

厚生科学研究（特定疾患対策研究事業）

ベーチェット病に関する研究

平成11年度研究報告書

平成12年5月

主任研究者 大野重昭

目次

I. 班員名簿

II. 総括研究報告

III. 分担研究報告

1. ベーチェット病患者におけるHLA-B遺伝子全長のゲノムシーケンシング
猪子英俊¹⁾、矢吹和朗¹⁾²⁾、椎名 隆¹⁾、佐野和美¹⁾、大野重昭²⁾
東海大・分子生命科学²⁾¹⁾、横浜市大・眼科²⁾

2. 日本人、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人ベーチェット病患者に
おけるHLA-B51抗原サブタイピングに関する研究
水木信久¹⁾、太田正穂²⁾、勝山善彦²⁾、安藤 等³⁾、猪子英俊³⁾、
矢吹和朗³⁾⁴⁾、中村 聡⁴⁾、大野重昭⁴⁾
国際親善総合病院・眼科¹⁾、信州大医学部法医²⁾、
東海大・分子生命科学³⁾、横浜市大・眼科⁴⁾

3. ベーチェット病患者におけるTNFAプロモーター領域の多型解析
太田正穂¹⁾、勝山善彦²⁾
信州大・法医¹⁾、信州大・薬剤¹⁾

4. ベーチェット病関連遺伝子導入マウスの開発
木村 穰¹⁾、末水洋志¹⁾、佐藤正宏²⁾、渡辺敏輝²⁾、長嶋綾子²⁾、
安岡有紀子²⁾、山下俊治¹⁾、野村英一³⁾、木村孝博³⁾、矢吹和朗³⁾、
大野重昭³⁾
東海大・分子生命科学²⁾¹⁾、東海大・総医研²⁾、横浜市大・眼科³⁾

5. *Streptococcus sanguis* 感染ノトバイオームマウスにおける眼病変の形成と
菌体コンポーネントに対する抗体応答
磯貝恵美子¹⁾、磯貝 浩²⁾、木村浩一³⁾、藤井暢弘³⁾、小竹 聡³⁾、
吉川浩二³⁾、大野重昭⁴⁾
北海道医療大・歯・口腔衛生¹⁾、札幌医大・実験動物²⁾、
北海道大・眼科³⁾、横浜市大・眼科⁴⁾

6. G-CSF遺伝子導入マウスを用いたベーチェット病発症のメカニズムの解析
磯貝恵美子¹⁾、小海康夫²⁾、磯貝 浩³⁾、横田慶治⁴⁾、小熊恵二¹⁾、
石原麻美⁵⁾、大野重昭⁵⁾
北海道医療大・歯・口腔衛生¹⁾、札幌医大・病理²⁾、
札幌医大・実験動物³⁾、岡山大・細菌⁴⁾、横浜市大・眼科⁵⁾
7. ELISPOT法によるベーチェット病患者末梢血のサイトカイン動態の解析
石ヶ坪良明¹⁾、萩原恵里¹⁾、大久保忠信¹⁾、青木昭子¹⁾、大野 滋¹⁾、
上田敦久¹⁾、中村聡²⁾、大野重昭²⁾
横浜市大・第一内科¹⁾、横浜市大・眼科²⁾
8. ベーチェット病患者におけるTh1型炎症の維持に対するTxkの重要性
坂根 剛¹⁾、永淵裕子²⁾、鈴木 登¹⁾
聖マリアンナ医大・免疫病害動物学¹⁾、
聖マリアンナ医大・難治研センター²⁾
9. ベーチェット病患者末梢血単核球におけるアポトーシス関連分子発現の検討
大野重昭、今川由香利、中村 聡、杉田美由紀、鳥山聖子、今井由美
横浜市大・眼科
10. ベーチェット病における精巢特異抗原に対する自己抗体
桑名正隆¹⁾、安岡秀剛²⁾、三森経世²⁾、河上 裕¹⁾
慶応義塾大・先端医科学研究所¹⁾、慶応義塾大・内科²⁾
11. ベーチェット病モデル動物を用いた免疫制御に関する研究
小野江和則¹⁾、北市伸義²⁾、小笠原一誠³⁾、小竹 聡²⁾、西平 順²⁾
北海道大・免研・病理¹⁾、北海道大・眼科²⁾、滋賀医大・第2病理³⁾
12. 網膜色素上皮細胞培養上澄み液(RPE-CS)のオルニチン網膜症に対する作用に関する研究
藤野雄次郎¹⁾、沼賀二郎²⁾、蕪城俊克²⁾、上甲 覚²⁾、川島秀俊²⁾、石井康雄³⁾、
清水一之⁴⁾、松元 俊⁴⁾
東京厚生年金病院・眼科¹⁾、東大・眼科²⁾、総合新川橋病院・眼科³⁾、
東京通信病院・眼科⁴⁾

