

研究要旨：今回我々は、1990 年から 99 年の 10 年間に福島医大皮膚科を受診したベーチェット病 (BD) 患者 35 名についての臨床統計的観察を行った。初発および経過中における臨床症状の出現頻度は、アフタ性口内炎が最多で、病型では不全型が最多であり、いずれも全国的統計と一致する結果であった。HLA-B51 抗原の陽性率は完全型で約 70%と高く、従来の報告と同様に疾患特異性が示唆された。治療による使用薬剤は NSAIDs、抗生剤、ステロイド剤、シクロスポリンの投薬頻度が増加傾向にあった。特に、眼病変を伴う症例でのステロイドの使用頻度が増加しており、これは眼病変の寛界を得るための短期的なステロイド投与で、病勢を速やかに抑え、かつ多剤投与による副作用も回避できるという考え方に基づいていると思われた。

分担研究者：金子史男（福島医大皮膚科学教室
主任教授）

共同研究者：佐久間陽子 東條理子 尾山徳孝
佐藤正隆（福島医大皮膚科学）

A. 研究目的

過去 10 年間に当科を受診した BD 患者において、その臨床症状や病型、および治療について改めて、その推移を検討することを目的とする。

B. 研究方法

1990 年から 1999 年の 10 年間に福島医大附属病院皮膚科を受診し、本研究班の診断基準により BD、もしくはその疑いと診断された患者 35 名(男性 18 名、女性 17 名、平均年齢 38 歳)を対象とし、臨床統計学的な観察を行った。

C. 研究結果

1. 初発症状の出現率：男性で最も頻発したのはアフタ性口内炎であり、約 80%であった。女性ではアフタと外陰部潰瘍が最多で約 40%であった。
2. 経過中における各症状の出現率：初発症状と同様にアフタ性口内炎の頻度が最も高く、男女ともほぼ全例に見られた。女性の約 60%で関節症状がみられ、好発部位は大関節であった。
3. HLA タイピング：男性 8 例中 6 例、女性 4 例中 1 例で B51 が陽性。

4. 各病型の割合：不全型が全体の約半数を占めた。特殊病型として血管型 2 例、消化管型 1 例をいずれも男性に認めた。
5. 合併疾患：糖尿病、胃潰瘍、高血圧の順に多い。
6. 10 年間の症状の経緯：アフタ性口内炎、毛嚢炎、眼病変が増加傾向にある。
7. 10 年間の治療薬剤の推移：NSAIDs、抗生物質、ステロイド剤、シクロスポリンの投薬頻度が増加。

D. 考察

全体での割合に対して、完全型での HLA - B51 陽性率は約 70%と高率で、疾患特異性を認めた。

ステロイドの使用頻度が年々高くなっており、特に眼病変を伴う症例に多く使用されていた。これは、眼症状に変化が少ない症例については短期的なステロイド剤の投与で病勢を抑える事が可能であり副作用の懸念される多剤併用を行わない利点があると思われた。

E. 結論

本疾患では、男女ともにアフタ性口内炎をほぼ全例に認めた。HLA - B51 陽性率は男性で 75%、女性では 25%と性差を認めた。病型では、不全型が約半数を占めた。

図の説明

図 1. 初発症状の出現率

男性ではアフタ性口内炎 (%)、女性ではアフタと外陰部潰瘍が同程度 (%)で最多であった。男性の口腔内アフタは女性の約 2 倍の高頻度であり、優位差を認めた。

リンの投薬頻度が近年増加傾向にあった。セファランチンの使用頻度は減少していた。

図 2. 経過中における各症状の出現率

アフタ性口内炎が男女ともほぼ全例に出現した。男性では毛嚢炎、眼病変、結節性紅斑、女性では結節性紅斑、関節症状、外陰部潰瘍の順に出現率が高かった。

図 3. HLA タイピング

男性 8 例中 6 例、女性 4 例中 1 例で B51 陽性。他の疾患特異性を持つ HLA サブタイプ (ライター病や強直性脊椎炎での B27、スイト病の BW54、尋常性乾癬の CW6) の陽性例はなかった。

