

[結果]

対象者 125 名のうち、106 名(男性 52 名、女性 54 名)のベーチェット病患者より回答が得られた。質問票回収率は 85%であった。アンケートに答えた人と答えなかった人の間に、年齢、性別、病悩期間、重症度、活動性における有意差はなかった。

図 1 に対象者の医学的背景を、図 2 に雇用状況を示す。

図 1 対象者の背景 (n=125)

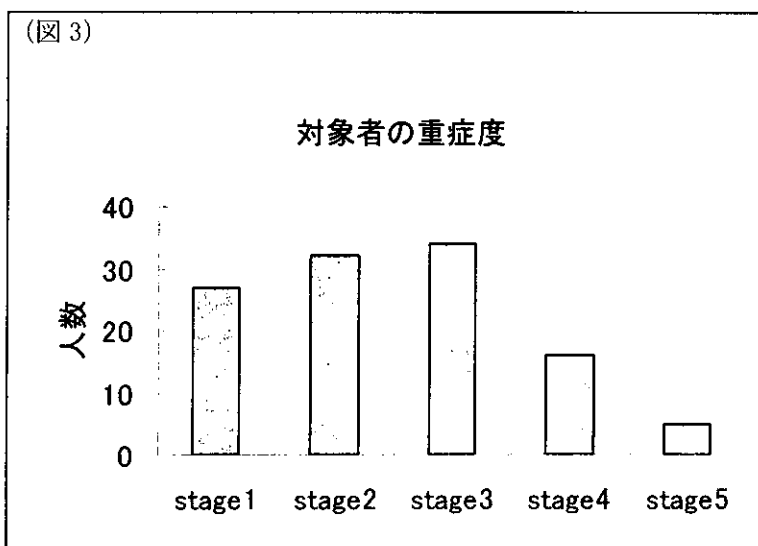
項目		Missing (n)
年齢 mean (SD)	49 (13)	1
女性 n (%)	63 (50)	
病型 (完全型) n (%)	53 (46)	11
病悩期間 mean (SD)	10.7 (7.5)	10
特定疾患の認定 n (%)	85 (73)	8
現在の視力 n (%) (よい方、矯正視力)		16
< 0.1	3 (3)	
0.1 \geq , < 0.6	13 (12)	
0.6 \leq	97 (86)	
眼炎症発作回数 (半年間) n (%)		15
\leq 4 回	2 (2)	
\leq 2 回, < 4 回	13 (12)	
1 回	12 (11)	
なし	83 (75)	
現在の治療内容 n (%)		
シクロスポリン内服	14 (12)	5
コルヒチン内服	55 (46)	5
ステロイド内服	24 (20)	5
その他の免疫抑制剤	7 (6)	5
ステロイド局所投与	43 (36)	5
並存慢性疾患* n (%)*		2
なし	42 (40)	
1 つ	40 (38)	
2 つ以上	22 (21)	

*アンケート回答者のみ(n = 106)

図2 アンケート回答者の社会的背景

		missing
雇用状況 n (%)		2
フルタイム	41 (39)	
パートタイム	9 (9)	
退職・無職・休職・一時解雇	16 (16)	
家事専業	28 (27)	
学生	1 (1)	
その他	9 (9)	

図3に対象者の重症度を示す。



Stage 1が27名、stage 2が32名、stage 3が34名、stage 4が16名、stage 5が5名であった（11名不明）。

図4に対象者の活動性を示す。症状別には、過去1カ月間に症状を認めたのは眼症状19名(20%、9名不明)、皮膚症状76名(75%、5名不明)、関節症状17名(17%、5名不明)、副睾丸炎1名(1%、16名不明)、消化器病変6名(6%、5名不明)、血管病変5名(5%、5名不明)、中枢神経病変3名(3%、6名不明)であった。

図4 対象者の活動性

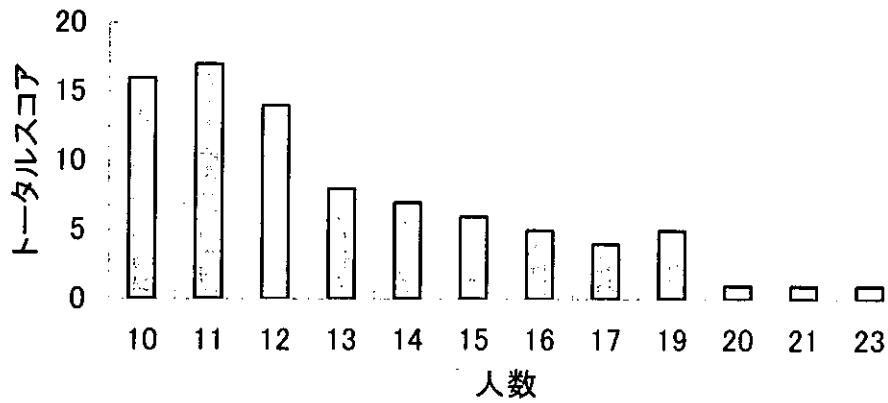


図5に重症度と活動性の関係を示す。ベーチェット病の重症度と活動性の間に有意な関連は認められなかった。(One-way ANOVA, $p < 0.76$)