13. フェージクローンによるサイトカイン結合阻害分子の開発
吉崎和幸
大阪大・健康体育部健康医学第一部門
14. ベーチェット病の治療と視力経過
大野重昭、八幡信代、中村 聡、鳥山聖子、石原麻美、高野昌代、
杉田美由紀
横浜市大・眼科
15. ベーチェット病の軽症化についての検討
小竹 聡、寺山亜希子、斉藤朱里、新田卓也、合田千穂
北海道大・眼科
16. 難治性ベーチェット病に対する低用量ステロイド薬併用療法
藤野雄次郎¹⁾、平岡美依奈²⁾、北川真由美²⁾、蕪城俊克²⁾、吉田 淳²⁾、
陳 軍²⁾、沼賀二郎²⁾、川島秀俊²⁾、林 清文²⁾、伊沢保穂²⁾
東京厚生年金病院・眼科¹⁾、東大・眼科²⁾
17. シクロスポリン投与に伴う中枢神経症状発現の危険因子に関する検討
小竹 聡、新田卓也、青柳麻衣子
北海道大・眼科
18. 新生血管を伴うベーチェット病に関する研究
藤野雄次郎¹⁾、川島秀俊²⁾、平岡美依奈²⁾、沼賀二郎²⁾、北川真由美^{1,2)}、
蕪城俊克²⁾、吉田 淳²⁾、清水一之²⁾、谷合 厚²⁾、林 清文²⁾、伊沢保穂²⁾
東京厚生年金病院・眼科¹⁾、東大・眼科²⁾
19. ベーチェット病患者における眼手術成績と術前眼炎症との関連に関する研究
小竹 聡、合田千穂、笹本洋一、寺山亜希子
北海道大・眼科
21. 皮膚科からみたベーチェット病とその類症
金子史男、尾山徳孝、佐藤正隆、山口亜紀、大塚幹夫
福島医大・皮膚科

I. 班員名簿

区分	氏名	所属	役職
主任研究者	大野重昭	横浜市立大学医学部眼科	教授
分担研究者	猪子英俊	東海大学医学部分子生命科学	教授
	小野江和則	北海道大学免疫科学研究所	所長
	木村 穰	東海大学医学部分子生命科学	教授
	藤野雄次郎	東京厚生年金病院眼科	部長
	吉崎和幸	大阪大学健康体育部健康医学	教授
	太田正徳	信州大学医学部法医学	講師
	坂根 剛	聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター	教授
	磯貝恵美子	北海道医療大学歯学部口腔衛生	助手
	小竹 聡	北海道大学医学部眼科	講師
	福原 俊一	東京大学大学院医学系研究科	講師
	水木信久	国際親善総合病院眼科	医長
	石ヶ坪良明	横浜市立大学医学部第一内科	教授
	金子史男	福島県立医科大学皮膚科	教授
桑名正隆	慶応義塾大学医学部先端医科学研究所	助手	
研究協力者	稲葉 裕	順天堂大学医学部衛生学	教授
事務局	杉田美由紀	横浜市立大学医学部眼科	助教授

〒236-0004 横浜市金沢区福浦3-9

TEL (045)787-2683 直通

FAX (045)781-9755

II. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金特定疾患研究事業総括研究報告

研究課題名

ベーチェット病に関する研究

主任研究者

大野重昭 横浜市立大学医学部眼科

分担研究者

猪子英俊	東海大学医学部分子生命科学
木村穰	東海大学医学部分子生命科学
小野江和則	北海道大学免疫研究所病理学
吉崎和幸	大阪大学健康体育部内科
藤野雄次郎	東京厚生年金病院眼科
坂根剛	聖マリアンナ医科大学難病治療センター
太田正穂	信州大学医学部法医学
小竹聡	北海道医療大学口腔外科
磯貝恵美子	北海道大学医学部眼科
福原俊一	東京大学大学院医学研究科内科
石ヶ坪一明	横浜市立大学医学部第一内科
金子史男	福島県立医科大学皮膚科

I 研究の目標と概要

課題 I ベーチェット病の発症機構の解析

ベーチェット病は人種を越えてHLA-B51抗原と強く相関していることが明らかにされており、特定の遺伝的背景のもとに、何らかの外的要因が作用して発症すると考えられている。平成9年度までに行われた本病の原因遺伝子解明の研究では、本病の原因遺伝子はHLA-B遺伝子またはMICA遺伝子のどちらかであると考えられたが、平成10年度の研究によってベーチェット病HLA-B51抗原が病因発症に第一義的に働き、MICA遺伝子はこの疾患の活性化要因であると可能性が高いことが明らかにされた。本年度はこの領域の全塩基配列の解析をすすめ、本病の原因遺伝子の正確なマッピングを試みる。また、患者リンパ球、好中球の機能解析や動物モデルを用いた研究で本病の免疫学的病態を解明する。

課題 II ベーチェット病の新しい薬物療法の開発

本病は口腔内アフタ、腸管の潰瘍、ぶどう膜炎、中枢神経症状などの症状を示す全身の慢性炎症性疾患であり、治療にはステロイド薬、免疫抑制薬などが用いられている。しかし、それらの薬剤のみでは十分な治療効果が得られない重症例もおおくみられる。これまでの研究成果でいくつかの新しい治療薬の可能性が示唆される実験結果が得られているが、特に抗TNF- α 抗体の効果が期待され、重症ブドウ膜炎を認めるベーチェット病に対しキメラ抗体である抗TNF α 抗体（Infliximab）を用いた治療試験が進行中でありその有効性が明らかにされつつある。今年度はこれらの方法に加えさらにその他の新しい治療法についても検討する。さらに、患者の予後調査、QOL調査などを行いより質の高い治療の開発をめざす。

II 研究成果

課題I ベーチェット病の発症機構の解析

平成10年度までに行われた研究によって、多因子性遺伝疾患であるベーチェット病はHLA-B51抗原が病因発症に第一義的に働くことが明らかにされ、特に日本人の患者においてHLA-B51分子をコードする対立遺伝子（アリル）としてHLA-B*5101、B*5109が同定されている。そこで今年度は他民族におけるアリルが検討された。96人の日本人患者、55人のギリシャ人患者、21人のイタリア人患者、13人のサウジアラビア人患者を対象として、HLA-B51サブタイピングをPCR-SBT法にて行った結果、日本人ではHLA-B51陽性患者57人中56人が、HLA-B*5101アリルであり、残りの1人はHLA-B*5102アリルであった。ギリシャ人ではHLA-B51陽性患者43人中76.7%がHLA-B*5101アリルで、30.2%がHLA-B*5108アリルであった。イタリア人ではHLA-B51陽性患者15人中73.3%がHLA-B*5101アリルで、26.7%がHLA-B*5108アリルであった。サウジアラビア人ではHLA-B51陽性患者10人中90.0%がHLA-B*5101アリルで、10.0%がHLA-B*5108アリルであった。HLA-B51陽性群におけるこれらのサブタイプ頻度は患者群間、対照群間で有意差はなかった。これらの結果は各民族におけるHLA-B51サブタイプの分布の相違によるものであり、本病はグローバルにHLA-B*51と相関していることが明らかにされた。

