

- 20 Ikewaki N, Tamaguchi H, Yamada A, Sawada A, Yamamoto R, Inoko H : A microfilament formation inhibitor, cytochalasin strongly enhances the low affinity Fcε receptor II (CD23) expression on the human monocyte-like cell line, U937. *J Clinical Immunol*.in press
- 21 Yabuki K, Mizuki N, Ota M, Verity D, Goto K, Kimura T, Nomura E, Madanat W, Katsuyama Y, Kimura M, Stanford M, Inoko H, Ohno S : A strong association between MICA gene and Behcet's disease in Jordanin. *J. Ophthalmology* in press
- 22 Mizuki N, Ohono S, Inoko H : Behcet diseases . *Investigative Ophthalmology & Visual Science* in press
- 23 Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Tsuchiya K, Kondo M, Naruse T, Mizuki N, Sasazuki T, Inoko H : A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70 kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. *Genomics* in press
- 24 Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T: Association between CabA+ Helicobacter pylori infection and p53, BAX and TGFβ-RII gene mutations in gastric cancer patients. *International J Cancer* in press
- 25 Mizuki N, Inoko H : Microsatellite mapping of a susceptible locus within the HLA region for Behcet's disease using Jordanian patients. *Hum Immunol* in press.
- 26 Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Mizuki N, Seki S, Honma T, Inoko H, Asakura H: A close relationship of triplet polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* in press
- 27 Holland LZ, Rached LA, Tamme R, Holland LD, Inoko H, Shiina S, Burgdorf C, Lardelli M : Characterization and developmental expression of the amphioxus homolog of *Notch* (*AmphiNotch*): evolutionary conservation of multiple expression domains in amphioxus and vertebrates . *Developmental Biology* in press

ベーチェット病関連遺伝子導入マウスの作成・解析

分担研究者 木村 稷 (東海大学分子生命科学2)
佐藤正宏 (東海大学総合医学研究所)
渡辺敏輝 (東海大学総合医学研究所)
長嶋綾子 (東海大学総合医学研究所)
末水洋志 (東海大学分子生命科学2)
野村英一 (横浜市立大学医学部眼科)
木村孝博 (横浜市立大学医学部眼科)
矢吹和朗 (横浜市立大学医学部眼科)
大野重昭 (北海道大学大学院視覚器病分野)

研究要旨

[目的] ベーチェット病の責任遺伝子の候補の MICA、MICB、HLA-B 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、発症機構の解明を目的とした。

[方法] ヒト MICA、MICB cDNA を強力に全身の細胞での発現を促すプロモーター系の下流に連結させた mini 遺伝子 CAG-MICA、CAG-MICB を作成し顕微受精し Tg を作製した。HLA-B51 Tg とヒト $\beta 2$ ミクログロブリン Tg の交配により両遺伝子を持つ Tg を作成した。また HLA-B51 抗原の細胞表面での発現を増加させるためヒト h $\beta 2$ ミクログロブリントランスジェニックマウス、マウス $\beta 2$ ミクログロブリンノックアウトマウスを購入し交配を開始した。

[結果] MICA mRNA の発現を RT-PCR 法で認める系統を 3 系統得た。MICA Tg では貧血、末梢血中の IgG の増加、両眼性の脈絡膜萎縮、血管の白線化が 3 系統にみられた。この眼底所見は遺伝的背景に含まれる C3/C3H 系に見られる rd 遺伝子による変化と考えられた。また MICB Tg については、mRNA の発現を認める系統を少なくとも 1 系統確立している。MICB Tg では、生後 1-2 週の皮膚の角化がみられた。また体重減少や末梢血中の白血球数増加がみられた。

[考察] MICA は末梢血中の IgG を上昇させることから慢性炎症が引き起こされていると考えられる。MICB も皮膚の角化を引き起こし何らかの炎症形成に関与していると考えられる。

A. 研究目的

ベーチェット病は従来より HLA-B51 抗原との相関が知られており、HLA-B51 遺伝子あるいはその近傍に位置するある特定の遺伝的背景のもとに本病が発症すると考えられる。MICA (MHC class I chain-related gene A) 遺伝子、MICB (MHC class I chain-related gene B) 遺伝子の存在位置を特定された (Bahram et al., 1996a; 1996b, Mizuki et al., 1997)。両者は、共通の祖先遺伝子から発したと考えられる。

MICA は、その mRNA サイズが約 1.4 kb で、43 kDa 分子をコードし、その中には膜貫通領域や $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 等の様々なドメインを有し、HLA クラス I 抗原とのアミノ酸の相同性は低い、タンパク質の三次元構造は HLA クラス I 抗原と酷似する。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)。また、膜貫通領域には

遺伝的多型を示す部位が存在し、MICA 遺伝子の特定のアレルがベーチェット病発症と密接な関係があるのではないかと推察されている (Mizuki et al., 1997)。一方、MICB は mRNA サイズが約 2.4 kb であるが、383 個のアミノ酸をコードし、MICA との相同性は高い (83%)。MICA mRNA と MICB mRNA の長さの違いは、MICB の 3' 非翻訳領域が MICA のそれよりも大きいことによる (Bahram, S. and Spies, T., 1996)。

我々は MICA あるいは MICB の過剰発現がベーチェット病発症に関係すると考え、transgenic (Tg) マウス作製手法を用い、マウス組織内に MICA あるいは MICB タンパク質を構成的に過剰発現させる系を考えた。我々は、ヒト MICA cDNA (1.3 kb) 及びヒト MICB cDNA (2.4 kb) を Dr. Bahram (Basel Institute

for Immunology, スイス) から入手し、これらを構成的に発現させるために cytomegalovirus enhancer/chicken-actin promoter 系 (CAG と称する) の下流 (Miyazaki et al.1989) に連結した遺伝子構築体を作製した。これら遺伝子構築体 (それぞれ、CAG-MICA 及び CAG-MICB と称する) をマウス受精卵に導入することにより、MICA Tg マウス及び MICB Tg マウスを作製し、これらマウスにおいて MICA 及び MICB 遺伝子が生体内でどのような機能を担うのかを探ることを目的とした。

また HLA-B51 自体が疾患感受性に関与すると仮定した場合の動物モデルの作成として、HLA-B51、ヒト β 2 ミクログロブリントランスジェニックマウス、マウス β 2 ミクログロブリンノックアウトマウスとの交配を開始した。これにより HLA-B51 とヒト β 2 ミクログロブリンが結合し、細胞表面への発現の増加が期待される。HLA-B27 で同様に交配した場合は、マウスにおいても細胞表面での発現の増加と関節炎等の形質変化が見られたことが報告されておりモデルマウス作成に有用な方法であると考えられる。(Sanjay D.Khara et al 1999)

B. 研究方法

ヒト MICA cDNA 及びヒト MICB cDNA を Dr. Bahram (Basel Institute for Immunology, スイス) から入手し、これらを構成的に発現する CAG promoter 系の下流に連結した遺伝子構築体 (CAG-MICA 及び CAG-MICB) を作製し (図 1)、これらをマウス受精卵への導入遺伝子として用いた。

マウス受精卵への遺伝子導入法は、定法である顕微注入法を用いた。得られたマウスが外来性遺伝子を有しているかどうかの判定は、尾 DNA の genomic Southern 法 (MICA Tg, MICB Tg) 及び PCR-Southern 法 (MICB Tg) で決定した。組織における外来性遺伝子の発現の有無は、RT-PCR 法、及び Northern 法にて

決定した。この解析から、発現の高いマウス系統を選別する。HLA-B51、ヒト β 2 ミクログロブリントランスジェニックマウス、マウス β 2 ミクログロブリンノックアウトマウスを導入し、これらの交配を開始した。これら系統の維持を図ると同時に、表現型の変化の観察 (特に体重の推移、血液内細胞成分の変化、皮膚の変化、外性器の変化、眼の変化及び炎症の発症等を中心に) を行った。パーチェット病の患者さんでも上昇の見られることがあり、慢性の炎症反応の指標となる末梢血中の IgG を調べるためゲル内免疫沈降法を行った。

眼底変化を詳細に観察するため、フルオロセインナトリウムによる蛍光眼底造影撮影を行った。フルオロセインナトリウムを 20μ l/匹を腹腔投与し、手持ち眼底カメラで経時的に撮影した。HLA-B51 Tg に関しても同様の眼底観察、蛍光眼底造影撮影をおこなった。また眼底の変化が炎症性のものなのかどうか確認するため生後約 1ヶ月にわたり Tg より摘出した眼球から組織を採取し、ヘマトキシリンエオジン染色して観察した。