図5

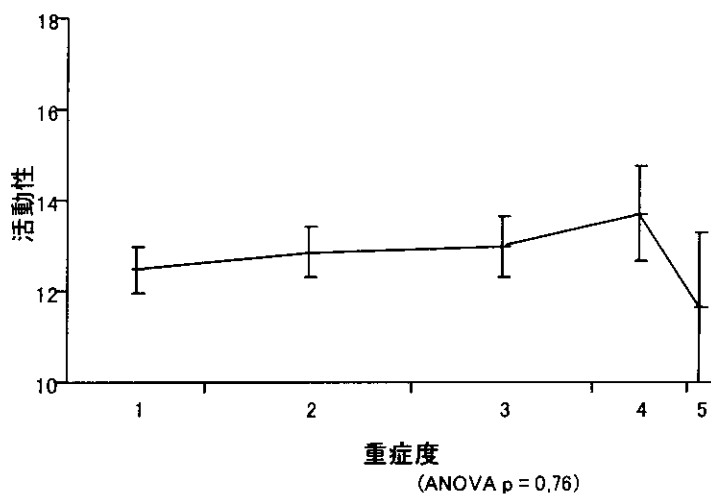


図 6 に SF-36 スコアの国民標準値との差得点を示す。SF-36 スコアは、全てのサブスケールにおいて、国民標準値より 0.5-1 SD 低い値を示した。

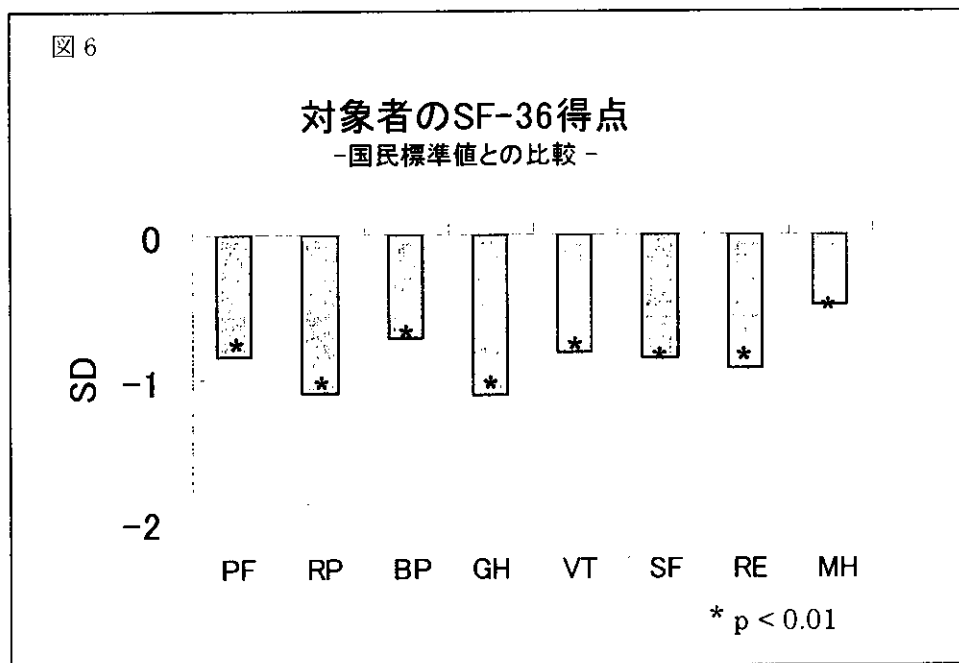


図 7 に 2 変量解析において SF-36 スコアと関連を認めた因子、認めなかった因子を示す。

図 7 (SF-36 スコアとの関連：2 変量解析)

SF-36 スコアとの関連を認めた因子	SF-36 スコアとの関連を認めなかった因子
年齢 併存疾患 (なし、1つ、2つ以上) 治療内容 (シクロスポリン、ステロイド内服) ベーチェット病の活動性 雇用状況 (働いている vs. 働いていない)	性別 病悩期間 病型 (完全型、不完全型) 特定疾患の認定の有無 治療内容 (その他) ベーチェット病の重症度

ベーチェット病の重症度分類の stage と SF-36 スコアの間に有意な関連は認められなかったが(図 7)、ベーチェット病の活動性指標と SF-36 スコアのうち RP, RE, SF, MH, VT, GH サブスケールとの間には有意な負の関連があり、重回帰分析にて性別、年齢、併存疾患で補正した後もこの関連は RP, RE, SF, BP, VT, GH サブスケールにおいて有意であった (図 8)。

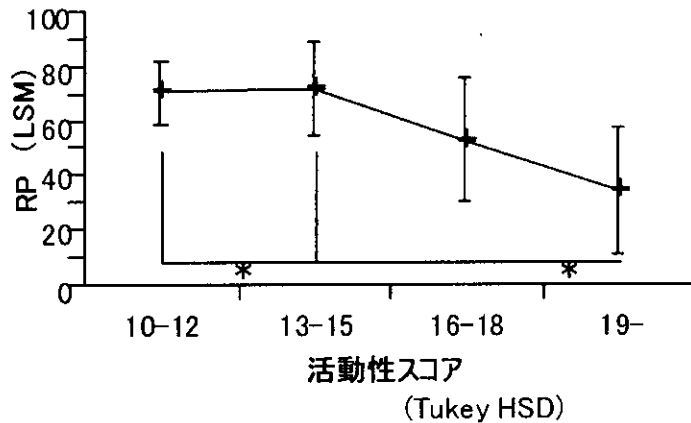
図8 SF-36 スコアとパーチェット病の活動性（重回帰分析）

	PF	RP	RE	SF	MH	BP	VT	GH
年齢	△				△			
性別								
併存症								
活動性	△	◎	○	○		○	◎	○
R ²	12	13	10	8	11	12	18	10

(△ p<0.10, ○ p<0.05, ◎ p<0.01)

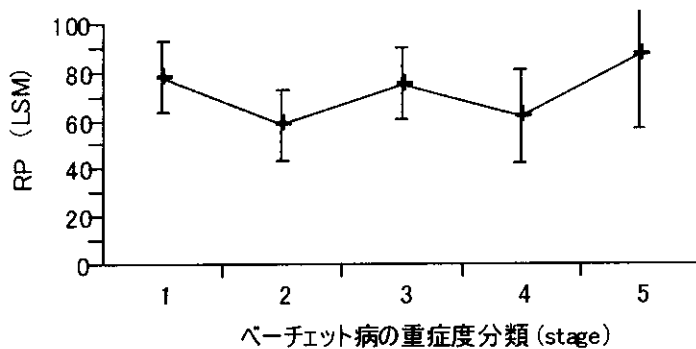
このうち、RP スコア（性別、年齢、併存疾患で補正）について、活動性スコアとの関係を例として図9に示す。活動性スコアが19点以上の患者は10-15点の患者と比較して、RPスコアが有意に低かった。

図9 RP スコアとパーチェット病の活動性との関連



これに対し、RP スコア（性別、年齢、併存疾患で補正）と重症度との間には有意な関連は認められなかった（図10）。

図10 RP スコアとパーチェット病の重症度との関連



57名が、過去1年間にベーチェット病のために仕事、学校、家事などの日常活動を1日以上休んだと答えた(6名不明)。図11に過去1年間のベーチェット病による休業の有無とQOLとの関連を示す。QOLの身体的側面、精神的側面として、SF-36のPF、MHサブスケールを用い、年齢、性別、病悩期間で補正した。この結果、年齢が高いほど、またPFスコアが高いほどベーチェットによる休業「なし」と答えていることがわかった。MHと休業の有無の間には有意な関連は認められなかった。

図11 過去1年間におけるベーチェット病による休業の有無と関連する因子(n=100)
(多重ロジスティック回帰分析: adjusted R²=0.25)