一方、ベーチェット病は種々のサイトカインが関与していると言われているが、特にTNF α は活動期の有無に関わらず血清中にはつねに高値を示し、ベーチェット病では重要な炎症マーカーである。今回HLAクラスIII領域にあるTNF α 遺伝子のプロモーター領域の多型を調べ、TNF α 遺伝子の多型がベーチェット病発症に関わるかを統計解析した。またTNF α 遺伝子の近傍のマイクロサテライト（TNFd, TNFa, D6S273, TAP1）を用いて、ベーチェット病における疾患感受性についての相関解析を行った。その結果、TNF α 遺伝子のアリルBに強い相関が見られ、マイクロサテライトでは、TNF α 遺伝子のテロメアー

側にあるTNFaのみに相関が認められた。患者群におけるTNF α 遺伝子のプロモーター領域のアリルBの頻度が有意に高くなったのは、Mantel-Haenszel法による層別解析からHLA-B51遺伝子との連鎖により生じたものと考えられた。一方、本病の発症機構および病態解明を試みるためベーチェット病責任遺伝子候補のHLA-B、MICA、MICB遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(Tg)を作成した。HLA-B51 Tgの新性質として網脈絡膜萎縮をみられた。MICA Tgでは貧血、両眼性脈絡膜萎縮、血管白線化が3系統にみられた。MICB Tgでは、体重減少や白血球数増加、生後1-2週の皮膚角化がみられた。これよりMICA,HLA-B51遺伝子産物がマウス網脈絡膜を障害しこれが本病の発症・進行に関わる可能性が示唆された。

ところで、ベーチェット病の発症には、宿主側の疾患感受性因子（内因）とともに、何らかの外因が存在すると考えられ、Streptococcus sanguisは以前より外因の候補と考えられてきた。そこでこのS. sanguisのG-CSF遺伝子導入マウスへの感染を試みた。S. sanguis (10⁹/ml) は口腔内および口腔粘膜下にそれぞれ10 μ lを接種した。G-CSF遺伝子導入マウスの対照として、そのリッターメイトマウスを使用した。感染14日目に眼の網膜抗原と高いホモロジーを示すBes-1ペプチドを口腔粘膜下に投与し、感染18日目まで観察した。S. sanguisは遺伝子導入マウスの口腔から回収することができた。一方、対照マウスの口腔からは回収できなかった。このことはG-CSFが好中球の機能を高め殺菌活性を高めるといった概念と一見矛盾するよう見える。しかし、口腔という内なる外の環境で接種された菌はこの作用を免れると考えられた。また、粘膜下に接種された菌による強い組織傷害は本菌の付着定着を容易にしたのかもしれない。これらマウスでは局所においてIL-6などが検出された。実際、ベーチェット病患者の口腔上皮細胞は変性が強く、こうした細胞にS. sanguisはよく付着していた。G-CSF遺伝子導入マウスの炎症は治癒しにくく、持続したことからS. sanguisの本病への関与が示唆された。

免疫応答に関する研究では、これまで本病にインターフェロン (IFN) γ を産生するTh1型細胞が関与することが明らかにされているが、細胞を刺激することなくin vivoでのサイトカインELISPOT法を用いて、ベーチェット病患者末梢血中のサイトカイン産生プロファイルを検討した。検出したサイトカインは、Th1サイトカインであるIFN γ 、Th2サイトカインであるIL-4、炎症性サイトカインであるTNF α の3種類であった。ベーチェット患者末梢血中では、活動性の高い患者群で有意にIFN γ 産生細胞数が増加していた。また、TNF α 産生細胞の増加も認められた。IL-4産生細胞数は頻度が少なすぎるため比較検討できなかった。抗IL-12中和抗体との培養により、患者末梢血中IFN γ 産生細胞数は減少する傾向にあったが、TNF α 産生細胞数の変化は認めなかった。この結果からベーチェット病にはTh1サイトカインであるIFN γ と炎症性サイトカインであるTNF α の関与が確認された。ところで、Tecファミリーチロシンリン酸化酵素のひとつであるTxkがIFN γ 産生に関与することをこれまでに報告したが、本年度はベーチェット病患者末梢血T細胞及び皮膚病変部におけるサイトカイン産生性とTxkの発現を検討した。ベーチェット病患者活動期では末梢血レベルでIFN γ 、IL-12の産生増加を認めた。さらに末梢血T細胞ではTh1型サイトカインの産生に関与するTxkの発現亢進を認めた。また皮膚病変部でもそのサイトカイン産生性はTh1型優位で、Txkの発現増強も認められた。これらの成績からTxkが本病の治療戦略の良い標的になることが示唆された。

これまでの研究でベーチェット病患者リンパ球のアポトーシスが抑制されていることが炎症を慢性化させている可能性が示唆されているが、今年度はベーチェット病患者末梢血単核球の、アポトーシス関連分子であるBcl-2及びBaxの発現をタンパク質レベルで解析した。その結果、活動期ベーチェット病患者の末梢血単核球におけるBcl-2タンパク質の発現量は、非活動期患者及び正常対照と比較して有意に高値であった。一方、Baxタンパク質の発現量は各群に有意な差はみられな