実験のすべての過程において動物の扱いは東海大学の規定に基づき苦痛の軽減に努めた。

C. 研究結果

CAG-MICA 新生仔 F0 として合計 107 匹の離乳マウスを得た。そのうち 12 匹 (♂ 5 匹 ♀ 7 匹) は MICA cDNA 内に検出領域を設定した PCR 法で陽性と判定された。そのうち 4 匹については MICA cDNA をプローブとした genomic Southern 法を行い、3 匹が Tg と判定された。PCR 法で陽性となった F0 を C57/B6 と戻し交配し F1 を作製した。101 匹以上の F1 が産出された。MICA mRNA 発現群では非発現群に比べ統計的に有意に赤血球が減少していた。また末梢血中の IgG の量も増加していた。また両眼性の、視神経乳頭を中心とした網脈絡膜萎縮、萎縮部以外への

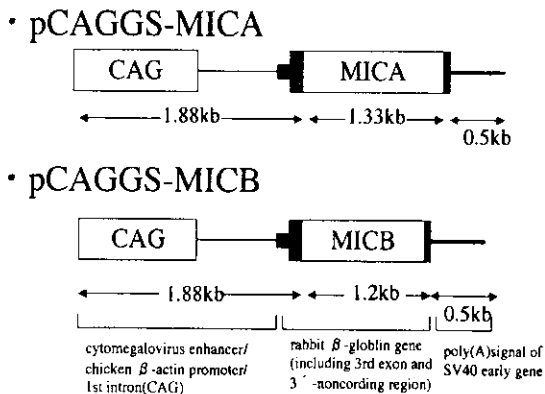


図 1. 導入遺伝子

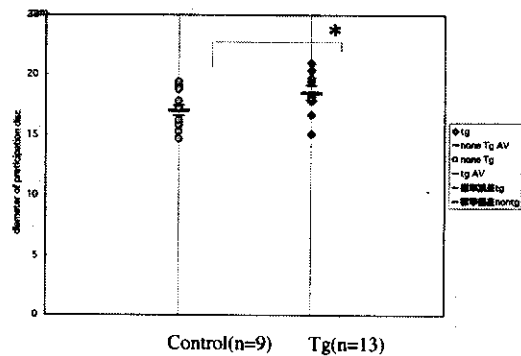


図 2. MICA Tg における末梢血中の IgG

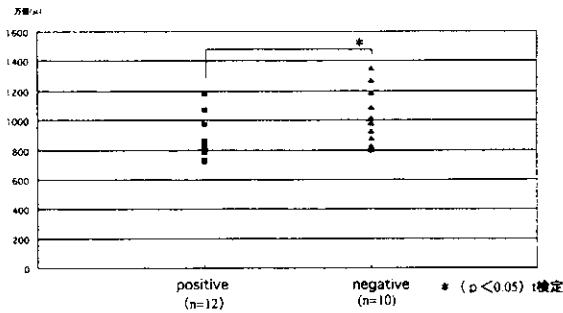


図 3.MICA の末梢赤血球の減少

色素沈着、網膜動脈、静脈の狭小化、口径不同、血管の白線化をとまなう3系統を見いだした。フルオロセインナトリウム蛍光眼底造影検査では、初期からの網膜色素上皮障害を示唆する脈絡膜過蛍光、網膜動脈、静脈の狭小化、口径不同があった。しかし血管からの蛍光色素の漏出は見られず炎症所見は見られなかった。

また生後3日、10日、20日、30日のTgで眼球を摘出へマトキシリンエオジン染色したが、網膜、ぶどう膜、強膜、硝子体内、隅角などに炎症細胞の浸潤はどの時期にも認めなかった。C57BL/6N(2M令4匹、4M令9匹、19M令1匹)、B6C3F1(2.5M令5匹)、B6C3F1×B6C3F1(7M令8匹)では眼底変化を認めなかった。しかしC3/C3H系では購入したすべてのものにみられ、この眼底変化はC3系に含まれるrd遺伝子による変化と考えられた。

CAG-MICB新生仔F0として、合計58匹の離乳マウスを得た。この内、27匹のマウスはTgであった。27匹のTgマウスの内、12匹は、ヒトMICB mRNAを発現することがマウス尾より抽出したRNAを用いたRT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 解析から判明した。Northern解析では皮膚、腎臓などで強く発現がみられた。ヒトMICB mRNA

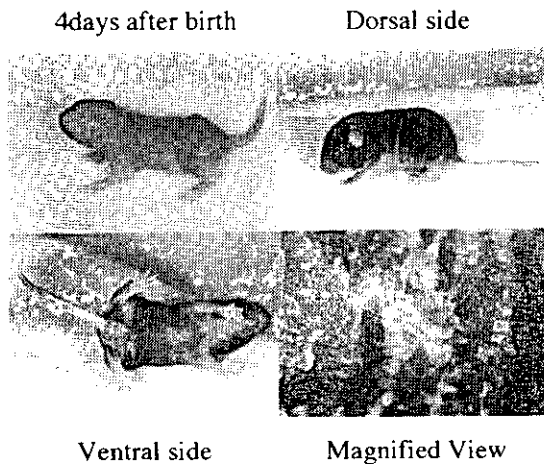


図 4.MICB Tgに見られた皮膚角化

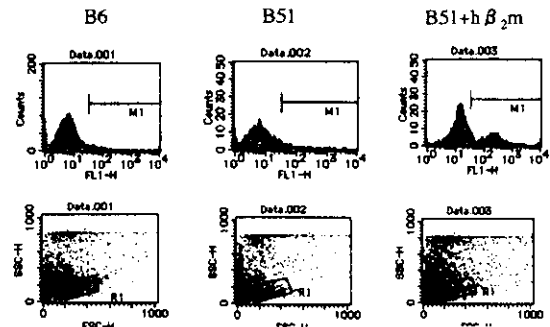


図 5.HLA-B51 Tg と hβ2m Tg を交配した場合の末梢血リンパ球の細胞表面のclass1 抗原の発現の解析(FACSscan)

発現群(1系統)では、非発現群(non-Tgを含む)に比べ、有意にその体重の減少、及び白血球の増加が認められた。また生後1-2週の間で皮膚の角化異常が認められた。病理学的には角質層の肥厚、表皮層の肥厚であった。部位によっては真皮内の軽度の炎症細胞浸潤も認められた。またこの表現系はF1、F2へと伝達された。

HLA-B51 遺伝子のTgでは生後3週目には検眼鏡的に網膜の黄白色点状変化が一面に見られた。生後5-6週目には網脈絡膜萎縮と色素沈着、血管の狭小化が認められるようになった。フルオロセイン蛍光眼底造影所見としては初期からの網膜色素上皮障害を示唆する脈絡膜過蛍光、網膜動脈、静脈の狭小化、口径不同があった生後5-6週目の眼球の病理学的所見としては網膜色素上皮の不整、網膜視細胞層の消失、網膜外顆粒層の消失があった。これも背景のC3/C3H系のrd遺伝子の影響によるものと考えられた。

HLA-B51、ヒトhβ2ミクログロブリントランスジェニックマウスを交配しその末梢血リンパ球分画のヒトclass1抗原をFACSscanを用いて検討したところ、HLA-B51単独の場合に比べて細胞表面での発現が増加していることが確認された。

D. 考察

MICAの過剰発現はマウスに赤血球減少、IgG増加を引き起こした。何らかの慢性的な炎症反応が起こっていると考えられる。MICA Tgで見られた網脈絡膜萎縮はベーチェット病の末期像に似ていた。しかし蛍光眼底造影では網膜血管からの蛍光色素の漏出は見られず炎症所見は見られなかった。また生後3日、10日、20日、30日のTgで眼球を摘出し、ヘマトキシリンエオジン染色したが、網膜、ぶどう膜、強膜、硝子体内、隅角などに炎症細胞の浸潤はどの時期にも認めなかった。また前眼部の炎症は経過中一度も認めなかった。このことからこの変化はC3/

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策事業)
分担研究報告書

C3系のマウスに見られる rd 遺伝子による網膜色素変性症様の変化であると考えられた。

しかし網膜色素変性症様のこの変化は Tg 群で明らかに増加しており、MICA 遺伝子が網膜に関して何らかの脆弱性を与えている可能性も否定はできない。また、末梢血中の赤血球の減少は慢性の炎症による変化の可能性もある。腸管病変による下血による貧血を反映している確かめるため餌より鉄分を除くため白米を1週間投与したあと便潜血の検査を行ったが差を認めなかった。