	オッズ比	95%信頼限界	P-value
年齢	0.92	0.87 – 0.97	0.0030
女性	0.67	0.24 – 1.90	0.46
病悩期間	1.04	0.96 – 1.13	0.37
PF (0-100)	0.95	0.92 – 0.99	0.0090
MH (0-100)	0.98	0.95 – 1.01	0.20

次に、過去1年間にベーチェット病を原因とする休業があった患者57名のうち、180日以上休業したと答えた10名を除く47名を対象に、休業日数を従属変数とした重回帰分析を行った。休業日数の中央値は30日(range:1-365日)であった。SF-36のPFサブスケールスコアと休業日数の間に負の関連が認められたが、MHと休業日数の間に有意な関連はなかった。

図11 休業日数と関連する因子(重回帰分析, n=47)

	Estimate	95%信頼限界	P-value
年齢	0.81	-0.65 – 2.27	0.28
女性	-2.07	-14.71 – 10.57	0.75
病悩期間	-1.86	-3.91 – 0.19	0.08
PF (0-100)	-1.00	-1.71 – -0.29	<.0084
MH (0-100)	0.08	-0.71 – 0.87	0.85

[考察]

今回の研究の対象となったのは外来通院患者であり、消化器病変、血管病変、中枢神経病変などの重篤な副症状を持つ者は少なかった。また、自力でアンケートに答えられる人を対象としたため、視力も良く、過去半年の眼炎症発作の頻度も低かった。このため、重症度基準の stage 1-3 に入る患者が多かった。

活動性指標においては、スコアの範囲が 10-40 点であるのに対し、実際のスコアの範囲が 10-23 点であった。このスケールでは、各症状についてその存在期間を（症状なし）～（常に存在）の 4 段階に分け、トータルスコアを算出し活動性の指標としたのであるが、副症状を示す項目 6-10 においてスコア 1（症状なし）であった人が多かったため、このようなスコアの分布となったと考えられる。このため、本研究の活動性スコアは、主に眼病変と皮膚病変の活動性を反映していると考えられる。本研究において、この活動性スコアは QOL を反映することが示されたが、副症状を持つ重症の患者においてもこの活動性スコアが患者 QOL を反映するかについては今後、重症患者を対象とした研究が必要である。また、この活動性スケールは、10 項目の症状の重み付けが全て 1 であるとの仮定のもとに作成されているが、例えば皮膚症状と中枢神経症状が患者にとって同じ重み付けであるとは考えにくい。この点に関しても、重症患者を対象に含めた研究で、QOL データとの関連の強さなどから重み付けをすることが必要であると考えられた。

本研究においては、対象者が視力も良く、副症状も少ない比較的軽症のベーチェット病患者であったにもかかわらず、その SF-36 スコアは全ての側面において一般国民と比較して有意に低いことがわかった。比較的軽症と考えられるベーチェット病患者でも、その日常生活が様々な側面において妨げられているということを、医療従事者側は認識しなければならない。

本研究班作成の重症度基準は、患者の持つ症状の種類により重症度を決めている。本研究において、重症度ではなく、過去 1 ヶ月間の活動性が QOL と関連することがわかった。ベーチェット病は、多彩な症状が増悪と緩解を繰り返しながら進行することが知られているが、患者評価において患者自身の主観をより大切にするには、症状の種類だけでなく、その活動性を評価する必要があることがわかった。

疾患による日常生活機能制限を評価する客観的指標として、実際の休業日数は重要である。本研究において、休業日数と関連しているのは、QOL の心理的側面ではなく、主に身体的側面であることがわかった。この結果は福原ら[2]が行った、眼病変を持つベーチェット病患者において、病悩期間や MH が休業日数に関連したという結果と矛盾する。視力障害の有無は、日常生活への支障という点で極めて重大なポイントであると考えられ、視力障害のあるベーチェット病患者とそうでないベーチェット病患者では、QOL に影響を与える要因が異なるのではないかと考えられた。視力障害がある患者では障害そのものとその持続期間（病悩期間）が日常生活に大きな支障をきたす原因となり、心のもち方(=MH)も QOL に影響してくるのに対し、視力障害がないか、軽度な患者にとっては、現在の症状の強さとそれによる身体活動制限(=PF)が QOL に強く影響するのかもしれない。

[結論]

本研究によって、視力障害および重篤な副症状のない比較的軽症のベーチェット病患者においても、その QOL が一般国民と比較して有意に低下していることがわかった。また、疾患の重症度ではなく、活動性が QOL と関連していること、また、休業日数と関連しているのは、QOL の心理的側面ではなく、主に身体的側面であることがわかった。

参考文献

1. 星恵子, 坂根剛, 吉田勝美, 箕輪眞澄 ベーチェット病の QOL—評価表の作成と患者の満足度ならびに QOL 向上のための支援策. 厚生省特定疾患難病の疫学調査研究班 平成 7 年度研究業績集 p344-350
班長 大野良之 年度研究報告書
2. 福原俊一, 小竹聡, 合田千穂 SF-36 を用いたベーチェット病患者の健康関連 QOL の測定と検討. 厚生省特定疾患 臨床調査グループ 免疫疾患調査研究班 ベーチェット病分科会 平成 10 年度研究報告書
3. Ware, J.E. and C.D. Sherbourne, *The MOS 36-item short-form health survey (SF-36)*. Med. Care, 1992. 30: p. 473-483.
4. Fukuhara, S., *et al.*, *Translation, adaptation, and validation of the SF-36 for use in Japan*. Journal of Clinical Epidemiology, 1998. 51(11): p. 1037-1044.
5. Fukuhara, S., *et al.*, *Psychometric and clinical tests of validity in measuring physical and mental health constructs in Japan*. Journal of Clinical Epidemiology, 1998. 51(11): p. 1045-1053.
6. Tsuji-Hayashi, Y., *et al.*, *HEALTH-RELATED QUALITY OF LIFE AMONG RENAL-TRANSPLANT RECIPIENTS IN JAPAN*. Transplantation, 1999. 68(9): p. 1331-1335.
7. 福原俊一, *MOS Short-Form 36-Item Health Survey : 新しい患者立脚型健康指標*. 厚生指標, 第 46 巻第 4 号 : 1999 年 4 月

(Appendix I)

SF-36 とは

SF-36 とは、1980 年代に米国で開発された、患者の主観的健康度を測定するための尺度である MOS (medical outcome study) questionnaires から生まれたものである。MOS questionnaires の項目数が多く、臨床での実地使用が困難であったため、大幅に短縮し、SF-36 が作られた[3]。既に SF-36 日本語訳の信頼性、妥当性が確立され[4, 5]、医療における outcome の指標の一つとして日本でも用いられ始めている[6][7]。

