを作成した。抗原特異抗体の産生はElisaで同定した。12のハイブリドーマから4種の特異抗IL-8抗体IgG-2(K)を得、好中球上にあるIL-8受容体へのIL-8の結合の阻止度にて結合能を検索した。その結果を図1に示す。

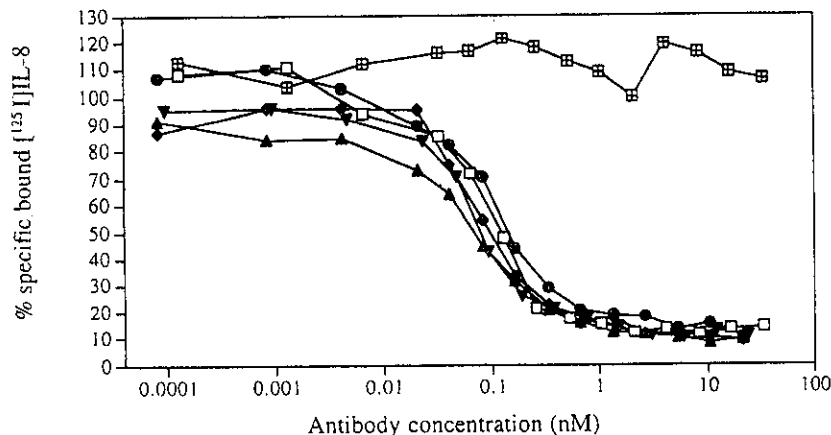


図1 Xenomouse-derived human antibodies block the binding of their specific antigens to cells. a, Inhibition of [¹²⁵I]IL8 binding to human neutrophils by the mouse anti-human IL8 antibody(□) and the fully human Mabs D1.1 (◆), K2.2(●), K4.2(▲) and K4.3 (▼). The background binding of [¹²⁵I]IL8 in the absence of antibody was 2657 cpm.

the zenomice.

- 2) The anti IL-8 antibody may be a useful therapeutic agent for the chronic inflammatory disease.
- 3) Induction of IL-6 by LH and FSH may be explained the recurrent symptoms associated with menstrual cycle of women patient with Behçet's disease.

[はじめに]

1. TNF α 阻害によるベーチェット病治療へのアプローチ

ベーチェット病はその発症原因に特異組織適合性抗原のHLA-B51あるいは、MICA、MICB、更にはNOBと特異外来抗原が関与すると考えられている。しかし、活動期に見られるぶどう膜炎やアフタ性口内炎、外陰部潰瘍、結節性紅斑などの特徴的な多彩な症状に加え、発熱や倦怠感などの非特異的な慢性炎症症状が認められ、その病態には種々の炎症性サイトカインが関与していると考えられる。既に我々が報告したように、ベーチェット病の患者において、血中IL-6は結節性紅斑の出現時に上昇を認めるものの、通常は軽度の上昇にとどまる。またIL-8の上昇も時に見られる。しかし、TNF α は活動期の有無に関わらず血清中ではつねに高値を示し、眼症状、陰部潰瘍が見られるときには更に上昇が観察された。更にin vitroにおいて患者末梢単核球からはTNF α の産生亢進が観察され、大野らによるEAU動物モデルにおいてもTNF α の産生増加が報告されている。このことからベーチェット病における多彩な症状の出現には異なったサイトカインの産生異常が関わっていると思われるが、その中でTNF α は主要なサイトカインであると考えられ、TNF α の活性を阻害することによって新たな治療が展開すると期待される。そこで前及び現班長と検討した結果、セントコア社の開発したキメラ型抗TNF α 抗体 (cA2) による重症ブドウ膜炎を認めるベーチェット病患者への治療研究を計画し、先ず大野先生を中心とする臨床研究グループで行う予定にしている。