今回の結果より MICB の過剰発現はマウスに低体重、白血球増多、角化異常といった表現系の変化を引き起こす可能性が示唆された。今のところ低体重、白血球増多は3系統で見られているため、外来遺伝子導入に伴う宿主遺伝子への影響によって引き起こされたとは考えにくく、MICB の過剰発現によるものと考えられる。特に MICB 発現 Tg マウスに見られる白血球数の顕著な増加は注目すべき点と思われる。

ベーチェット病の最も特徴的な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。来年度これらの解析を予定している。

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。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。角化亢進という点では乾癬、生後一定期間現れ後に消失するという経過からは魚鱗癬などのモデル動物として検討する価値があると考えられる。

HLA-B51 遺伝子 Tg では網脈絡膜萎縮がみられた。生後4日の仔の眼瞼を切開し前眼部を観察したところ炎症所見は認められなかった。生後3週目には検眼鏡的に網膜の黄白色点状変化が一面に見られた。生後1ヶ月に摘出眼球の病理組織でも炎症像は認められなかった。

HLA-B51、ヒト h β 2 ミクログロブリントランスジェニックマウスを交配しその末梢血リンパ球分画のヒト class I 抗原を FACS 分析を用いて検討したところ、HLA-B51 単独の場合に比べて細胞表面での発現が増加していることが確認された。これは細胞表面に HLA 抗原を安定して発現させるにはヒト型の β 2 ミクログロブリンの導入が有用であることを示している。当教室ではすでに HLA-B51、ヒト h β 2 ミクログロブリントランスジェニックマウス、マウス β 2 ミクログロブリンノックアウトマウスの交配を開始しており、マウス β 2 ミクログロブリンを除くことで、さらなる細胞表面への発現強化により形質変化の可能性が期待される。

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% と極めて低いが、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、 β 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この予測もある。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 遺伝子とも考えられている。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 遺伝子の機能を確かめたい。またリンパ球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。貧血、IgG 増加、白血球増加、皮膚角化といった今回見られた形質変化にどのようにして MICA, MICB が関係するのか免疫学的に検討したいと考えている。

MICA 及び MICB の機能は明らかでないが、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、その実態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ベーチェット病発症との因果関係が明らかにされると期待される。

E. 結論

MICA Tg では貧血、末梢血中の IgG の増加、MICB Tg では白血球増加、体重減少、皮膚角化などの形質変化が見られた。これらは慢性の炎症を反映していると考えられた。HLA-B51 抗原のトランスジェニックマウスでの発現はヒト $\beta 2$ ミクログロブリンを同時に導入することで細胞表面への発現を高めることができることが明らかとなった。これはモデル動物作成のための有用な方法である。

<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.
- 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.

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

Mizuki N., Ando H., Kimura M., Ohno S., MiytaShoji., 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

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.

Sanjay D. Khara, Sonwoo Lee, Michael J. Bull, Julie Hanson, Harvinder S. Luthra, Gunther J. Hammerling, and Chella S. David. Peptide binding $\alpha 1 \alpha 2$ domain of HLA-B27 contributes to the disease pathogenesis in transgenic mice. *Human Immunology* 60, 116-126 (1999)

Stephanie A. Hagstrom, Mabel Duyano, Michael A North, and tiansen Li (1999) Retinal Degeneration in tulp1^{-/-} mice: Accumulation in the interphotoreceptor Matrix. *IOVS* 40, 2795-2802

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.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

2. 学会発表

- ・乾癬モデル動物の作成の可能性. 木村 穰. 日本乾癬学会. 2000年9月. 福島
- ・HLA-transgenic mice. MInoru kimura. *Immunology of Bechet's disease*. October 12-13, 2000. Tubingen

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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

分担研究者	小野江和則	（北海道大学遺伝子病制御研究所長）
研究協力者	岩渕 和也	（北海道大学遺伝子病制御研究所）
	北市 伸義	（北海道大学大学院医学研究科）
	小竹 聡	（北海道大学大学院医学研究科）
	大野 重昭	（北海道大学大学院医学研究科）

研究要旨 昨年度までに、H-2A^kマウスに実験的自己免疫ブドウ膜炎（EAU）を誘導する IRBP 由来ペプチド抗原（K2）を同定し、K2 を用い、EAU を抑制する新治療法を開発した。今年度は K2 誘導 EAU における、NK、NK-T 細胞の役割に焦点を当て、研究を進めた。また、NK-T 細胞の補体感受性についても解析を加えた。

A. 研究目的

ベーチェット病は、全身病変と臓器特異的自己免疫疾患の病態を示す。我々はベーチェット病のモデル動物として供するため、interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) 由来ペプチド抗原によるEAUをマウスとラットの系で誘導することに成功した。今回、マウスモデル系を用い、EAU発症に関わるNK、NK-T細胞の役割を解明することを目的とした。

B. 研究方法

B10.BR マウスを IRBP 由来ペプチド抗原 (K2) で免疫してEAUを誘導する系を用いた。6週齢の B10.BR マウスにEAU惹起ペプチド (K2) 50nmol または IRBP 100 μ g を完全フロイドアジュバント(CFA)と共に免疫、さらに百日咳菌懸濁液を ip した。散瞳後検眼鏡を用いて臨床的重症度を観察した。免疫後20日目に

眼球摘出、組織学的重症度を判定した。抗体投与は、B10.BR にEAUを誘導する前に、抗NK1.1抗体 (PK136) (500mg/100 μ l) を iv 投与し、リンパ組織のNK1.1⁺細胞数をフローサイトメトリーにて解析した。また、投与マウスにおけるEAUを観察し、NK1.1⁺細胞のEAUに対する役割を解析した。コントロールとして、無関係のIgG (500mg/100 μ l)、またはPBS (100 μ g) を iv した。11日目に所属リンパ節によりT細胞を回収し、抗原特異的T細胞増殖反応を行った。

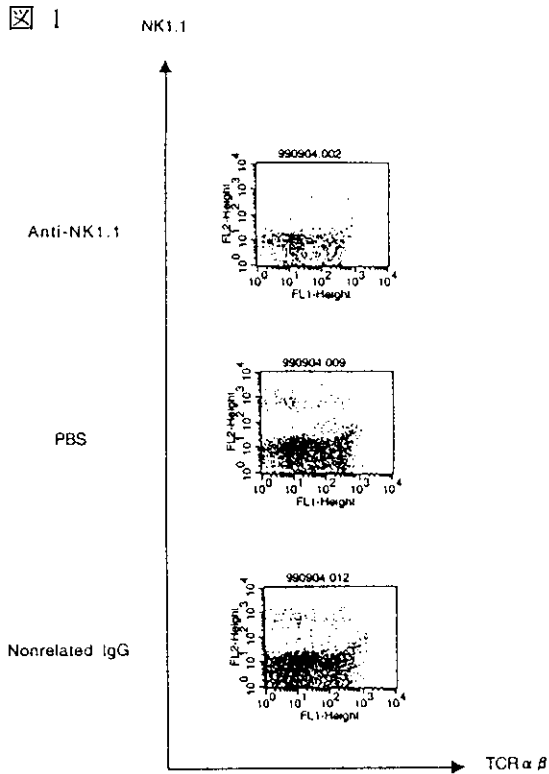
また、マウス胸腺、脾細胞をウサギ補体で処理後、フローサイトメトリーにて、リンパ球亜群の減少率を比較した。

上記の動物実験は、本研究所動物実験委員会において、「本研究所動物実験に関する指針」に沿った研究内容であることを審査され、認可を受けた。

C. 研究成果

1. 抗NK1.1抗体投与によるリンパ球亜群の変化

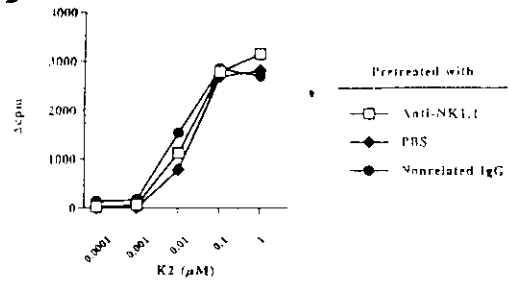
PK136 iv 投与後、経時的に末梢血のリンパ球亜群を解析した。その結果、投与3週まで、NK1.1⁺細胞の有意な減少が認められた(図1)。



2. 抗NK1.1抗体投与マウスにおけるT細胞反応

PK136投与マウスを、K2とCFAで免疫した。10日後に、所属リンパ節細胞のK2に対する増殖反応を解析した。PK136投与群とコントロールIg投与群間で、K2に対する増殖反応に差は認められなかった(図2)。