図 4. 各病型の割合

不全型が全体の約半数を占めた。男性の完全型は 30%であり、女性より約 10%多かった。

図 5. 合併疾患

糖尿病、胃潰瘍、高血圧が高頻度であったが、いずれも成人に頻発する疾患であり、BD に特徴的ではなかった。

図 6. 10 年間の症状の経緯

アフタ性口内炎、毛嚢炎、眼病変の出現率が増加していた。血栓性静脈炎と外陰部潰瘍は緩徐な減少傾向を示した。

図 7. 治療薬剤の推移

NSAID s、抗生物質、ステロイド剤、シクロスポ

図1. 初発症状の出現率

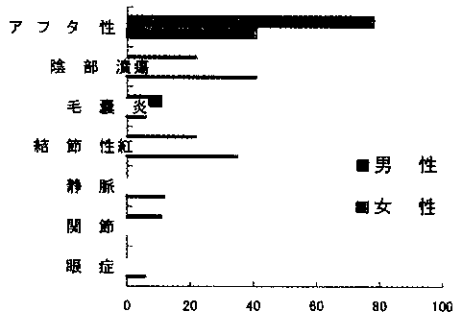


図2. 経過中における各症状の出現率

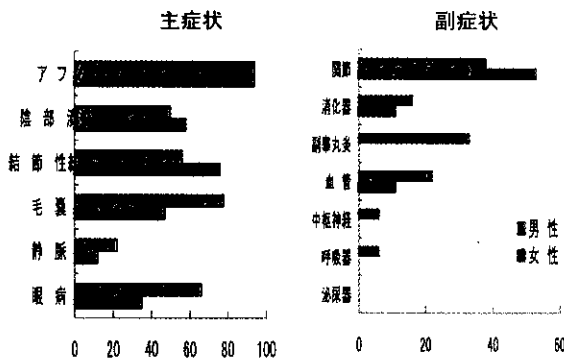


図3. HLAタイピング

	男性 (n=8)	女性 (n=4)
A2	2	2
A31	3	1
B35	1	1
B51	6	1
B62	1	1

図4. 病型別割合

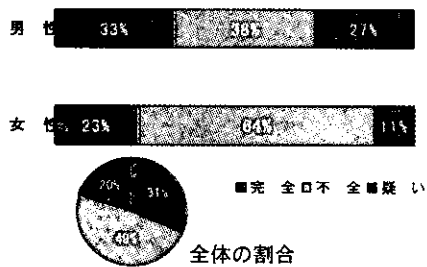


図5. 合併疾患

	男性 (人)	女性 (人)
糖尿病	3	1
胃潰瘍	1	2
高血圧	2	1
不整脈	1	1
狭心症	1	0
肺塞栓	1	0
筋症状	1	1
悪性腫瘍		
前立腺癌	1	0
白血病	0	1
精神症状	1	0
単純性疱疹	1	3

図6. 10年間の症状の経緯

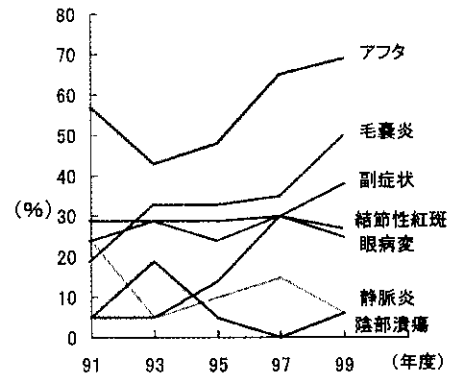
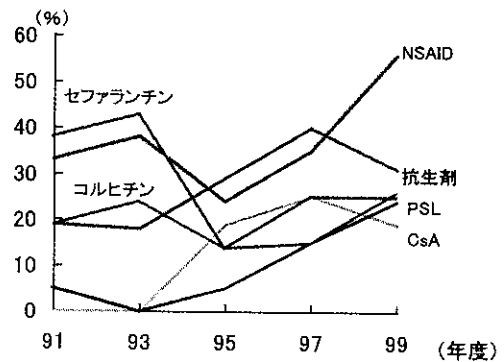