SF-36 は 36 の質問項目よりなり、これらは、8 つのサブスケールに分けられる。

◇SF-36 の特徴およびそのサブスケールの内容は、以下の通りである。

- (1) Generic Scale であるため、病気の種類にその使用が限定されない。
- (2) 質問数が少なく、臨床的に実用性が高い。(10 分ほどで解答できる)
- (3) 異なる環境によって左右される社会的な要素を避けているため国際比較も可能。

◇SF-36 のサブスケール

Physical Functioning(PF) : 身体機能	Vitality(VT) : 活力
Role-Physical(RP) : 日常役割機能(身体)	Social Functioning(SF) : 社会生活機能
Bodily Pain(BP) : 体の痛み	Role-Emotional(RE) : 日常役割機能(精神)
General Health(GH) : 全体的健康観	Mental Health(MH) : 精神状態

- それぞれのサブスケールについて、0 から 100 までのスコアが与えられる。
- スコアが高いほど、QOL が優れているとされる。

(Appendix II)

ベーチェット病の重症度基準(一部改変)

- (該当する□どれか一つをチェック。①、②のうちの片方、あるいは両方を満たすものとする。)
- stage 1 眼症状以外の皮膚及び粘膜症状による主症状のみ認めるもの
 - stage 2 ①stage 1 の症状に眼症状として虹彩毛様体炎が加わったもの
②stage 1 の症状に関節炎、副睾丸炎、下肢の潰瘍、巨大外陰部潰瘍が加わったもの
 - stage 3 網膜・ぶどう膜炎を認めるもの
 - stage 4 ①失明の危険があるか失明に至った網脈絡膜炎
②活動性、ないし重症の後遺症を残す特殊病型
 - stage 5 ①生命予後に危険のある特殊病型
②中等度以上の知能低下を有す進行性神経ベーチェット病

(Appendix III)

ベーチェット病の活動性指標

(各診療科においてベーチェット病の臨床に携わる研究協力者と協議した結果、過去1ヶ月以内に各症状が存在した期間を(症状なし)～(常に存在)の4段階に分け、トータルスコアを算出する活動性指標を作成した。)

過去1ヶ月以内にベーチェット病による以下の症状が存在した期間は				
	(症状なし)	(2週間未満)	(2週間以上)	(常に存在)
1. 眼症状	1	2	3	4
2. 口腔内アフタ	1	2	3	4
3. 外陰部潰瘍	1	2	3	4
4. 結節性紅斑様皮疹	1	2	3	4
5. その他の皮膚症状	1	2	3	4
6. 関節炎	1	2	3	4
7. 副睾丸炎	1	2	3	4
8. 消化器病変	1	2	3	4
9. 血管病変	1	2	3	4
10. 中枢神経病変	1	2	3	4

各項目の得点を合計したトータルスコアを算出 (10点～40点)

ベーチェット病における MICA に対する T 細胞の検討

分担研究者 桑名 正隆 (慶應義塾大学医学部、先端医科学研究所)
研究協力者 安岡 秀剛 (慶應義塾大学医学部、内科)
河上 裕 (慶應義塾大学医学部、先端医科学研究所)

研究要旨

ベーチェット病の遺伝素因として HLA-B51 と MICA (MHC class I chain-related gene A) の膜貫通領域の A6 配列 (MICA-A6) が報告されているが、これら遺伝素因とベーチェット病の病態との関連は明らかでない。HLA-B51 と MICA-A6 の両者がベーチェット病の病態と関連する仮説として、CD8⁺細胞障害性 T 細胞が B51 分子に提示された MICA-A6 部分を含むペプチドを認識することで活性化され、炎症性病態にかかわる可能性を考えた。この仮説を検証するため、ベーチェット病患者および健常人の末梢血 T 細胞を自己の抗原提示細胞と IL-2 の存在下で B51 分子に高親和性の MICA-A6 部分を含む合成ペプチド (A6 ペプチド) で 3 回刺激した。得られた T 細胞株の A6 ペプチドに対する特異性は A6 ペプチド刺激後の IFN- γ の産生により評価した。A6 ペプチド刺激による IFN- γ の産生増加は B51 陽性ベーチェット病患者 3 例中 2 例で観察されたが、B51 陰性の健常人 2 例では検出されなかった。したがって、ベーチェット病患者では末梢血中に MICA-A6 部分を認識する B51 拘束性の細胞傷害性 T 細胞が存在する可能性が示された。

A. 研究目的

ベーチェット病は口腔潰瘍、外陰部潰瘍、眼病変、皮膚症状を主徴とした全身性炎症性疾患であるが、その病態はいまだ明らかではない。ベーチェット病の遺伝的素因としては古くから HLA-B 遺伝子が知られ、日本人ベーチェット病患者の約 55% で HLA-B51 が陽性であることが報告されている¹⁾。近年、Mizuki らによる第 6 染色体短腕のマイクロサテライトマーカーを用いた解析の結果、HLA-B 遺伝子座近傍の MICA (MHC class I chain-related gene A) 遺伝子産物の膜貫通領域に存在するマイクロサテライト多型とベーチェット病と

の強い関連が見いだされた²⁾。MICA の膜貫通領域には GCT 配列の繰り返しによる遺伝子多型が存在し、その結果 GCT がコードするアラニン数が 3-10 個のアリルが存在する。ベーチェット病患者では GCT が 6 回反復するマイクロサテライト (MICA-A6) が健常人に比べて有意に高頻度である²⁾。MICA 分子の機能として 2 つの全く異なる作用が報告されている。MICA 分子が V δ 1⁺T 細胞リセプターのリガンドであり、主に腸管上皮に存在する $\gamma\delta$ T 細胞により認識される³⁾。また、MICA 分子はキラー活性をもつ NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、CD8⁺T 細胞などに発現される NKG2D の

リガンドで、その結合によりキラー活性が増強されることも報告されている⁴⁾。MICA分子はベーチェット病で障害される皮膚や粘膜上皮（眼ブドウ膜、口腔、腸管など）、血管内皮で発現され、またベーチェット病の病変部位で $\gamma\delta T$ 細胞や $CD8^+$ 細胞の増加が報告されていることから、その病態との関連も考えられる。ただし、HLA-BとMICAの遺伝子座がきわめて近いために強い連鎖不平衡が存在し、MICAとベーチェット病の統計学的な相関関係は単にHLA-Bとベーチェット病との関連を反映しているにすぎない可能性も指摘されている。