図 2



3. 抗NK1.1抗体投与のEAU臨床的重症度に対する影響

K2とCFAで免疫後、EAUの臨床的重症度を経時的に観察した。PK136投与マウスでは、コントロールの無関係IgG、またはPBS投与群と比べ、EAUの重症度が低下しており、17、19日目においては有意な軽症化が認められた(図3)。表1に各群における臨床的最高重症度の比較をまとめたが、PK136抗体投与群では、有意にEAUの重症度が低下していた。

図 3

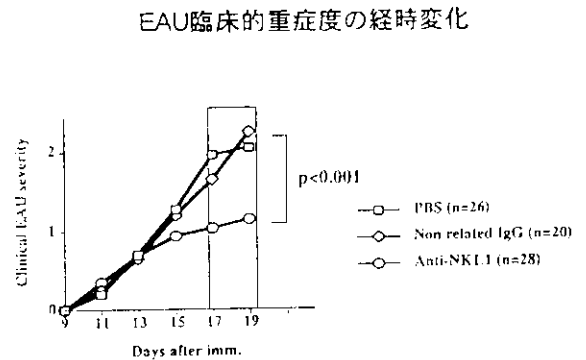


表 1

臨床的最高重症度	
無関係なIgG	2.35 (SD=0.59);
PBS	2.19 (0.57)
抗NK1.1抗体	1.39 (1.03)*

*p<0.05
(Kruskal-Wallis test)

4. 抗NK1.1抗体投与のEAU組織変化に対する影響

次に、K2またはIRBPで免疫20日後に眼球を摘出し、組織学的重症度を比較した。IRBPとCFAで免疫したマウスではK2のものと同様、EAUの重症度は高度であった(表2)。しかし、IRBP、K2免疫いずれのマウスにおいても、PK136投与マウスではEAUの重症度が有意に低下していた。

表2 組織学的重症度

	IRBP	K2
無関係なIgG	3.2 (SD=0.4)	1.08 (1.04)
PBS	2.1 (1.3)	1.04 (0.90)
抗NK1.1抗体	0.9 (0.8)*	0.88 (0.94)
	*p<0.01	p>0.05
	(Kruskal-Wallis test)	

5. NK-T細胞の補体感受性

B6、B10.D2マウスの脾、胸腺細胞をウサギ補体と処理前、処理後に、NK-T細胞の割合、実数を算出し、比較した。図4にB10.D2の例を示すが、NK-T細胞の分画のみ著明に減少した。減少はCD4⁺NK-T、CD4⁺8NK-Tいずれにも認められた(データ示さず)。一方、NK、T、B細胞の減少は見られなかった。従って、NK-T細胞は、ウサギ補体に対して特異的に感受性を示すことが判明した。

次に、T、NK-T細胞は存在するが、B細胞、抗体の存在しないD10.10/RAG^{-/-}/D2マウスで同様の解析を行ったが、NK-T補体感受性亢進は認められなかった(図5)。以上の結果より、NK-T細胞には生体内で何らかの自己抗体が結合していることが示唆された。

図4

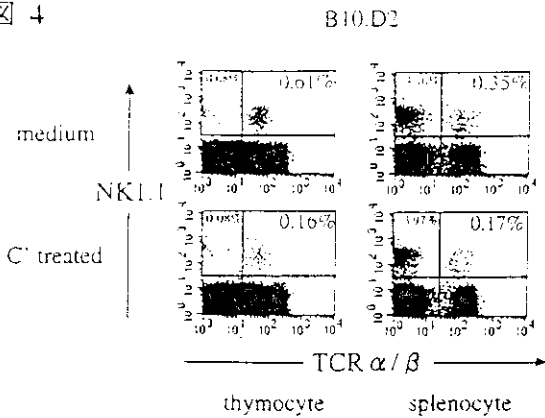
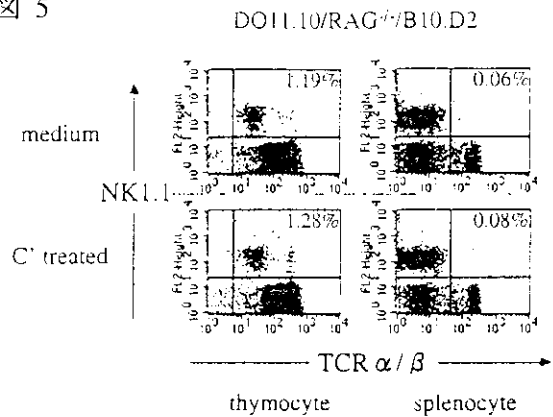


図5



D. 考察

近年、T細胞マーカー(TCR)とNKマーカー(NK1.1)を発現する新規のリンパ球亜群、NK-T細胞が注目を集めている。本研究では、NK-T細胞とNK細胞がEAUでどのような役割を果たすかを解析するため、抗NK1.1抗体投与によってNK、NK-T細胞を除去したマウスにEAUを誘導した。抗NK1.1抗体処理は、K2ペプチドに対するT細胞反応には、影響を与えなかったが、EAUの重症度を低下させた。従って、NK、NK-T細胞は、EAUの効果相において、発症を増強するものと考えられた。

この結果は、NK-T細胞が自己免疫反応を負に制御するという、これまでの報告と異なっていた。ただ、今回の処理によって、NK、NK-T細胞亜群両者が消失するため、NK-T細胞のみ、

または NK 細胞のみを選択的に除去するシステムで同様の実験をする必要があると思われた。現在、NK-T 欠損系(J α 281-/-)マウスや、抗 asialo GMI 抗体投与マウスで検討中である。

又、今回、NK-T 細胞が選択的にウサギ補体に感受性を示すことを世界で初めて明らかにした。この補体感受性は、抗体の存在しないマウスでは認められないことから、何らかの自己抗体が関与していることが示唆された。実際、最近自己免疫患者で、抗 CTLA-4 抗体が報告されている。また、ベーチェット病等の自己免疫患者や、自己免疫モデル動物において、加齢に伴う NK-T 細胞の減少が報告されている。今回発見した現象との関わりは、興味深い今後の課題と考えられた。

E. 結論

EAU モデル動物では、NK、NK-T 細胞、あるいはそのいずれかが、炎症効果相で病態を悪化させることが判明した。また、NK-T 細胞には生体内で自己抗体が結合しており、そのため *in vitro* で補体感受性が亢進していると考えられた。

F. 健康危険情報

本研究を行うにあたって、動物実験等で特に危険な状況は発生しなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitaichi, N., Matsuda, A., Kotake, S., Namba, K., Tagawa, Y., Sasamoto, Y., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Onoé, K., Matsuda, H., and Nishihira, J.: Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis with anti-macrophage migration inhibitory factor

antibodies. *Curr. Eye Res.* 20, 109-114, 2000.

- 2) Ito, D., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Inuyama, Y., and Onoé, K.: Induction of CTL responses by simultaneous administration of liposomal peptide vaccine with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb. *J. Immunol.* 164, 1230-1235, 2000.
- 3) Ito, D., Ogasawara, K., Matsushima, K., Morohashi, T., Namba, K., Matsuki, N., Kitaichi, N., Inuyama, Y., Hosokawa, M., Nakayama, E., Iwabuchi, K., and Onoé, K.: Effective priming of cytotoxic T lymphocyte precursors by subcutaneous administration of peptide antigens in liposomes accompanied with anti-CD40 and anti-CTLA-4 antibodies. *Immunobiology.* 201, 527-540, 2000.
- 4) Kizaki, T., Ookawara, T., Iwabuchi, K., Onoé, K., Day, N. K., Good, R. A., Maruyama, N., Ohira, Y., and Ohno, H.: Age-associated increase of basal corticoid levels decreases ED2^{high}, NF- κ B^{high} activated macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 68, 21-30, 2000.
- 5) Izutsu, Y., Tochinai S., and Onoé, K.: Loss of reactivity to pan-cadherin antibody in epidermal cells as a marker for metamorphic alteration of *Xenopus* skin. *Dev. Growth. Diff.* 42(4), 377-383, 2000.
- 6) Izutsu, Y., Tochinai, S., Iwabuchi, K., and Onoé, K.: Larval antigen molecules recognized by adult immune cells of inbred *Xenopus laevis*: Two pathways for recognition by adult splenic T cells. *Dev. Biol.* 221, 365-374, 2000.
- 7) Tone, S., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Negishi, I., and Onoé, K.: Induction of

- NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺ T cells by bypassing TCR signals in ZAP-70 deficient mice. *Immunology Letters*, 73, 65-69, 2000.
- 8) Morohashi, T., Ogasawara, K., Kitaichi, N., Iwabuchi, K., and Onoé, K.: Abrogation of negative selection by GVHR induced by minor histocompatibility antigens or H-2D antigen alone. *Immunobiology*, 202, 268-279, 2000.
 - 9) Kitaichi, N., Kotake, S., Mizue, Y., Matsuda, H., Onoé, K., and Nishihira, J.: Increase of macrophage migration inhibitory factor in sera of patients with iridocyclitis. *Br. J. Ophthalmol.* 84, 1423-1425, 2000.
 - 10) Namba, K., Ogasawara, K., Kitaichi, N., Morohashi, T., Sasamoto, Y., Kotake, S., Matsuda, H., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Ohno, S., and Onoé, K.: Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) by pretreatment with a pathogenic peptide in liposome and anti-CD40 ligand mAb. *J. Immunol.* 165, 2962-2969, 2000.
 - 11) Morohashi, T., Ogasawara, K., Kitaichi, N., Iwabuchi, K., and Onoé, K.: Significant MLR but not CTL responses against recipient antigens generated in T cells from bone marrow chimeras recovered from GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 26, 1069-1076, 2000.
 - 12) Kitaichi, N., Kotake, S., Mizue, Y., Sasamoto, Y., Goda, C., Onoé, K., Iwabuchi, K., and Nishihira, J.: Systemic high-dose corticosteroid administration induced high levels of serum macrophage migration inhibitory factor in patients with Vogt-Koyanagi-Harada's disease. *Microbiol. Immunol.* 44, 1075-1077, 2000.
 - 13) Konishi, J., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Ato, M., Nagata, J., Onoé, K., Nakagawa, K., Kasai, M., Ogasawara, K., Kawakami, K., and Onoé, K.: Thymic epithelial cells responsible for impaired generation of NK-T thymocytes in *lymphoplasia* mutant mice. *Cell. Immunol.* 206: 26-35, 2000
 - 14) Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Tone, S., Itoh, D., Tosa, N., Negishi, I., Ogasawara, K., Uede, T., and Onoé, K.: Defective development of NK1.1⁺ T cell antigen receptor (TCR) $\alpha\beta$ ⁺ cells in zeta-associated protein (ZAP) null mice with an accumulation of NK1.1⁺ CD3⁻ NK-like cells in the thymus. *Blood*, (in press)
 - 15) Ohwatari, R., Fukuda, S., Iwabuchi, K., Mizue, Y., Nakamaru, Y., Maguchi, S., Inuyama, T., Onoé, K., and Nishihira, J.: Serum level of macrophage migration inhibitory factor as a useful parameter of clinical course patients with Wegener's granulomatosis and relapsing polychondritis. *Annals of Otolaryngology & Laryngology*. (in press)
 - 16) Ishimori, N., Iwabuchi, K., Fujii, S., Watano, K., Iwabuchi, C., Ato, M., Chiba, H., Kitabatake, A., and Onoé, K.: Mixed allogeneic chimerism with wild-type strains ameliorated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Leukocyte Biol.*, (in press)
 - 17) Mishima, M., Hirano, M., Morohashi, T., Arase, H., Shisa, H., Hiai, H., Ato, M., and Onoé, K.: Tolerogen-producing cells in allogeneic bone marrow chimeras established

- with spontaneous leukemia-prone mice. J. Clin. Exp. Hemathopathol. (in press)
- 18) 小野江和則：移植免疫の基礎。「移植医療」.藤堂 省,浅香正博編,北海道医師会,札幌,57-61,2000.
 - 19) 小野江和則, 諸橋大樹：(解説)キラーT細胞活性化における骨髄由来抗原提示細胞の役割 (Cross-presentation).臨床免疫. 33, 384-388, 2000.
 - 20) 伊藤大祐,小野江和則：抗 CD40 及び抗 CTLA-4 モノクローナル抗体と抗腫瘍ペプチドワクチン同時投与による細胞傷害性 T細胞誘導.臨床免疫. 33, 566-572, 2000.
 - 21) 岩渕和也, 小野江和則：CD161 (NKR-P1A). 臨床免疫. 34 (別冊 19) ,249-254, 2000.
2. 学会発表
- 1) 梶野由里, 山口昭弘, 新家瑠奈, 清野邦義, 日野順子, 杏澤 武, 時野隆至, 佐藤昇志, 小野江和則, 菊地浩吉：子宮頸部、内膜細胞診、組織診とヒトパピロームウイルス (HPV) 型、K-ras との関係. 第 89 回日本病理学会総会, 2000. (於 大阪)
 - 2) 岩渕和也, 阿戸 学, 小野江和則：クラス II 拘束性 TCR トランスジェニックマウス (Tgm) を用いた NKT 細胞の胸腺内選択の研究. 第 89 回日本病理学会総会, 2000. (於 大阪)
 - 3) 阿戸 学, 岩渕和也, 小野江和則：ヒト単球走化活性化因子 (MCP-1) トランスジェニックマウスの脾臓周辺帯マクロファージにおける LPS 誘導性アポトーシスの亢進. 第 89 回日本病理学会総会, 2000. (於 大阪)
 - 4) 北市伸義, 小竹 聡, 笹本洋一, 松田 彰, 松田英彦, 西平 順, 小笠原一誠, 小野江和則：T細胞シグナル伝達系路におけるマクロファージ遊走阻止因子の影響と実験的免疫性網膜ぶどう膜炎の制御. 第 104 回日本眼科学会総会, 2000. (於 京都)
 - 5) Manabu Ato, Kazuya Iwabuchi, Kazunori Onoé: Administration of LPS enhances apoptosis of marginal zone macrophages and disappearance of dendritic cells in the spleen of a human MCP-1 transgenic mouse. 9th International symposium of molecular biology of macrophage, 2000. (於 Kyoto)
 - 6) 阿戸 学, 岩渕和也, 小野江和則：ヒト単球走化活性化因子 (MCP-1) トランスジェニックマウスにおける LPS 感受性と脾臓周辺細胞の遊走に及ぼす影響. 第 40 回日本リンパ網内系学会, 2000. (於 浜松)
 - 7) 岩渕和也, 水本昇克, 阿戸 学, 柳川芳毅, 小野江和則：MCP-1 トランスジェニックマウスを用いた接触性過敏反応の研究. 第 40 回日本リンパ網内系学会, 2000. (於 浜松)
 - 8) 石森直樹, 綿野敬子, 千葉仁志, 藤井 聡, 北島 顕, 岩渕和也, 小野江和則：Mixed allogeneic chimerism は ApoE ノックアウトマウスにおける動脈硬化病巣進展を抑制する：細胞工学的的手法における進展病巣への実験治療. 第 27 回北海道免疫研究会, 2000. (於 札幌)
 - 9) 石森直樹, 岩渕和也, 藤井 聡, 綿野敬子, 葛西瑞穂, 千葉仁志, 小野江和則, 北島 顕：Mixed allogeneic chimerism は