かった。また、Bcl-2/Baxの比を各群で比較すると、活動期患者群は非活動期患者群に比べ有意に高値であった。一方、Baxタンパク質の発現量は各群に有意な差はみられなかった。また、Bcl-2/Baxの比を各群で比較すると、活動期患者群は非活動期患者群に比べ有意に高値であった。これより活動期ベーチェット病患者の末梢血単核球はアポトーシス抑制蛋白であるBcl-2が過剰に発現した結果アポトーシスが抑制され、その炎症病態が形成されていることが示唆された。

また、ベーチェット病における精巣特異抗原HSS-Aに対する自己抗体の陽性頻度、臨床的意義を検討した。ベーチェット病43例、結節性多発動脈炎やヴェーゲナー肉芽腫症などの全身性血管炎12例、健常人23例を対象として、HSS-Aの部分断片を発現させたりコンビナント融合蛋白を抗原とした免疫ブロット法により血清中の抗HSS-A抗体を検出した。抗HSS-A抗体はベーチェット病4例(9%)に検出されたが、全身性血管炎や健常人では検出されなかった。抗HSS-A抗体陽性4例は全例が男性で、そのうち3例は神経あるいは血管ベーチェットを有していた。各種ヒト組織由来のcDNAのパネルを用いたPCRによりHSS-AのmRNAは精巣にのみ高発現されていることが確認された。以上の成績より、精巣特異抗原HSS-Aに対する自己抗体はベーチェット病男性例に特異的に検出され、神経、血管ベーチェットと関連する可能性が示された。抗HSS-A抗体の産生機序として、ベーチェット病に伴う精巣、精巣上体の血管炎により本来は隔絶抗原であるHSS-Aが免疫系に暴露されることが推測された。

課題 II ベーチェット病の新しい薬物療法の開発

治療に関する基礎的研究としてこれまでモデル動物を用いた研究がされてきた。ペプチド抗原による実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) をマウスとラットの系で誘導することに成功しているが、今回このモデル系を用いEAU発症を制御する方法を開発し、またEAU発症に関わるMIFの役割を解明す

ることを目的として研究を行った。B10.BRマウスにおけるEAU抑制は、予めリポソーム封入IRBP由来ペプチド (K2)、またはリポソーム封入K2と抗CD40L単クローン抗体を皮下注した後、型通りEAUを誘導する方法で検討した。また、LEWラットに抗MIF抗体を投与し、IRBP由来ペプチド (R16) 免疫後のEAU発症に対する影響を解析した。その結果、リポソーム封入抗原ペプチドと抗CD40L単クローン抗体投与は、マウスのTh1細胞にアナジーを誘導することによって、EAUを抑制することが判明した。また、ラットに抗MIF抗体を投与することにより、T細胞のシグナル伝達系が直接抑制され、その結果EAUを抑制することが判明した。以上の結果より、標的抗原の明確な自己免疫疾患の治療に応用可能な戦略基盤が確立した。

また、ベーチェット病眼症ではぶどう膜炎による網脈絡膜組織の障害により恒久的な視機能障害を起こすが、本年度の研究で網膜色素上皮細胞培養上澄み液(RPE-CS)がオルニチン網膜症に対し有効であり、病理組織学的検討からRPE-CSが網膜組織障害を軽減させる作用のあることが判明した。このことからRPE-CSがベーチェット病の網膜組織障害に対する治療薬となる可能性が考えられた。

一方抗サイトカイン療法に関しては、重症ブドウ膜炎を認めるベーチェット病に対し抗TNF α 抗体(Infliximab)を用いた治療試験が進行中でありその有効性が明らかにされつつある。しかしながらInfliximabはキメラ型抗体であるため使用制限がある。このため小分子によるサイトカイン阻害剤の開発を予定している。本年はファージディスプレイ法によるIL-6阻害分子の開発を目的とした研究を進めた。無差別配列した7アミノ酸より成るペプチドを表現したM13ファージライブラリーを用いてリコンビナントIL-6をコートしたプレートにまき、結合したファージを0.1Mグリシン塩酸バッファーで溶出した。ファージ溶液にER2537宿主細胞を加えた。同法を再度繰り返しIL-6結合ファージクローンを得た。IL-6特異結合クローンを選択するため、IL-6、ヒトIg、ヒトアルブミン、BSA、又はゼラチンをコートしたディッシュを用いて、

得られた18クローンを反応させ、ビオチン化抗M13抗体にて反応させた。その結果IL-6に特異的に結合するクローンを3~5種得た。今回、3~5種のクローンを得たが、数を増やすため2~3回同法を行い、その後IL-6依存増殖する細胞の増殖阻害を行う。更にTNF α 阻害分子を得るためには抗TNF α 抗体を用いる予定である。

実際の臨床の場で行われている治療に関しては眼症状と皮膚症状に対する治療について検討がなされた。

ベーチェット病の視力経過と発作回数、シクロスポリン治療の効果について眼症状発症1年以内の横浜市大のベーチェット病患者35例70眼を対象に検討された。発症時の視力は0.7以上のものが70%であったが徐々に減少し、8年後は17%であった。8年後は0.1未満が83%であった。眼発作回数は年に3回以上のものが、眼症状発症時29%みられ、年々徐々に減少していたが、8年後も16%にみられた。0.3未満の視力を示した38眼の視力低下の主な原因は併発白内障、硝子体混濁、視神経萎縮、黄斑変性などであった。観察期間中の主な治療はシクロスポリン内服例が19例54%であった。シクロスポリン導入後の眼発作回数は有意に減少していたが、治療開始2年後も年に3回以上の発作が9眼20%にみられた。これら9眼の視力経過は治療開始から2年で全例0.3以下に低下した。この結果よりシクロスポリン治療では眼発作を完全に抑制することはできず、視力低下の著しい症例もみられた。また、1975年から1984年の10年間に北大眼科を初診した患者と1985年から1994年の10年間に初診した患者の視力予後を0.1以下に陥った眼比率で比較した。その結果、女性患者では最近10年間のほうが0.1以下に陥る比率が低下していたが、男性患者では大きな変化はみられず、眼症状の軽症化傾向ははっきりしなかった。