HLA-B51のトランスジェニックマウスでは好中球機能の亢進はみられたが、ベーチェット病にみられる臨床症状は観察されなかった⁵⁾。したがって、ベーチェット病の発症にはHLA-B51以外の遺伝素因または環境要因が必要と考えられている。そこで、我々はベーチェット病の病態誘導にHLA-B51とMICA-A6の両者の組み合わせが関連する可能性を考えた。その機序として、MICAの膜貫通領域のA6マイクロサテライト領域を含むペプチドがB51分子上に提示され、それを認識する $CD8^+T$ 細胞がMICA発現細胞を傷害し、炎症性病態を誘導する仮説を考えた。そこで、本年度はB51陽性ベーチェット病患者においてMICA-A6部分を含むペプチドを認識するT細胞の検出を試みた。

B. 研究方法および対象

1. 対象

B51陽性の厚生省研究班の診断基準を満たすベーチェット病患者4例（完全型1例、不全型2例）を対象とした。対照として、B51陰性の健常人2例を用いた。

2. HLAクラスI分子高親和性のMICA多型性部分ペプチドの検索

HLAクラスIとペプチドの結合親和性は既知のHLAクラスIのペプチド親和性のデータベースに基づいて作成されたインターネット上のプログラム (http://www-bimas.dcert.nih.gov/molbio/hla_bind) を用いて検討した。連鎖不平衡にあるHLAクラスIとMICA対立遺伝子の組み合わせで、MICA分子の多型性部分を含むペプチドのHLAクラスI分子との結合親和性を調べた。

3. ペプチドの合成と精製

ペプチド合成機 (Advanced ChemTech, Louisville, KY) を用いて固相法によりペプチドを合成した。ペプチドは液層クロマトグラフィーにより分画精製し、さらにマスマスペクトロメトリーを用いて分子量を確認した。

4. ペプチド刺激T細胞株の樹立

比重遠心法により分離した末梢血単核球 (PBMC) を10%ウシ胎児血清を添加したIscove's modified Dulbecco's mediumに浮遊させて細胞数を調整した。PBMC (1.5×10^6) を $2 \mu\text{g/ml}$ のペプチドの存在下で 37°C 、5% CO_2 、加湿条件下で2時間培養し、洗浄後に γ 線照射 (40 Gy) してstimulatorとして用いた。PBMC (1.5×10^5) とstimulatorを混ぜて培養し、翌日にIL-2 (50 U/ml) を加えた。その後1週間ごとに計3回、増殖した細胞をペプチドをパルスしたstimulatorと1:10の比率で混合し、IL-2存在下で刺激した。一部の検体では、3回目の刺激のstimulatorとしてPBMCのかわりに自己のEBウイルスでトランスフォームしたB細胞株を100 Gyの γ 線照射してから用いた。

5. ペプチド特異的反応性の検討

ペプチド刺激により得られたT細胞株を、ペプチド存在または非存在下で37℃、2時間培養してγ線照射したPBMCと1:2の比で混ぜて培養した。24時間後に培養上清を回収し、上清中のIFN-γ濃度を抗IFN-γモノクローナル抗体を用いたELISA法により測定した。

(倫理面への配慮)

すべての患者および健常人の検体はインフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。

C. 研究結果

1. B51高親和性のMICA多型性部分ペプチドの選択

連鎖不平衡にあるHLA-A、BとMICAの組み合わせで、HLAクラスI分子に高親和性のMICAの多型性部分を含む9-merペプチドを検索した。その結果、結合親和性を反映するスコアが最も高い組み合わせはB*5101とMICA分子の膜貫通領域のA6を含むペプチド（アミノ酸残基294-302番；AAAAAIFVI）であった（スコア242.0）。このペプチドはB51の他のサブアレルであるB*5102、B*5103に対しても高いスコアを示した（220.0、121.0）。それに対し、プログラム上でデータが解析可能であったHLA-A、BとMICAの組み合わせは、いずれもスコアが18.0以下と低値であった。8-merや10-merペプチドでも同様の検索を施行したが、B51とMICA-A6を含むペプチドが最も高いスコアを示した。以上の結果から、MICA-A6部分を含むペプチドがB51分子上に提示され、CD8⁺T細胞を刺激する可能性が考えられた。そこで、9-mer

のAAAAAIFVIを合成し、A6ペプチドと名づけた。

2. A6ペプチド反応性T細胞の誘導

B51陽性ベーチェット病患者3例とB51陰性健常人2例の末梢血T細胞をA6ペプチドで3回刺激し、増殖したT細胞のA6ペプチドに対する特異性を検討した。図1に示すように、T細胞株をA6ペプチド存在または非存在下で刺激し、上清中に産生されたINF-γを測定した。B51陽性ベーチェット病患者3例ではいずれもA6ペプチド非存在下でもINF-γの産生がみられたが、そのうち2例（MY、SN）でA6ペプチド添加によりINF-γの産生が増強した。一方、健常人2例ではA6ペプチドの有無にかかわらず培養上清でINF-γの検出はできなかった。

D. 考察

B51に高親和性と考えられるMICAの膜貫通領域のマイクロサテライト配列を含むA6ペプチドを用いて、B51陽性ベーチェット病患者でMICA-A6を含む部分を認識するT細胞の存在を検討した。その結果、B51陽性ベーチェット病患者3例中2例の末梢血中にA6ペプチドを認識するT細胞が存在する可能性が示された。MICA-A6を認識するCD8⁺T細胞がベーチェット病の病態に関与していることが明らかになれば、HLA-B51とMICA-A6の両者の組み合わせがベーチェット病の発症に重要と考えられる。

今回のpreliminaryな実験結果からA6ペプチドを認識するB51拘束性のCD8⁺T細胞の存在が示唆されたが、その点を確認するためにはさらに詳細な検討が必要である。すなわち、A6ペプチド刺激でINF-γ

を産生した細胞が CD8⁺T 細胞であるのかなど、検討すべき課題は多い。さらに、ベーチェット病患者ではペプチド非存在下でも培養上清中に大量の IFN- γ 産生がみられ、background が高いために A6 ペプチド刺激により誘導される IFN- γ の評価が困難であった。この点に関しては、ベーチェット病患者の末梢血 T 細胞では IFN- γ の spontaneous な産生がみられるためと考えられる⁶⁾。今後、アッセイの際に B51 トランスジェニックマウス由来の細胞を stimulator として用いるなどの改善が必要である。さらに、A6 ペプチドと反応する T 細胞が B51 陽性健常人や B51 陰性ベーチェット病患者にも存在するかどうか興味ある点である。