- ApoE ノックアウトマウスにおける動脈硬化病巣進展を抑制する. 第32回日本動脈硬化学会総会, 2000. (於 千葉)
- 10) 岩渕和也, 岩渕千雅子, 小野江和則: 卵白アルブミン特異的 I-A^d 拘束性 TCR トランスジェニックマウス (Tgm) のクロノタイプ陽性 NKT 細胞は何を認識するか. 第10回 Kyoto T Cells Conference, 2000. (於 京都)
 - 11) 大渡隆一郎, 岩渕千雅子, 岩渕和也, 小野江和則: Class I 拘束性 TCR Transgenic マウス (Tgm) における NKT 細胞の産生. 第10回 Kyoto T Cells Conference, 2000. (於 京都)
 - 12) 諸橋大樹, 岩渕和也, 小野江和則: 急性 GVHD 回復後の骨髄キメラマウスにおける T 細胞の解析. 第4回北海道移植フォーラム, 2000. (於 札幌)
 - 13) Ohno, H., Kizaki, T., Suzuki, K., Hitomi, Y., Iwabuchi, K., Onoé, K., Haga, S., Okawara, T., Suzuki, K., and Taniguchi, N.: Csk overexpression up-regulates activation of AP-1 by LPS. International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Beyond the Genome, 2000. (於 Birmingham)
 - 14) 阿戸 学, 岩渕和也, 小野江和則: ヒト単球走化活性化因子 (MCP-1) トランスジェニックマウスにおける LPS 感受性と脾臓周辺帯細胞の遊走に及ぼす影響. 第40回日本リンパ網内系学会総会, 2000. (於 浜松)
 - 15) 岩渕和也, 水本昇克, 阿戸 学, 柳川芳毅, 小野江和則: MCP-1 トランスジェニックマウスを用いた接触性過敏反応の研究. 第40回日本リンパ網内系学会総会, 2000. (於 浜松)
 - 16) 石森直樹, 藤井 聡, 岩渕和也, 綿野敬子, 北畠 顕, 小野江和則: 骨髄キメラマウスを用いた細胞工学的手法による動脈硬化病巣進展抑制の研究. 第1回血管病研究会, 2000. (於 東京)
 - 17) Izutsu, Y., Ooshima, M., Maeno, M., Tochinnai, S., Onoé, K., and Hosono, M.: Possible involvement of adult immune cells in apoptosis of larval cells in the regressing tail during *Xenopus* metamorphosis. Cell & Molecular Biology of Apoptosis (Meeting of the British Society for Cell Biology), 2000. (於 Edinburgh, UK)
 - 18) 永田純一, 岩渕和也, 小野江和則: 大豆皮ヘミセルロースの抗腫瘍効果およびマウス抗体産生と抗原提示細胞へ及ぼす影響. 第30回日本免疫学会, 2000. (於 仙台)
 - 19) 大渡隆一郎, 岩渕千雅子, 岩渕和也, 小野江和則: MHC クラス I 拘束性 TCR トランスジェニックマウス (Tgm) における NKT 細胞の産生とその機能の解析. 第30回日本免疫学会, 2000. (於 仙台)
 - 20) 岩渕和也, 岩渕千雅子, 小野江和則: 卵白アルブミン (OVA) 特異的 I-A^d 拘束性 TCR トランスジェニックマウス (Tgm) のクロノタイプ陽性 NKT 細胞の認識抗原について. 第30回日本免疫学会, 2000. (於 仙台)
 - 21) 諸橋大樹, 岩渕和也, 小野江和則: アロ骨髄移植後の T 細胞レパトリー形成と機能に及ぼす急性 GVHD の影響. 第30回日本免疫学会, 2000. (於 仙台)
 - 22) 岩渕千雅子, 岩渕和也, 菊地一博, 小野江和則: 卵白アルブミン (OVA) 特異的 I-A^d 拘束性 TCR トランスジェニックマウス

- ス(Tgm)におけるOVA投与によるNKT細胞のクローン消去のメカニズム. 第30回日本免疫学会, 2000. (於 仙台)
- 23) 綿野敬子, 岩渕和也, 藤井 聡, 石森直樹, 阿戸 学, 小野江和則: アログラフィト炎症因子(AIF)-1はマクロファージのIL-6, -10, -12産生を増強する. 第30回日本免疫学会, 2000. (於 仙台)
- 24) 梶野喜一, 瀧北幹子, 福岡順也, 伊藤 靖, 小野江和則, 小笠原一誠: リポソーム封入 P366-374 ペプチド+抗CD40抗体の鼻腔投与によるインフルエンザウイルスの感染抑制. 第30回日本免疫学会, 2000. (於 仙台)
- 25) Ishimori, N., Iwabuchi, K., Watano, K., Chiba, H., Onoé, K., Fujii, S.: Mixed allogeneic chimerism with wild-type strains ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice: Therapeutic implications for cell-mediated gene therapy for advanced atheroma. The AHA 73rd Scientific Sessions, 2000. (於 New Orleans)
- 26) 北市伸義, 小竹 聡, 笹本洋一, 小野江和則, 西平 順: ぶどう膜炎患者における血清中マクロファージ遊走阻止因子動態の検討. 第34回眼炎症学会, 2000. (於 金沢)
- 27) 岩渕和也, 水本昇克, 阿戸 学, 岩渕千雅子, 川嶋利瑞, 柳川芳毅, 小野江和則: MCP-1 トランスジェニックマウス(Tgm)を用いた接触性過敏反応(CHR)の研究. 第80回北海道病理談話会, 2000. (於 札幌)
- 28) 荒浪利昌, 岩渕和也, 小野江和則: 同系混合リンパ球反応におけるCD8⁺T細胞の重要性. 第80回北海道病理談話会, 2000. (於 札幌)
- 29) 諸橋大樹, 岩渕和也, 小野江和則: 急性GVHD回復後の骨髄キメラマウスにおけるT細胞レパトリー形成と機能の解析. 第4回北海道免疫談話会, 2000. (於 札幌)
- 30) 大渡隆一郎, 岩渕和也, 岩渕千雅子, 小野江和則: MHC class I 拘束性 TCR transgenic マウス(2C Tgm)におけるクローンタイプ陽性NKT細胞の機能解析. 第4回北海道免疫談話会, 2000. (於 札幌)
- 31) Onoé, K.: Workshop, Immunology of Behçet's disease. NK-cells and NK-T-cells. Ettal-Workshop. "Immunology of Behçet's disease, 2000. (於 Ettal, Germany)
- 32) 小野江和則: 講演, 免疫の基礎-免疫応答の始動. 臨床検査講座, 2000. (於 札幌)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

東大眼科ぶどう膜外来過去20年間(80年代及び90年代)における ベーチェット病患者の統計的考察

分担研究者	藤野雄次郎	東京厚生年金病院眼科
	吉田 淳、本山祐大	東京大学医学部眼科
	渋井洋文、蕪城俊克	東京大学医学部眼科
	北川真由美、谷合厚	東京大学医学部眼科
	清水一之、沼賀二郎	東京大学医学部眼科
	伊澤保穂、林清文	東京大学医学部眼科
	川島秀俊	東京大学医学部眼科

研究要旨 1980年以降初診した眼症を有するベーチェット病患者について、80年代受診患者と90年代受診患者の2群に分け、2群間で臨床像・治療にいかなる変化がみられるかを統計的に解析した。対象は80年代群は計133例(うち男性107例、女性26例)、平均観察期間 33.5 ± 26.4 ヶ月、90年代群は計107例(うち男性79例、女性28例)、平均観察期間 46.9 ± 32.6 ヶ月である。これらの患者間において、眼症、全身症状、視力予後および治療内容の項目について、外来診療録をもとに統計的比較検討を行った。90年代受診群において、眼発作頻度の減少、初診時及び最終診察時の視力不良例(0.1未満)の減少と視力良好例(0.7以上)の増加が統計的有意にみられた。また、陰部潰瘍出現患者の減少傾向とシクロスポリンの使用頻度の減少傾向がみられた。

A. 研究目的

近年、ベーチェット病眼症の軽少化が指摘されている。増田ら¹⁾、安藤ら²⁾、助川ら³⁾はそれぞれ視力経過の軽症化を、小竹らは症例数の減少⁴⁾と女性患者における軽症化⁵⁾を、同様に湯浅ら⁶⁾、東田ら⁷⁾は女性視力予後良好の傾向を報告している。これを検証するため、1980年以降初診した眼症を有するベーチェット病患者について、80年代受診患者と90年代受診患者の2群間で臨床像・治療に如何なる変化がみられるかを統計的に解析した。

B. 研究方法

対象は80年代群は計133例(うち男性107例、女性26例)、観察期間は4ヶ月～111ヶ月(平均 33.5 ± 26.4 ヶ月)、90年代群は計107例(うち男性79例、女性28例)、観察期間は4ヶ月

～118ヶ月(平均 46.9 ± 32.6 ヶ月)であった。

これらの患者間において、眼症(発症年齢、両眼性片眼性頻度、炎症部位、発作頻度)、全身症状(主症状の頻度、特殊型の頻度)、視力予後(初診時と最終観察時)および治療内容(内服薬、緑内障・白内障治療歴)の項目について、外来診療録をもとにretrospectiveに2群間の比較検討を行った。

C. 研究結果

1. 眼症

眼症の発症年齢は80年代で 34.5 ± 9.6 才(14～66才)、90年代で 32.1 ± 10.4 才(13才～61才)であった。発症年齢について2群間で統計的有意差はなかった(Mann-Whitney U-test $p=0.094$)。初診前、経過観察期間中を通して片眼発症のみの症例を片眼性、それ

以外を両眼性としたとき、80年代では片眼性と両眼性の割合は5:128、90年代では11:96であり、統計的有意差はなかった(χ^2 乗検定 $p=0.066$)。

炎症部位については、初診前、経過観察期間中を通して虹彩毛様体炎しかみられなかった症例を虹彩毛様体炎型とした。80年代では虹彩毛様体炎型と網膜ぶどう膜炎型の症例数比は5:128、90年代では2:105であり、統計的有意差はなかった(χ^2 乗検定 $p=0.47$)。