図7. 治療薬剤の推移



研究要旨：皮膚は Behcet 病の診断に重要な病変形成の場である。本症の病因については不明の域を出ないが、その病態形成に関わる外的因子として EB ウイルス・ヘルペスウイルスの感染も報告されている。我々は、結節性紅斑様皮疹を中心とした皮膚病変部におけるこれらのウイルスの発現を in situ hybridization により検討した。しかしながらこれらは病変部組織において全て陰性であり、これまでの Behcet 病の口腔・陰部及び腸管病変部における報告と異なる結果であった。さらに St. sanguis と分子相同性を示す網膜抗原ペプチドに対する抗血清を用いて免疫組織学的検討を行ったが、眼症状を有さない本症の結節性紅斑様皮疹においては全て陰性であった。Behcet 病における皮膚病変発症についてはこれらの外的因子の関与についてより詳細な検討が必要と思われた。

分担研究者：金子史男（福島医大皮膚科学教室）
共同研究者：東條理子 佐久間陽子 尾山徳孝
佐藤正隆（福島医大皮膚科学）高橋和郎（同細菌学）磯貝恵美子（北海道医療大学歯学部口腔衛生学）藤井暢弘（札幌医大微生物学）

A. 研究目的

Behcet 病の病態形成における EB ウイルス・ヘルペスウイルス、及び溶連菌関連抗原の関与についての報告は多く¹⁻⁴⁾、今回、皮膚病変部組織を用いてこれらの発現を遺伝子・免疫組織学的に検討することにより、本症の皮膚病変発症の機序を考察することを目的とする。

B. 研究方法

Behcet 病患者の皮膚病変組織（結節性紅斑様皮疹、口腔アフタ、陰部潰瘍、毛嚢炎様皮疹）を検体とし、EB ウイルス、ヘルペスウイルスについては in situ hybridization (ISH) により⁵⁾ 病変部局所におけるウイルス DNA の検出を行った。また、St. sanguis と分子相同性を示す網膜抗原ペプチド⁶⁾ に対する抗血清を用いて同組織上での抗原の存在の同定を免疫組織学的 (IHC) に行った。

C. 研究結果

ISH 及び IHC の結果は Behcet 病皮膚及び粘膜病変部組織において全て陰性であった。

D. 考察

この結果はこれまでの Behcet 病の口腔・陰部及び腸管病変部における EB ウイルス・ヘルペスウイルスの PCR および ISH による検出¹⁻²⁾ やマウスへのヘルペスウイルス接種による Behcet 病様皮膚病変形成³⁾ の報告と異なる結果であった。我々の検討結果では本症患者の皮膚病変形成においてウイルス感染の外的因子としての直接関与は示唆されなかった。また St. sanguis と分子相同性を示す網膜抗原⁶⁾ は皮膚病変部組織上同定されなかったが、これは今回対象とした Behcet 病患者が眼症状を有さない事も考慮に入れるべき陰性所見と思われた。

E. 結論

Behcet 病における皮膚病変発症についてはこれらの外的因子の関与について、遺伝子コピー数が少ない可能性もあることから、PCR も含め症例枠を拡大した、更なる検討が必要と思われた。

F. 研究発表

ベーチェット病に関する調査研究：平成 12 年度第 2 回研究会（H13.1.25、横浜）

文献

- 1) Sun A, Cgang J-G, Chu C-T, Liu B-Y, Yuan JH, Chiang C-P. Preliminary evidence for an association of Epstein-Barr virus with pre-ulcerative oral lesions in patients with recurrent aphthous ulcers or Behcet's disease. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 168-75.
- 2) Studd M, McCance DJ, Lehner T. Detection of HSV-1 DNA in patients with Behcet's syndrome and in patients with recurrent oral ulcers by polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 1991; 34: 39-43.
- 3) Sohn S, Lee E-S, Bang D, Lee S. Behcet's disease-like symptoms induced by herpes simplex virus in ICR mice. *Eur J Dermatol* 1998; 8: 21-23.
- 4) Kaneko F, Takahashi Y, Muramatsu Y, Miura Y. Immunological studies on aphthous ulcer and erythema nodosum-like eruptions in Behcet's disease. *Br J Dermatol* 1985; 113: 303-12.
- 5) Iwatsuki K, Ohtsuka M, Harada H, Kaneko F. Clinicopathologic manifestations of Epstein-Barr virus-associated cutaneous lymphoproliferative disorders. *Arch Dermatol* 1997; 133: 1156-7.
- 6) Yoshikawa K, Kotake S, Kubota T, Kimura K, Isogai E, Nobuhiro F. Cloning and sequencing of Bes-1 gene encoding the immunogenic antigen of *Streptococcus sanguis* KTH-1 isolated from the patients with Behcet's disease. *Zent bl Bakteriol* 1998; 287: 449-60.