MICA 分子の発現は上皮細胞、血管内皮細胞、ケラチノサイトなどに限られ⁷⁾、ベーチェット病にみられる病変の分布と一致する。また、MICA 分子の発現は、熱などのストレスにより誘導され⁸⁾、ベーチェット病の臨床症状が細菌感染や機械刺激により誘導される事実とも一致する。MICA 分子は外界と接する皮膚や粘膜の細胞でストレスにより発現誘導され、ストレスにより傷ついた細胞が $\gamma\delta$ T 細胞をはじめとしたキラー活性を有する T 細胞により認識、除去される際の目印になっていると考えられている⁹⁾。ベーチェット病患者の臨床症状から、その病態はストレスで傷ついた外界と接する細胞を処理する際の過剰な免疫応答と理解することもできる。したがって、B51 と MICA-A6 を併せ持つ者では一般的な MICA を介した傷害細胞の処理機構に加え、MICA-A6 部分を認識する CD8⁺細胞傷害性 T 細胞もかかわることで、免疫応答が増強されるのかもしれない。この仮説については今後の検討が必要であるが、ベーチェ

ット病の病因、病態を解明する上での breakthrough となる可能性がある。

E. 結論

ベーチェット病患者では末梢血中に B51 拘束性の MICA の膜貫通領域を認識する T 細胞が存在し、病態と関連する可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

<引用文献>

- 1) Nakae K, Masaki F, Hashimoto T, et al. Recent epidemiological features of Behcet's disease in Japan. In: Wechsler B, Godeau P, eds. Behcet's disease. Amsterdam: Excerpta Medica, 1993: 145-151.
- 2) Mizuki N, Ota M, Kimura M, et al. 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 1997; 94: 1298-1303.
- 3) Groh V, Steinle A, Bauer S, et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. Science 1998; 279: 1737-1740.
- 4) Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science 1999; 285: 727-729.
- 5) Takeno M, Kariyone A, Yamashita N, et al. Excessive function of peripheral blood neutrophils from

- | | |
|--|--------|
| patients with Behcet's disease and from HLA-B51 transgenic mice. Arthritis Rheum 1995; 38: 426-433. | なし |
| 6) Frassanito MA, Dammacco R, Cafforio P, et al. Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease. Arthritis Rheum 1999; 42: 1967-1974. | 3. その他 |
| 7) Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 6259-6263. | なし |
| 8) Groh V, Bahram S, Bauer S, et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 12445-12450. | |
| 9) Hagmann M. A trigger of natural (and other) killers. Science 1999; 285: 645-646. | |

G. 研究発表

1. 論文発表

桑名正隆: ヒトの自己免疫疾患における自己反応性T細胞. 組織培養工学 2000; 26: 102-106.

2. 学会発表

桑名正隆: Role of T-cell-derived cytokines in autoantibody production. 第44回日本リウマチ学会総会(横浜). 平成12年5月

H. 知的所得権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

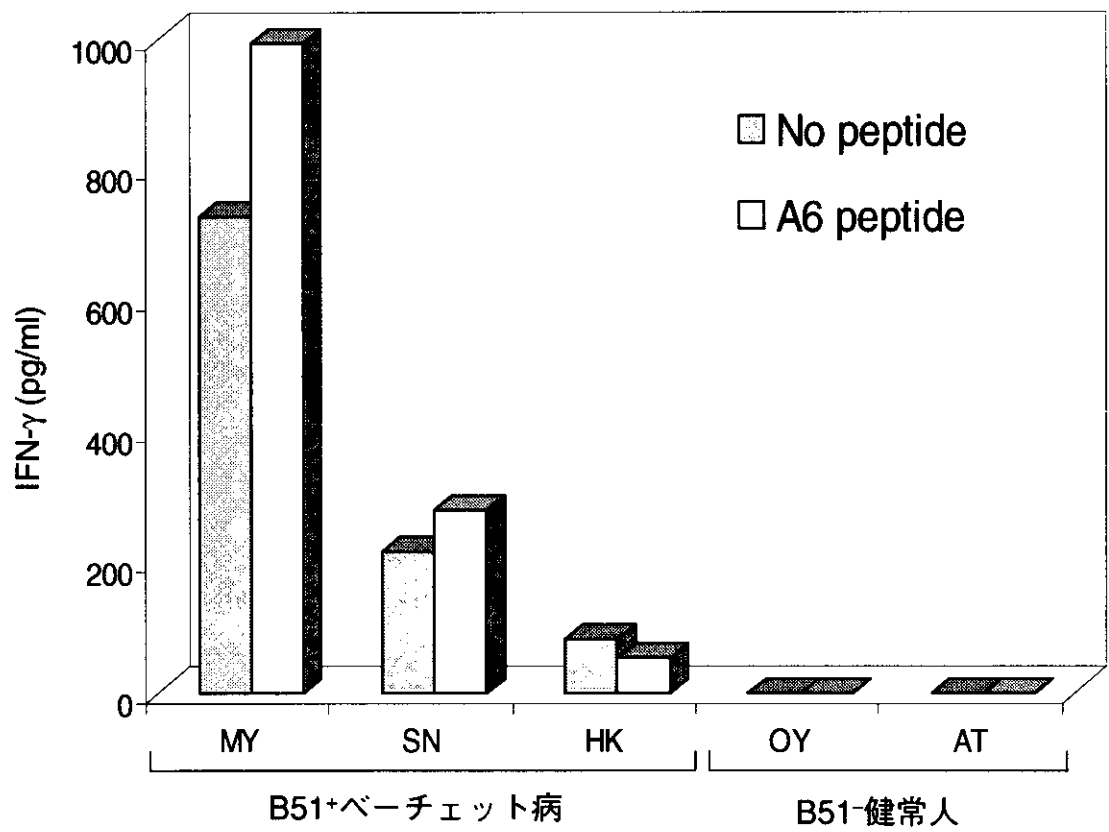


図1. A6ペプチドにより培養上清中に産生されたIFN- γ 。
 A6ペプチドで3回刺激して得られたT細胞株をA6ペプチド存在または非存在下で培養し、上清中に産生されたIFN- γ を測定した。

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 — 抗 TNF α 抗体療法前後のサイトカイン産生細胞の動態

分担研究者 石ヶ坪良明 横浜市立大学医学部内科学第一講座
萩原恵里 同上
三角緑 同上
中村聡 同眼科
大野重昭 北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野