また片眼発作を1回、両眼同時発作を2回として、各症例で全発作回数/経過観察期間を求め、両群の平均の発作頻度を調べた。80年代は 2.8 ± 2.6 回/年、90年代は 2.2 ± 2.3 回/年であり、90年代で有意に発作回数が減少していた(χ^2 乗検定 $p<0.05$)。

2. 全身症状

完全型と不全型の割合、口腔内アフタ、皮膚症状と陰部潰瘍の出現頻度、また特殊型神経型、腸管型頻度について2群間で統計的有意差(5%水準)はなかったが、90年代で陰部潰瘍出現患者の減少傾向がみられた(表1)。

3. 視力予後

80年代90年代の2群それぞれで1年以上経過観察し得た症例について視力予後の解析を行った。0.1未満の視力を視力不良群、0.7以上の視力を視力良好群として、80年代90年代それぞれの初診時と最終診察時の視力不良群と良好群の割合を調べた。片眼発症例は患眼のみをデータとして扱った。また初診時および最終診察時の視力は、眼発作時の一過性の視力低下の影響を除外するため、発作寛解時の視力を用いた。初診時において、80年代207眼中、視力不良群は81眼39%、視力良好群50眼24%であったのに対し、90年代166眼中、視力不良群は25眼15%、視力良好群96眼58%であり、90年代で有意に視力不良群は減少し良好群は増加していた(χ^2 乗検定 $p<0.01$ 、図1)。同様に最終診察時では、

80年代207眼中、視力不良群は116眼56%、視力良好群32眼15%であったのに対し、90年代166眼中、視力不良群32眼19%、視力良好群83眼50%であり、90年代で有意に視力不良群は減少し良好群は増加していた(χ^2 乗検定 $p<0.01$ 、図2)。80年代90年代それぞれについて視力経過の散布図を示す(図3、4)。横軸は初診時を0とした経過時間(ヶ月)、縦軸は視力対数値で、各患眼の初診時と最終診察時の視力値をプロットした。それぞれ図中の直線は一次回帰直線を表す。この一次回帰直線とは別に、各症例において初診時と最終診察時の視力から(対数視力値の差)/(経過ヶ月)の傾きを求め、80年代90年代2群間の有意差を調べた。その結果80年代では傾き -0.01190 ± 0.026 、90年代では -0.0051 ± 0.016 であった。90年代で有意に傾きは減少していた(Mann-Whitney U-test $p=0.025$)。

4. 治療

全身投与薬の使用頻度について、コルヒチン、シクロスポリン、ステロイドの3剤の使用歴の有無を調べた。コルヒチン、シクロスポリンは初診前および経過観察期間内の使用歴の有無で選別した。ステロイドでは初診前での使用の有無が不明な症例が多かったため、経過観察期間内の使用歴の有無として、内服方法(大量漸減、少量長期)に関係なく選別した。その結果、コルヒチンは80年代では使用有:無が105:24(不明4)であったのに対し、90年代では84:21(不明2)であった(χ^2 乗検定 $p=0.82$)。シクロスポリンは80年代では使用有:無が76:52(不明5)であったのに対し、90年代では44:61(不明2)であり、有意に90年代でその使用歴は減少していた(χ^2 乗検定 $p<0.01$)。ステロイドは80年代では使用有:無が40:93であったのに対し、90年代では24:83であった(χ^2 乗検定 $p=0.13$)。

手術療法もしくは4ヶ月以上降眼圧薬療法を受けた症例を緑内障有りとし、緑内障の含

併率について調べた。緑内障合併は80年代は対象251眼中112眼45%、90年代は対象200眼中73眼37% (χ^2 乗検定 $p=0.13$)、緑内障手術歴は80年代は17眼6.8%、90年代は8眼4% (χ^2 乗検定 $p=0.09$)、そのうち線維柱帯切除術については80年代は11眼4.4%、90年代は6眼3% (χ^2 乗検定 $p=0.29$)、周辺虹彩切除術は80年代は6眼2.4%、90年代は2眼1% (χ^2 乗検定 $p=0.48$)。いずれも年代間で統計的有意差はなかった。同様に白内障手術歴有については、80年代は50眼20%、90年代は32眼16% (χ^2 乗検定 $p=0.33$)であった。さらにそのうち経過観察期間中に白内障手術歴有は、80年代は28眼11%、90年代は29眼15% (χ^2 乗検定 $p=0.33$)。白内障手術歴で年代間で統計的有意差はみられなかった。

D. 考察

今回行なった年代間の比較では、80年代90年代2群間で5%危険率にて有意差がみられた項目は、発作頻度の減少、視力良好群の増加、不良群の減少であった。また片眼例の増加例、陰部潰瘍既往頻度の減少などが5~10%危険率の範囲の変化としてみられ、傾向としてとらえられた。本調査では、視力良好群が増加、不良群が減少しており、視力経過が軽症化してきている^{1),2),3)}という過去の報告を再確認したものと思われる。

治療では、シクロスポリンの使用頻度が80年代に極端に多くみとめられたのは、80年代に実施されたシクロスポリンの二重盲検治験による影響と考えられる。これまでに、シクロスポリンの使用頻度の増加が視力等長期経過の改善の第一的根拠とする報告⁸⁾、シクロスポリン導入後眼発作頻度が減少したという報告⁹⁾がみられる。本調査では、90年代以降シクロスポリンの使用頻度が減少しているにも関わらず、発作頻度および視力経過に改善がみられていた。このことはシクロスポリンの導入という治療の変革以外にも、軽症

化につながりうる要因が存在していた可能性を示唆している。

E. 結論

眼症発症年齢、炎症部位、緑内障合併率、手術歴等では2群間に統計的有意差はなかったが、90年代受診群において、眼発作頻度の減少、初診時及び最終診察時の視力不良例(0.1未満)の減少と視力良好例(0.7以上)の増加が統計的有意にみられた。また、陰部潰瘍出現患者の減少傾向とシクロスポリン使用頻度の減少傾向がみられた。

F. 文献

- 1) 増田寛次郎、他：厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班平成6年度研究業績 185-187, 1995
- 2) Ando K, et al: Jpn J Ophthalmol 43: 312-317, 1999
- 3) 助川祥一、他：臨眼51: 1157-1160, 1997
- 4) 小竹聡、他：厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班平成4年度研究業績 157-159, 1993
- 5) 小竹聡、他：厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班平成11年度研究業績 97-99, 2000
- 6) 湯浅武之助、他：厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班平成7年度研究業績 102-103, 1996
- 7) 東田みち代、他：眼紀 42:1014- 1018, 1991
- 8) 呉朋子、他：眼紀 48: 809-813, 1997
- 9) 大野重昭、他：厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班平成11年度研究業績 91-96, 2000

G. 研究発表

学会発症 第54回日本臨床眼科学会発表 (平成12年11月5日)、東京

表1 眼症以外の全身症状発症頻度

	80年代 (133例)	90年代 (107例)	p値
完全型 : 不全型 : 不明*	63 : 67 : 3	39 : 64 : 4	0.11
口内炎	122例(92%)	96例(90%)	0.70
皮膚症状	103例(77%)	86例(80%)	0.83
陰部潰瘍	71例(53%)	44例(41%)	0.076
特殊型 神経ベーチェット	11例	4例	0.19
腸管ベーチェット	3例	4例	0.70
血管ベーチェット	0例	0例	