シクロスポリン治療に伴う中枢神経症状出現危険因子に関しては長期経過を終えたシクロスポリン治療患者を中枢神経症状出現群15例と非出現群30例にわけ、危険因子を検討した。その結果、シクロスポリン投与量や血中濃度あるいは併用薬に危険因子はみいだせず

III. 分担研究報告

シクロスポリン投与開始年齢が早い症例で神経症状の出現が多く見られる傾向があった。

さらに手術、光凝固治療の眼炎症発作に対する影響に関して調査した。白内障手術前後の眼炎症発作を比較し、手術前7か月以上眼炎症発作がなく、しかも術前1年以内に発作回数が2回以下の症例の術後経過が良好であることが示された。また、光凝固に関しては、網膜静脈閉塞症に対しては発作の誘発が多く見られるが、網膜裂孔に対しては発作誘発の頻度が低いことが明らかとなった。また、網膜新生血管を伴うベーチエット病について調べた。東大眼科の患者統計ではその発現頻度はベーチエット病患者の2%であり、比較的若年男性の軽度炎症が持続する症例に起こり、硝子体出血を高頻度に起こすものの視力予後は比較的良好であった。治療では難治性ベーチエット病患者、すなわち、コルヒチン、シクロスポリンあるいは両薬剤の併用にも眼炎症発作を抑制できない患者10例に対して低用量ステロイド薬併用療法を行い、その効果について報告した。プレドニソロン併用後、7例において眼炎症発作頻度の減少が得られた。この結果から難治性ベーチエット病患者に対し、ステロイド薬の低用量併用療法は今後検討されてよい治療法と考えられた。

一方、慢性溶連菌感染巣の存在と溶連菌に対する過敏反応は、ベーチエット病の病因との関連が指摘されている。本病患者の治療において塩酸ミノサイクリンの溶連菌に対する抗菌作用と、病変部の過酸化状態への抗酸化作用は、臨床症状の改善に効果がある。そこで塩酸ミノサイクリンのもつ薬理作用の利点と、本病治療における有効な使用方法を検証した。咽頭より溶連菌を分離し得た患者(n=11)では、ほぼ全例で*St. Salivarius*菌体壁成分(CWSS)に対する皮膚反応が顕著であり、その病理組織所見は結節性紅斑に酷似していた。この患者群の末梢血単核球は健常人と比較して、CWSS刺激に対する炎症性サイトカイン(IL-1b、6、8)の産生能が亢進した。塩酸ミノサイクリンは低濃度で溶連菌への抗菌作用を持ち、CWSS刺激した末梢血単核球の

サイトカイン産生を選択的に抑制した。本病患者の治療において、塩酸ミノサイクリンは溶連菌慢性感染巣に対する抗菌作用のみではなく、抗炎症作用によっても症状増悪の初期において効果的であることを示していると考えられた。

ところで、さらにより質の高い治療をめざすために平成10年度よりベーチエット病の疫学調査およびQOL調査を進めている。平成10年に行った予後調査は、平成3年のベーチエットの全国調査の時に把握した2次調査対象者の内の800名を対象に実施した。しかし、数年間外来に受診がなく予後が不明であった患者が約半数を占めていた。そこで不明例の予後を追跡する方法として、住民基本台帳で生存/死亡を確認する方法を検討している。これは過去に慢性疾患などの予後追跡調査で行われこともあり、全国調査の2次調査票に記載されている患者の住所から、該当する市町村役場で生存/死亡、死亡の場合の死亡年齢を確認することができる。この調査の実施によって、本症発症によって生命予後に変化があったかどうか、日本人の平均余命と比較して同じか短い、また発症年齢や病型によって生命予後に差があるかどうか、等を検討できる。日本においてベーチエット病患者の生命予後についてのデータはほとんどないため、調査結果は治療研究、福祉面での基礎情報になると期待される。

ところで、ベーチエット病はほとんどの場合致命的ではないが現時点では根治性が望めないため、患者の日常生活が長期にわたって妨げられることが大きな問題点となっている。このため、治癒率や生存率などの伝統的なアウトカム評価だけでは不十分で、生存中の生活の質(QOL)を測定し評価することこそが大切と考えられる。特に、ベーチエット病は、多彩な症状が増悪、緩解を繰り返すこと、視力が障害されることが多いことなどから、患者のQOLに大きな影響を与えていると考えられる。昨年度は包括的な健康関連QOLの指標であるSF-36を用いて、少数の眼病変を持つベーチエット病患者を対象にパイロット研究を行い知見を得たが、より多数の眼疾

患以外の病変を有する患者に対する検討の必要性が指摘された。また、ベーチェット病の活動性および重症度は、患者のQOLに影響を与える重要な関連因子と考えられるが、これらの活動性指標や重症度分類はまだ確立されていない。そこで今年度はベーチェット病患者に対する大規模QOL研究のプロトコールを作成すると共に、研究に必要な活動性指標および重症度分類の草案の作成、対象患者数把握のための予備調査を行っている。現在、患者、医師に対する質問票は完成しており、34施設、約300名を対象に調査を開始する予定である。