2. 患者治療のためのキメラ型抗体、ヒト型化抗体そしてヒト抗体の作成

前述のごとく抗サイトカイン療法を抗体を用いて行うことの有用性を示したが、現在使用可能な抗TNF α 抗体 (cA2) はキメラ型抗体である。キメラ型はFab部分がマウス抗体でFc部分をヒト抗体にした抗体であるため、cA2投与により、この抗体に対する抗体が出現しやすく、抗体活性の低下のみならずアナフィラキシー出現の危険性も否定できない。事実cA2による慢性関節リウマチ (RA) 治療においては、有効性が認められるにも関わらず、抗cA2抗体の出現が約半数に認められ頻回投与が出来ない。このため我々はヒト型化抗IL-6レセプター抗体 (rhPM-1) を作成した。rhPM-1はFabのCDR部分のみをマウス蛋白としているため抗原性が低く、事実RA等20例中1例のみにイディオタイプ抗体を認めた。他の患者は頻回投与が可能で極めて有効であった。しかしヒト型化でも問題があり理想的にはヒト抗体が望まれた。このためゼノマウスを用いたサイトカインに対するモノクローナルヒト抗体を作成した。即ち、免疫グロブリンのD-J再結合に必要なDNA上のシス作用配列を破壊する置き換えベクターを導入したYAC導入酵母とES細胞を用いてマウス免疫グロブリンの発現を欠くマウスを作成する。次にヒト免疫グロブリン遺伝子 (H鎖では1500Kb) をYACベクターを用いてライブラリーを作成しES細胞と融合させ巨大な免疫グロブリン遺伝子をES細胞の染色体に取り込ませた。このようにして多様なヒト抗体を産生し得るマウスを作成する。この2種のマウスの交配によってマウス免疫グロブリン

2.抗IL-8抗体によるウサギ関節炎モデルに対する作用

1993年Verburghらは60例のRA患者の骨液中のIL-8がOAのそれに比べ10倍高値であることを示している(表1)。そこで松島らはヒトIL-8と同様の抗原と作用を示すウサギIL-8に注目し、LPS又はIL-1の関節腔内への投与によるウサギ関節炎モデルを作成した。マウス抗ヒトIL-8抗体を関節内注入したところ関節内好中球浸潤を抑制し、関節軟骨破壊を阻止したことから(図2)、RAの関節破壊にもIL-8の関与が示唆され且つ抗IL-8抗体がRAに対する治療戦略の一つとして期待された。次にIL-8がヒトRA関節炎における滑膜組織にどのステージで発現されるかを免疫組織化学染色を用いて検討した。この結果、早期RAでは滑膜の上皮細胞とマクロファージに発現し、活動時期においては多くの滑膜構成細胞、即ち滑膜上皮細胞、マクロファージのみならず、滑膜下線維芽細胞、血管内皮細胞、浸潤好中球等からも産生されていた。しかし末期の繊維化した滑膜には発現されていなかった。このことから抗IL-8抗体の投与は活動早期に有効性が発揮できるのではないかと示唆された。我々は患者手術時に得た関節組織をSCIDマウスの背筋に移植しSCID-HuRAを作成した。現在このモデルを用いてヒト抗IL-8抗体の投与による治療実験を行い、免疫組織化学染色による病変局所浸潤細胞の同定と治療による変化を解析している。

表1 IL-8 in synovial fluid of RA

	% positive samples (numbers of samples)	IL-8 in the positive samples ¹
RA	95% (57/60)	1,537 ± 3,049 (25-13780)
Gout	87.5% (7/8)	570 ± 952 (63-2713)
OA/ML	60% (6/10)	178 ± 188 (28-522)

pg/ml

¹ Mean ± SE (range)

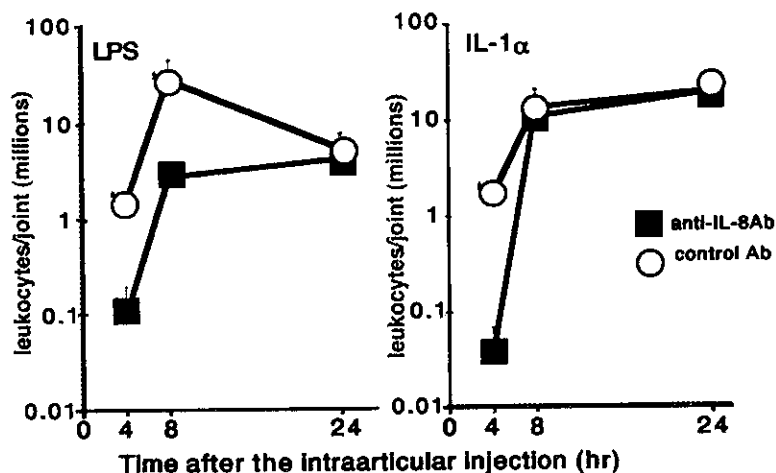


図2 Reduction of WBC infiltration in synovial space by anti-IL-8Ab

3.腸管ベーチェット患者におけるLH、FSHによるIL-6の産生

50才女性の腸管ベーチェット患者の熱型、血中レベルのIL-6とCRP、そして性周期を図3に示す。生理開始前に生じる周期的な一過性の発熱と発熱時に血中のCRPとIL-6の上昇が見られる。