* 不明例は群間検定時には除外

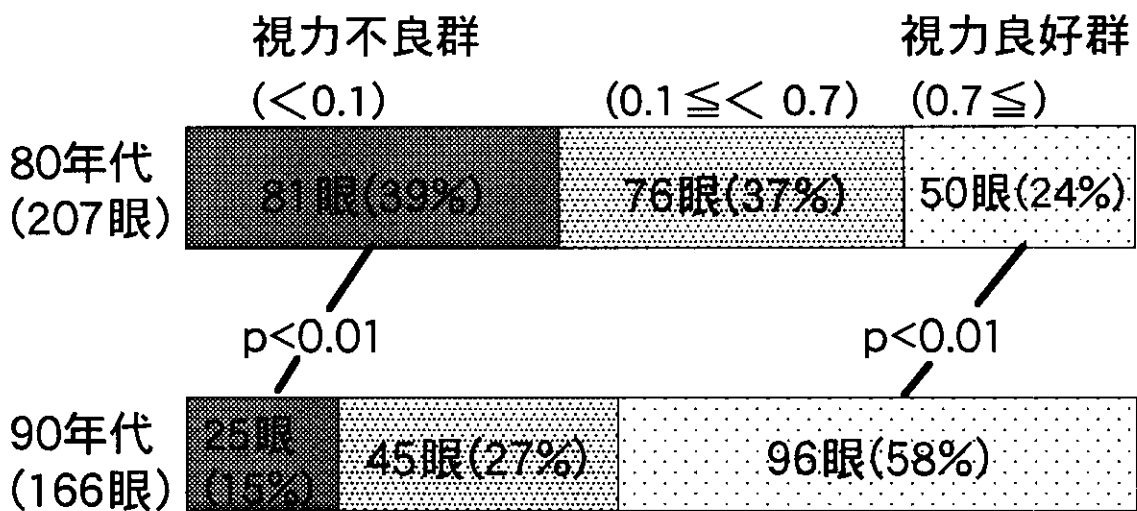


図1 1980年代と90年代での初診時視力良好群と不良群の割合

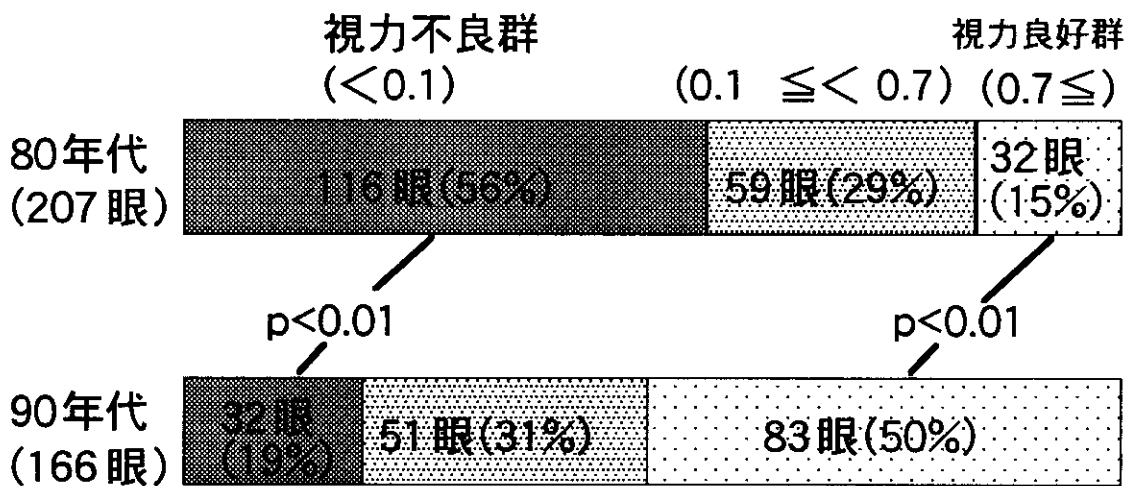


図2 1980年代と90年代での最終診察時視力良好群と不良群の割合

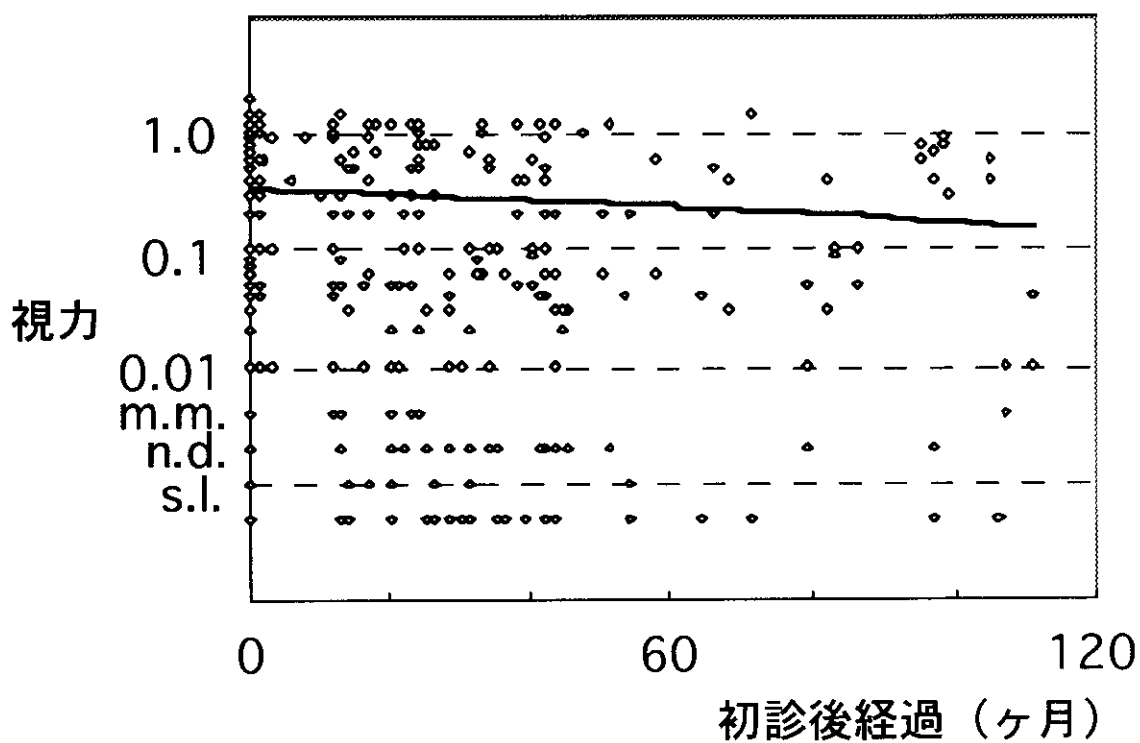


図3 1980年代群における初診から最終診察までの視力経過
 図中直線は一次回帰直線

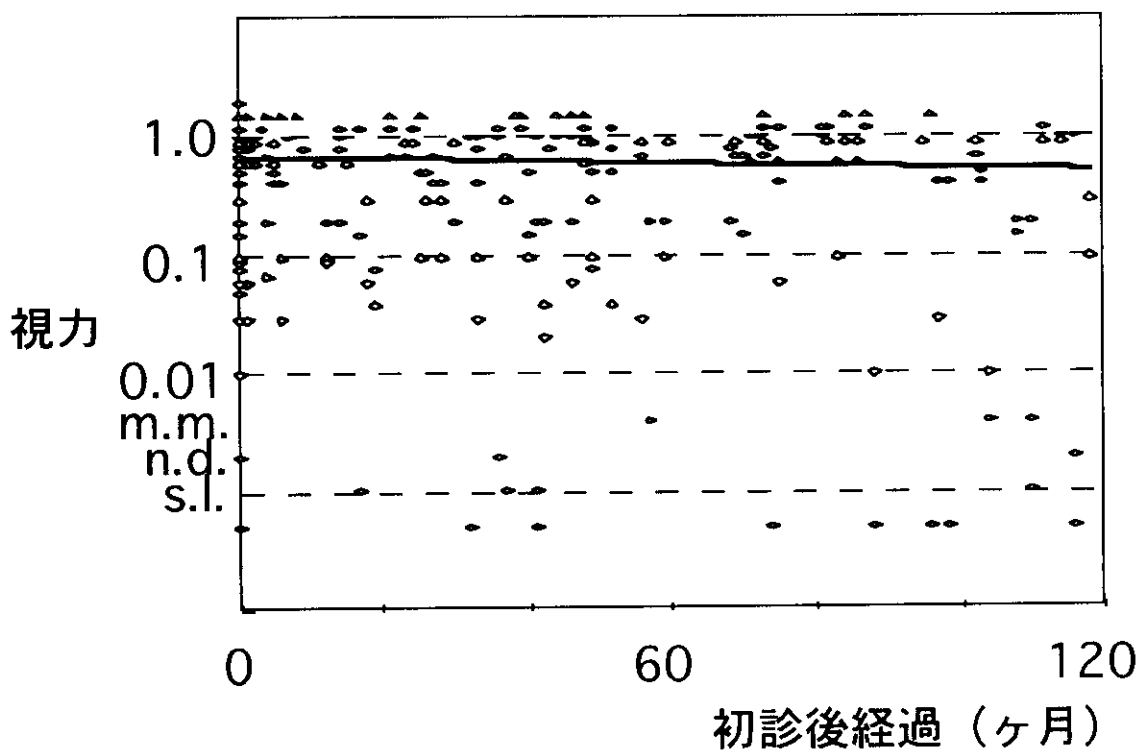


図4 1990年代群における初診から最終診察までの視力経過
 図中直線は一次回帰直線