厚生省特定疾患対策研究事業
ベーチェット病に関する調査研究班
分担研究報告書

ベーチェット病患者における HLA-B 遺伝子全長のゲノムシーケンシング

分担研究者

猪子 英俊 1)、矢吹 和朗 1)2)、椎名 隆 1)、佐野 和美 1)、大野 重昭 2)

1)東海大学分子生命科学 2

2)横浜市立大学眼科

研究要旨 ベーチェット病患者の HLA-B 遺伝子全長の塩基配列決定法を確立した。

A. 研究目的

本研究では、ベーチェット病患者自身の DNA を用いて、HLA-B 遺伝子全長のゲノムの塩基配列を決定し、患者群における HLA-B 遺伝子のエクソン領域内に限らず、プロモーター、エンハンサー、およびイントロン領域内の疾患特異的塩基配列の変異を検索し、HLA-B 遺伝子内における病因部位の同定を行う。

また、HLA 領域以外の疾患感受性部位を同定するために、全染色体上のマイクロサテライト多型を検索し、これらのマイクロサテライトアリルと疾患との相関解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

HLA-B51 抗原陽性ベーチェット病患者の DNA を用いて、PCR で HLA-B 遺伝子全長を含む 4.7kb を増幅した産物をクローニングする。これらの

クローンの DNA を抽出し、PCR-SSP 法により HLA-B51 対立遺伝子を含むクローンを分離したのち、ABI377 蛍光自動シーケンサーにて全塩基配列を決定する。決定した塩基配列と健常者群、およびわれわれが既に決定したコンセンサスの塩基配列との比較を塩基配列解析プログラムを用いて解析し、患者群に特異的な塩基配列の変異を検索する。

一方で、これまでに登録されたヒトゲノムのシーケンズデータをもとに全染色体上に 3 万個のマイクロサテライトを検索する。

(倫理面への配慮)

すべての血液提供者に対し研究の目的、使用法を説明し、同意を得た上で採血を行っている。また結果については提供者からの要望があれば開示する。また、プライバシーの保護のため、データについては第三者にもれないよう厳重に管理している。

厚生省特定疾患対策研究事業
ベーチェット病に関する調査研究班
分担研究報告書

C. 研究結果

HLA-B51 対立遺伝子をホモで持つ日本人健常者と日本人 HLA-B51 ヘテロ陽性ベーチェット病患者の HLA-B51 遺伝子の精度の高い塩基配列を決定することができた。

また、ベーチェット病の疾患感受性遺伝子をゲノムワイドに探索するために、ヒトゲノムの 90% 塩基配列に相当するドラフトシーケンスより、マイクロサテライトを抽出する準備を進めている。実際には、ドラフトシーケンスが今春に発表された後、塩基配列解析プログラムを用いてマイクロサテライトの塩基配列を効率良く抽出するための方法の開発を行っている。

D. 考察

ベーチェット病患者は HLA-B51 対立遺伝子をヘテロで持つ者が多いため、精度の高い塩基配列の決定を行うためには、PCR 産物のクローニングを行い HLA-B51 対立遺伝子を有するゲノム断片を分離することが必要であった。今後は検体数を増やしていくとともに、シーケンスデータの詳細な解析が必要である。

また、これまでに HLA-B 遺伝子近傍領域で行ったマイクロサテライト解析と SNP 解析をゲノムワイドに広げるために、全染色体上に解析に有

用な 3 万個のマイクロサテライトを収集する準備を進めている。

E. 結論

ベーチェット病患者の HLA-B 遺伝子全長の塩基配列決定法を確立した。また、全染色体上におけるマイクロサテライト多型の収集の準備を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yabuki K, Ota M, Goto K, Kimura M, Nomura E, Ohno S, Mizuki N, Katsuyama Y, Makysymowych WP, Bahram S, Kimura M, Inoko H: Triplet repeat polymorphism in the MICA gene in HLA-B27 positive and negative Caucasian patients with ankylosing spondylitis. *Hum. Immunol.* 60 : 83- 86, 1999.
2. Ando A, Kikuti YY, Abe K, Shigenari A, Kawata H, Ikemura T, Kimura M, Inoko H : cDNA cloning, Northern hybridization and mapping of a putative GDS (guanine nucleotide dissociation stimulator of G proteins)-related protein gene at the centromeric ends of the human and mouse MHC regions. *Immunogenetics* 49 : 354-356, 1999.
3. Ozawa A, Iwashita K, Miyahara M, Sugai J, Iimuka M, Kawakubo Y, Ohkido M, Naruse T, Anzai T, Takashige N, Ando A, Inoko H : HLA-A33 and -B44 and susceptibility to postherpetic neuralgia (PHN). *Tissue Antigens* 53 : 263-268,