図の説明

図 1. 皮膚生検組織における EB ウイルスの検出 (EBER in situ hybridization)

左: NK/T cell lymphoma (陽性コントロール)
中央: NK/T cell lymphoma に生じた結節性紅斑様皮疹 (陽性コントロール)
右: Behcet 病に生じた結節性紅斑様皮疹 (陰性)

図 2. EB ウイルス in situ hybridization 結果
いずれも眼症状を有さない Behcet 病患者で皮膚病変組織上全て陰性。

図 3. ヘルペスウイルス I 型・II 型 in situ hybridization 結果

いずれも眼症状を有さない Behcet 病患者で皮膚病変組織上全て陰性。

図 4. *Streptococcus Sanguis* と分子相同性を示す網膜抗原同定へのアプローチ

Behcet 病患者由来の *Streptococcus Sanguis* (KTH-1 株) から菌体 DNA を抽出し、EcoRI で切断後 λ gt11 に挿入し DNA ライブラリーを作製。これを感染させた大腸菌プレートを IPTG により蛋白発現誘導後、眼症状を有する Behcet 病患者血清を 1 次抗体としてイムノスクリーニングを行い、シークエンスにより同定された抗原蛋白を Bes-1 と命名した。

図 5. Bes-1 とヒト網膜関連抗原 Brn3b とのアミノ酸配列相同性。

Bes-1 のアミノ酸配列からヒト網膜関連抗原である Brn-3b との相同性が示され、相同性の高い 2 箇所のアミノ酸配列から 4 つのペプチドを合成し、それらの抗血清を皮膚病変部における免疫組織学的検討に供した。

図 6. Bes-1 免疫組織化学結果

いずれも眼症状を有さない Behcet 病患者で皮膚病変組織上全て陰性。

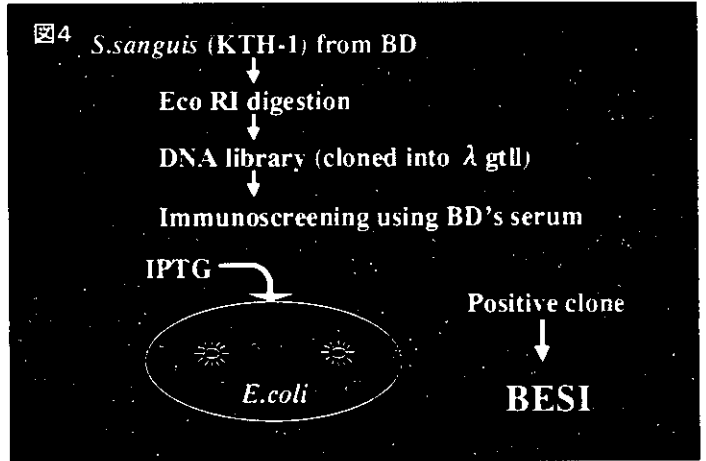
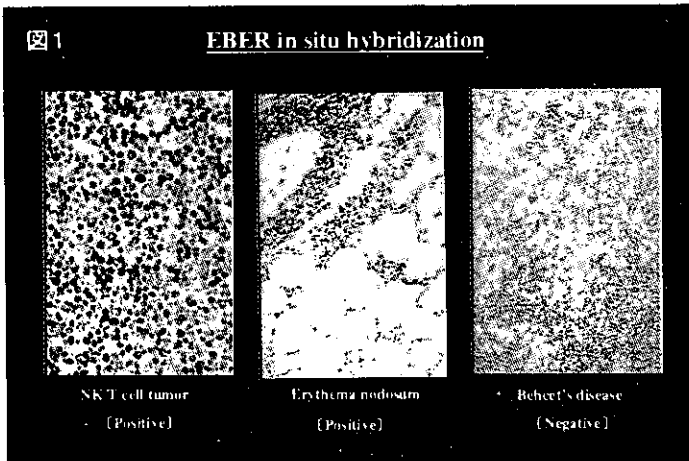