研究要旨 我々は昨年の本研究会にて、ベーチェット病患者の末梢血において自発的サイトカイン産生細胞のバランスはTh1に傾いていることを報告した。今回、抗TNF α 抗体療法を受けた眼症状の活動性の高いベーチェット病患者を対象に、本療法の前後での末梢血サイトカイン産生細胞プロファイルサイトをサイトカインELISPOT法にて経時的に観察した。検討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種類であり、治療4週後まで経過を追った。その結果、治療前にコントロールに比して有意に増加していたIFN γ 産生細胞数は、治療により直後にはいったん減少し正常に近づく例もみられたが、4週後には全例治療前値よりも増加していた。TNF α 産生細胞数には、一定の傾向は認められなかった。また、産生量と相関するとされるスポットの総面積も同時に測定したが、産生細胞数と同一の傾向であった。今後、臨床所見との相関および長期経過の観察など、詳細な検討が必要と思われる。

A. 研究目的

ベーチェット病患者末梢血単核球 (PBMC) のサイトカイン産生バランスは、Th1に傾いていると報告されている¹⁻³⁾。昨年我々は、細胞を刺激することなく高感度に *in vivo* でのサイトカイン産生細胞を直接検出・定量するサイトカインELISPOT法⁴⁾を用いて、*in vivo*に最も近い無刺激下での患者PBMCのサイトカイン産生プロファイルを検討し、Th1優位の結果を報告した。今回これに引き続き、同様の方法を用いて、抗TNF α 療法を受けた眼症状の活動性の高いベーチェット病患者を対象に、本療法の前後での末梢血サイトカイン産生細胞プロファイルを経時的に観察し、本療法により患者末

梢血のサイトカイン産生異常がいかに修飾されるかを検討した。

B. 方法

抗TNF α 療法を受けた眼発作を繰り返す活動性の高いベーチェット患者4名に対し、同意を得て治療前から4週後まで経時的にPBMCを分離した。抗TNF α 療法のプロトコルは、別の演題で当院眼科学教室が報告した通りである。サイトカインELISPOT法は、以下の方法で行なった。すなわち、抗サイトカイン抗体をニトロセルロース96穴プレートに一晩コートし、翌日PBMCを一定の濃度でまく。18時間後細胞を洗い去り、ビオチン化抗サイトカイン2次抗体を加える。

アビジンアルカリフォスファターゼの後発色基質を加えると、サイトカインを産生した細胞のいた場所に一致して青色のスポットが現れる。乾燥の後、画像処理機能をもつZeiss社のKS ELISPOTにてスポットの個数と面積を自動測定し、 10^6 個あたりの無刺激下でのIFN γ ・TNF α サイトカイン産生細胞数を算定し、さらに産生量に比例する各スポットの大きさの分布も検討した。

C. 研究結果

抗TNF α 療法前後の患者PBMC中の無刺激下でのサイトカイン産生細胞数と各スポットの総面積をサイトカインELISPOT法にて定量した。図1はIFN γ 産生細胞スポットの数と総面積で、治療前値を1としたときの比を4症例の平均値で示した。治療開始1日後にはIFN γ 産生細胞数はやや増加する傾向を示したがその後いったんわずかに減少し、4週後には再び有意に増加していた。この傾向は総面積すなわち総産生量においても同様であった。

これを各症例別に検討したものを一部図2・3に示す。症例2(図2)では治療1日後にいったん細胞数が増加しスポットの面積も大きい方に偏位するが、その後14日後まで細胞数、スポット面積とも減少した。しかし28日後には、治療前に健常人に比して増加していたIFN γ 産生細胞はさらに前値より増加していた。症例3(図3)では、治療1日後に細胞数・スポット面積とも軽度増加し、その後有意に低下することなく28日後まで緩やかな上昇傾向を示した。

これに対しTNF α 産生細胞数は、4症例の平均値で見ると明らかな変動を示さず、治療前値に比して有意な変化はなかった(図

4)。症例別にみると、図5の症例3では治療によりTNF α 産生細胞は数、面積とも低下したが、図6の如く症例4ではいったん低下するものの28日後には前値とほぼ同値に戻っていた。IFN γ 産生細胞との有意な相関も今回の検討範囲では認めなかった。

D. 考察

ベーチェット患者PBMC中のIFN γ 産生細胞は健常人に比して増加していることが報告されている¹⁻³⁾が、抗TNF α 療法によりIFN γ 産生細胞数は最終的にさらに増加する傾向を示した。しかし、この期間に臨床像の改善は認めたものの増悪は認められず、また個々の症例で動態は異なっていることから、IFN γ 産生細胞数増加の意義については今後の検討を要する。また、本療法を受けた患者で治療終了数ヶ月後症状の再燃を認める例もあり、本療法の効果が短期的で継続投与の必要性の可能性があることからこのサイトカイン動態との関連はさらに長期的な検討を要する。また、TNF α 産生細胞は抗体により最も直接影響を受けるものと思われるが、全体としては大きな変化は認めなかった。今後さらに、サイトカイン産生細胞の動態と血清サイトカインレベルとの相関や、ベーチェット病患者で異常が指摘されているIL-12産生⁵⁾との関係、また臨床像との関連をより詳細に解析し、今回得られたサイトカイン産生細胞の動態の意義を解明したい。

E. 研究発表

学会発表: E Hagiwara, T Okubo, M Misumi, A Ueda, S Ohno, A Aoki, S Nakamura, S Ohno, Y Ishigatsubo. Altered frequency of cytokine

secreting cells in patients with Behcet's disease. American College of Rheumatology 64th National Scientific Meeting, Philadelphia November, 2000