厚生省特定疾患対策研究事業
ベーチェット病に関する調査研究班
分担研究報告書

- 1999.
4. Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Inoko H : Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. *Immunological Reviews* 167 : 193-199, 1999.
5. Yamazaki M, Tateno Y, Inoko H : Genome organization around the centromeric end of the HLA class I region ; large-scale sequencing analysis. *J. Mol. Evol.* 48 : 317-327, 1999.
6. Shiina T, Oka A, Imanishi T, Hanzawa K, Gojobori T, Watanabe S, Inoko H : Multiple class I loci expressed by the quail Mhc. *Immunogenetics* 49 : 456-460, 1999.
7. Shiina T, Shimizu C, Oka A, Teraoka Y, Imanishi T, Gojobori T, Hanzawa K, Watanabe S, Inoko H : Gene organization of the quail major histocompatibility complex (MhcCoja) class I gene region. *Immunogenetics* 49: 384-394, 1999.
8. Naruse KN, Kawata H, Anzai T, Takashige N, Kagiya M, Nose Y, Nabeya N, Isshiki G, Tatsumi N, Inoko H : Limited polymorphism in the HLA-DOA gene. *Tissue Antigens* 53: 359-365, 1999.
9. Ota M, Mizuki N, Katsuyama Y, Tamiya G, Shiina T, Oka A, Ando H, Kimura M, Goto K, Yabuki K, Ohno S, Inoko H : The critical region for Behcet's disease in the human major histocompatibility complex is reduced to a 46 kb segment centromeric of HLA-B, by association analysis using refined microsattelite mapping. *Am J Hum Genet* 64 : 1406-1410, 1999.
10. Kaneko M, Kudo T, Iwasaki H, Ikehara Y, Nishihara S, Nakagawa S, Sasaki K, Shiina T, Inoko H, Saitou N, Narimatsu H : $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX. *FEBS letters* 452, 237-242, 1999.
11. Wallace GR, Verity DH, Delamaine LJ, Ohno S, Inoko H, Ota O, Mizuki N, Yabuki K, Stephens HA, Kondiatis E, Madanat W, Kanawati CA, Stanford MR, Vaughan RW : Association of MICA alleles with Behcet's disease. *Immunogenetics* 49 : 613-617, 1999.
12. Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Kashiwase K, Moriyama S, Tsuchiya N, Ando H, Shiina T, Geraghty DE, Inoko H, Juji T : Polymorphism of MICA in Japanese and a MICA-MICB null haplotype. *Immunogenetics* 49 : 620-628, 1999.
13. Moribe T, Kaneshige T, Inoko H : Rapid HLA class I DNA typing using microtiter plate-reverse hybridization assay (MRHA) by simple thermoregulation : High resolution subtyping of HLA-A2 and -B40 alleles. *Hum Immunol* 60 : 539-549, 1999.
14. Adra K, MAo XO, Kawada H, Gao PS, Korzycka B, Shaldon SR, Coull P, Dubowitz M, Enomoto T, Ozawa A, Donato JL, Syed A, Horiuchi T, Khan R, Lin SR, Roberts MH, Flinter F, Beales P, Hagihara A, Inoko H, Shirakawa T, Hopkins M : Chromosome 11q13 and atopic asthma. *Clinical Genetics* 55 : 431-437, 1999.
15. Anzai T, Naruse TN, Tokunga K, Honma T,

厚生省特定疾患対策研究事業
ベーチェット病に関する調査研究班
分担研究報告書

- Baba H, Akazawa T, H. Inoko : HLA genotyping of 5,000 and 6,000-year old ancient bones in Japan. *Tissue Antigens* 54 : 53-58, 1999.
16. Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S, Aotsuka S, Ono Y, Inoko H, Takekoshi M : Bacterial expression of a human recombinant monoclonal antibody Fab fragment against hepatitis B surface antigen. *J Medical Virology* 58 : 338-345, 1999.
17. Kulski, JK, Gaudieri S, Inoko H, Dawkins RL : Comparison between two HERV-rich regions within the major histocompatibility complex. *J. Mol. Evolution* 48 : 675-683, 1999.
18. Baba T, Ando A, Inoko H : Isolation and characterization of the swine MHC SLA-DNA cDNA clones. *Immunogenetics* 49 : 915-917, 1999.
19. Katsuyama Y, Ota M, Ando H, Saito S, Mizuki N, Kera J, Bahram S, Nose Y, Inoko H : Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons 2, 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* 54 : 178-184, 1999.
20. Takashige N, Naruse T, Inoko H : Genetic polymorphisms at the tumor necrosis factor loci (TNFA and TNFB) in cardiac sarcoidosis. *Tissue Antigens* 54 : 191-193, 1999.
21. Yabuki K, Ohno S, Mizuki N, Ando H, Tabbara KF, Goto K, Nomura E, Nakamura S, Ito N, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H : HLA class I and II typing of the patients with Behcet's disease in Saudi Arabia. *Tissue Antigens* 54 : 273-277, 1999.
22. Tamiya G, Shiina T, Oka A, Ota M, Kastuyama Y, Tomizawa M, Yoshitome M, Ohtsuka M, Kimura M, Inoko H : New microsatellite markers in the human MHC class I region. *Tissue Antigens* 54 : 221-228, 1999.
23. Yabuki K, Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Palimeris G, Stavropoulos C, Koumantaki Y, Spyropoulou M, Giziaki E, Kaklamani V, Kakalamani E, Inoko H, Ohno S. Association of MICA gene and HLAB*5101 with Behcet's disease in Greek. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 : 1921-1926, 1999.
24. Mizuki N, Ohno S, Ando H, Chen L, Sato T, Imanishi T, Gojobori T, Ishihara M, Mizuki N, Geng Z, Geng L, Li G, Inoko H : Association analysis between the MICA and HLA-B alleles in Japanese patients with Behcet's disease. *Arthritis & Rheumatism* 42 : 1961-1966, 1999.
25. Miyagawa S, Amagai M, Niizeki H, Yamashina Y, Kaneshige T, Nishikawa T, Shirai T, Inoko H : HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. *Tissue Antigens* 54 : 333-340, 1999.
26. Nakanishi K, Kobayashi T, Murase T, Naruse T, Nose Y, Inoko H : Human Leukocyte Antigen-A24 and -DQA1*0301 in Japanese insulin-dependent diabetes mellitus : Independent contributions to susceptibility to the disease and additive contributions to acceleration of β -cell destruction. *J Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 : 3721-3725, 1999.
27. The MHC sequencing consortium (Aguado B,