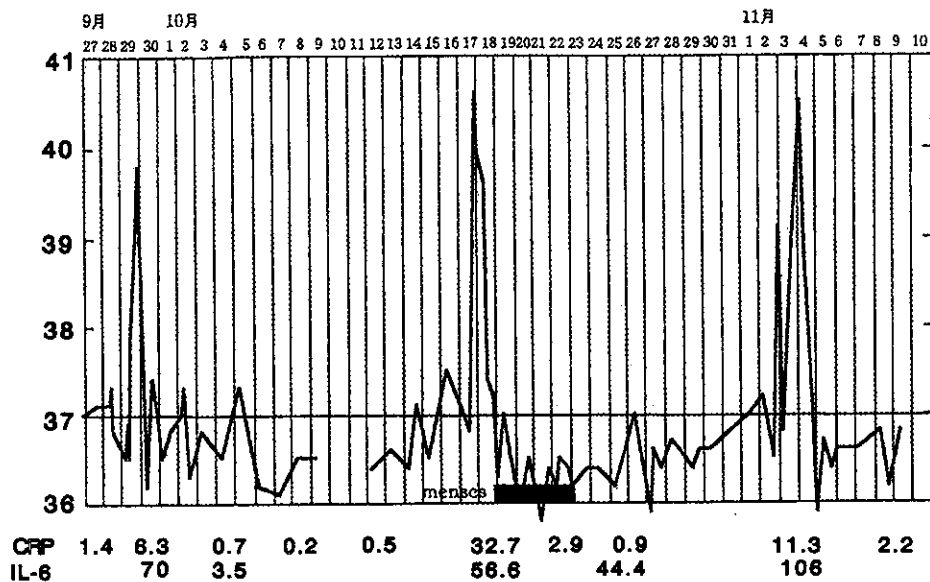


図3 腸管ベーチェットの熱型及び血中レベルのIL-6とCRP

以上の現象のためLH又はFSH、エストロジェンによるIL-6の産生の有無を検索するため、患者末梢単核球 (PBMC) を用いてin vitroにおいてLH、FSH、エストロジェン刺激を行い、培養上清中のIL-6を測定した。その結果図4、及び図5にあるように本患者のPBMCではLH、FSH刺激でIL-6が産生誘導されることが示された。エストロジェン刺激では全く誘導されなかった。

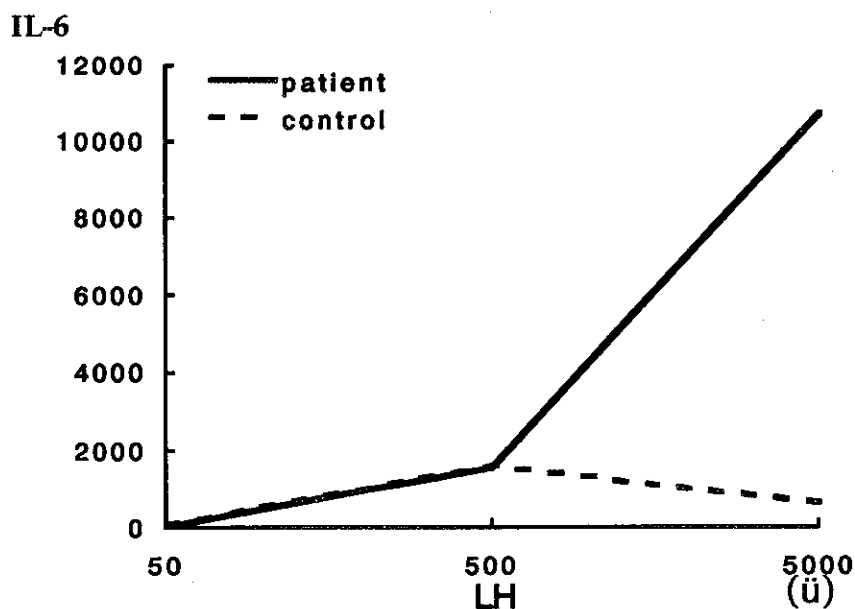


図4 Induction of IL-6 with LH in PBMC