2) Ohno, S et al. Ophthalmologica 1982; 185: 187-92

3) Sugi-Ikai, N et al. Ophthalmol. Vis. Sci. 1998; 39:996-1004

4) Hagiwara, E et al. Arthritis Rheum. 1996; 39:379-85

E. 参考文献

1) Alpsy, E et al. J. Dermatol. 1998; 25: 513-6

5) Frassanito, MA et al. Arthritis Rheum. 1999; 42:1967-7

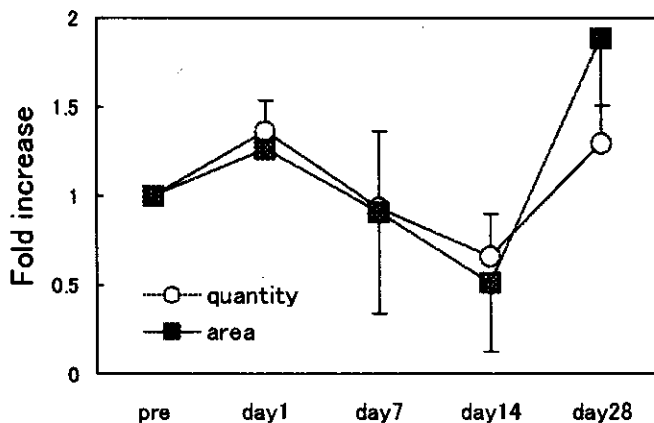


図1. IFN γ 産生細胞数とスポット総面積の変化

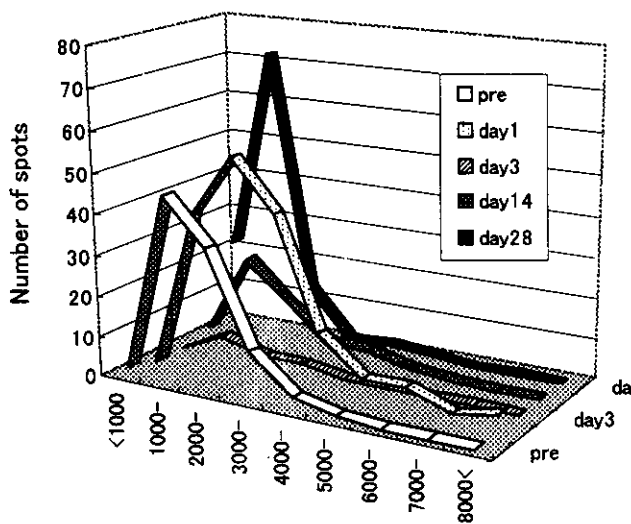


図2. 症例2のIFN γ 産生細胞プロファイルの変化

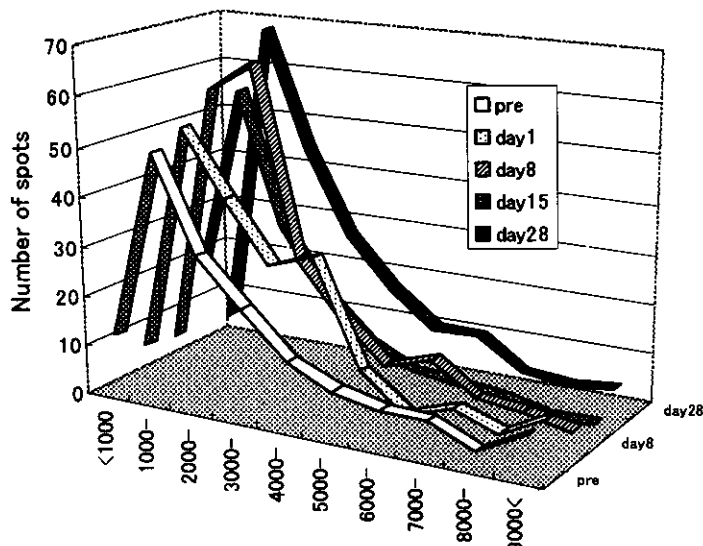


図3. 症例4のIFN γ 産生細胞プロファイルの変化

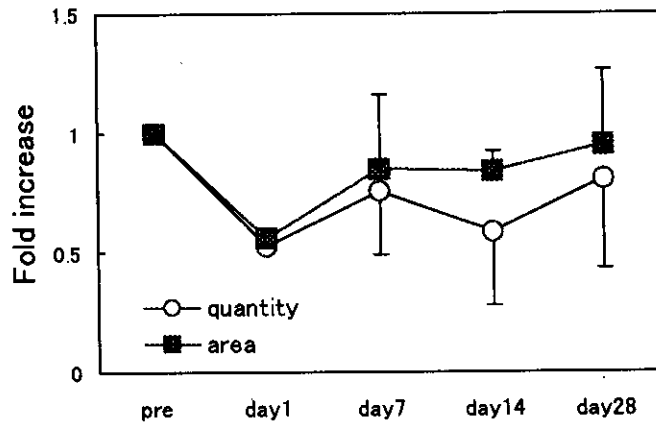


図4. TNF α 産生細胞数とスポット総面積の変化

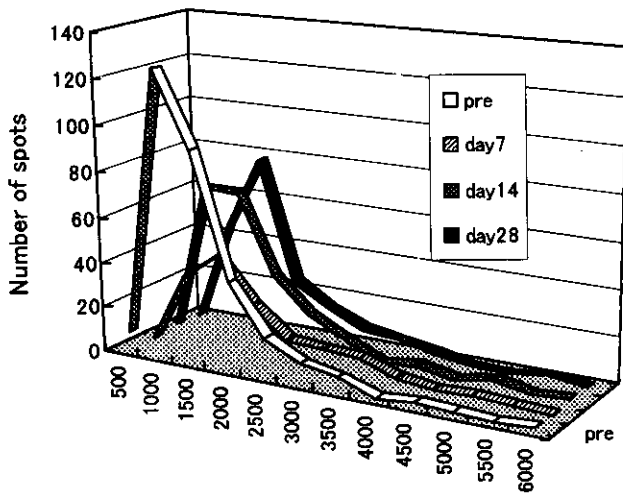


図5. 症例3のTNF α 産生細胞プロファイルの変化

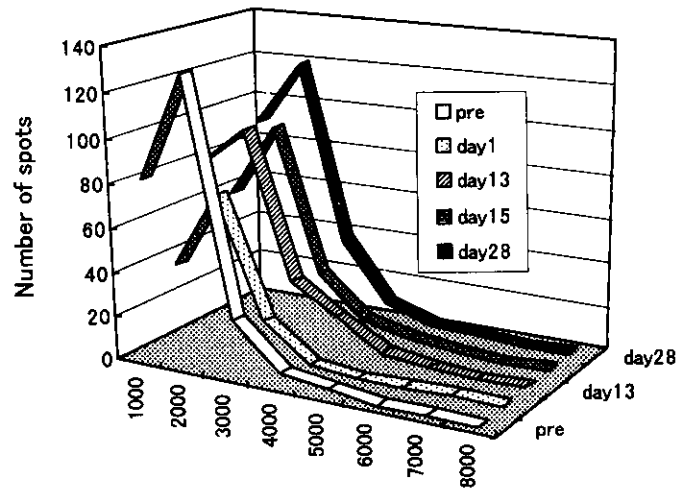


図6. 症例4のTNF α 産生細胞プロファイルの変化