厚生省特定疾患対策研究事業
ベーチェット病に関する調査研究班
分担研究報告書

- Bahram S, Beck S, Campbell RD, Forbes S, Geraghty D, Guillaudeux T, Hood L, Horton R, Inoko H, Janer M, Jasoni C, Madan A, Milne S, Neville M, Oka A, Qin S, Ribas-Despuig G, Rogers J, Rowen L, Shiina T, Spies T, Tamiya G, Tashiro H, Trowsdale J, Vu Q, Williams L, Yamazaki M. Complete structure and gene map of a human major histocompatibility complex (MHC). *Nature* 401 : 921-923, 1999.
28. Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E, Iwata K, Tomizawa M, Okuaki N, Kuwano Y, Watanabe K, Fukuzumi Y, Itakura S, Sugawara C, Ono A, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Soeda E, Kimura M, Bahram S, Inoko H : Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequencing analysis of the 1,796,938 bp HLA class I region. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 13282-13287, 1999.
29. Oka A, Tamiya G, Ota M, Kastuyama Y, Shiina T, Tomizawa M, Yoshitome M, Sugai J, Ozawa A, Ohkido M, Kimura M, Bahram S, Inoko H : Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptible locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric of the HLA-C gene. *Hum. Mol. Genetics* 8 : 2165-2170, 1999.
30. Kaneko M, Kudo T, Iwasaki H, Shiina T, Inoko H, Kozaki T, Saitou N, Narimatsu H : Assignment of the human α 1,3-fucosyltransferase IX gene (FUT9) to chromosome band 6q16 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 86 : 329-330, 1999.
31. Kera J, Mizuku N, Ota M, Kastuyama P, Pivetti-Pezzi P, Ohno S, Inoko H : Significant associations of HLA-B*5101 and B*5108 and lack of association of class II alleles with Behcet's disease in Italian patients. *Tissue Antigens* 54 : 565-571, 1999.
32. Ohtsuka M, Makino S, Yoda K, Wada H, Naruse K, Mitani H, Shima A, Ozato K, Kimura M, Inoko H : Construction of a linkage map of the medaka (*Oryzias latipes*) and mapping of the Da mutant defective in dorsal-ventral patterning. *Genomic Research* 9 : 1277-1287, 1999.
33. Shiina T, Kikkawa E, Iwasaki H, Kaneko M, Narimatsu H, Sasaki K, Bahram S, Inoko H : The beta 1,3-galactosyltransferase-4 (B3GALT4) gene is located in the centromeric segment of the human MHC class II region. *Immunogenetics* 51 : 75-78, 2000.
34. Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao XQ, Roberts MH, Miyamoto Y, Yoshimura M, Saitoh H, Yasue H, Nakao K, Adra CN, Kun JF, Morooka S, Inoko H, Ho LP, Shirakawa T, Hopkin JM : Variants of NOS1, NOS2 and NOS3 genes in Asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun* 267 : 761-763, 2000.
35. Teraoka Y, Naruse T, Oka A, Matsuzawa Y, Shiina T, Iizuka M, Iwashita K, Ozawa A, Inoko H : Genetic polymorphisms in the cell growth regulated gene, SCI telomeric of the HLA-C gene and lack of association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* in press.

分担研究報告書

日本人、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人ベーチェット病患者におけるHLA-B51抗原サブタイピングに関する研究

分担研究者	水木信久	国際親善総合病院眼科
	太田正穂	信州大学医学部法医
	勝山善彦	信州大学医学部法医
	安藤等	東海大学医学部分子生命科学
	猪子英俊	東海大学医学部分子生命科学
	矢吹和朗	横浜市大医学部眼科
	中村聡	横浜市大医学部眼科
	大野重昭	横浜市大医学部眼科

研究要旨 近年、ベーチェット病発症にHLA-B51分子が直接関与する可能性が示唆されている。HLA-B51分子をコードする対立遺伝子（アリル）は、現在、HLA-B*5101～B*5109が同定されているため、96人の日本人患者、55人のギリシャ人患者、21人のイタリア人患者、13人のサウジアラビア人患者を対象として、HLA-B51サブタイピングをPCR-SBT法にて行った。その結果、日本人ではHLA-B51陽性患者57人中56人が、HLA-B*5101アリルであり、残りの1人はHLA-B*5102アリルであった。ギリシャ人ではHLA-B51陽性患者43人中33人(76.7%)がHLA-B*5101アリルで、13人(30.2%)がHLA-B*5108アリルであった。イタリア人ではHLA-B51陽性患者15人中11人(73.3%)がHLA-B*5101アリルで、4人(26.7%)がHLA-B*5108アリルであった。サウジアラビア人ではHLA-B51陽性患者10人中9人(90.0%)がHLA-B*5101アリルで、1人(10.0%)がHLA-B*5108アリルであった。HLA-B51陽性群におけるこれらのサブタイプ頻度は、患者群、対照群間で有意差はなかった。これらの結果は、各民族におけるHLA-B51サブタイプの分布の相違によるものであり、本病はグローバルにHLA-B*51と相関していると考えられた。

患感受性遺伝子はHLA-B51抗原遺伝子である可能性が高いことを示唆してきた。現在、HLA-B51分子をコードする対立遺伝子（アリル）は、アミノ酸レベルではHLA-B*5101～B*5109の9個が同定されてきている。したがって、本研究は、日本人、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人の本病患者群を対象としてHLA-B51サブタイピングを行い、本病と相関するアリルを検索することを目的とした。

A. 研究目的

昨年度までに我々は、HLAクラスI遺伝子領域に存在する多数のマイクロサテライトおよびMICA遺伝子の多型性解析、連鎖解析を行い、本病の原因遺伝子はHLA-B遺伝子であり、主要な疾