図2 EBV in situ hybridization

結節性紅斑様皮疹 4例
口腔内アフタ 1例
血栓性静脈炎 1例 (6例全例眼症状なし)

全て陰性

図5 Amino acid sequence similarity of BES-1 to Brn-3b

Identities=9/15(60%), Positives=10/15(66%)

BES-1	229	AFI VPHGGHFM PK	243
		** +**** * **	
Br n- 3b	11	AFSMPHGSLHVEPK	25

Identities=6/13(46%), Positives=7/13(53%)

BES-1	373	HGDHFFI PYDKL	385
		* ** * + *	
Br n- 3b	177	HHHHHQPHQAL	189

図3 HSV I / II in situ hybridization

結節性紅斑様皮疹 2例
口腔内アフタ 1例
血栓性静脈炎 1例 (4例全例眼症状なし)

全て陰性

図6 BES-1 immunohistochemistry

結節性紅斑様皮疹 3例
口腔内アフタ 3例
血栓性静脈炎 1例
毛囊炎様皮疹 2例
外陰部潰瘍 1例 (10例全例眼症状なし)

全て陰性

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

異なる5民族の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	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学

研究要旨 ベーチェット病は人種を越えてHLA-B51抗原と相関しており、本病発症にHLA-B51分子が直接関与する可能性が示唆されている。昨年までに私達は、日本人、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人を対象として、HLA-B*5101～B*5109の9種類のHLA-B51対立遺伝子（アリル）について、HLA-B51サブタイピングを行ってきた。現在、HLA-B51分子をコードするアリルは、HLA-B*5101～B*5121の21種類が同定されているため、今年度は、これら21種類全てのHLA-B51アリルを対象としてPCR-SBT法にてタイピングを行った。対象は、昨年行った96人の日本人患者、21人のイタリア人患者、13人のサウジアラビア人患者、昨年中途であった58人のギリシャ人患者および今回新たに収集した58人イラン人患者である。その結果、日本人、イタリア人、サウジアラビア人では、昨年と同様であった。ギリシャ人では患者群で58人中44人(75.9%)がHLA-B51抗原陽性であり、その内、34人(58.6%)がHLA-B*5101アリルで、13人(22.4%)がHLA-B*5108アリルであった。イラン人では患者群で58人中36人(62.1%)がHLA-B51抗原陽性であり、その内、33人(56.9%)がHLA-B*5101アリルで、3人(5.2%)がHLA-B*5108アリルであった。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。

A. 研究目的

ベーチェット病は人種を越えてHLA-B51抗原と相関しており、本病発症にHLA-B51分子が直接関与する可能性が示唆されている。昨年までは、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HLA-B*5101～B*5109の9個のみが同定されており、私達は日本人、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人を対象としてHLA-B51サブタイピングを行ってきた。現在、HLA-B51分子をコードする対立遺伝子（アリル）は、HLA-B*5101～B*5121の21種類が同定されている。したがって、今年度は、これら21種類のHLA-B51アリルについて、日本人、イ

タリア人、サウジアラビア人、ギリシャ人およびイラン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。

B. 研究方法

〔対象〕昨年行った日本人の本病患者96人、イタリア人の本病患者21人、サウジアラビア人の本病患者13人、昨年中途であったギリシャ人の本病患者58人および今回新たに収集した58人のイラン人患者（計246人）を対象とした。これらと比較検討するため日本人健常者132人、イタリア人健常者28人、サウジアラビア人健常者18人、ギリシャ人健常者41人およびイラン人健常者44人（計263人）を健康対照群とした。

〔HLAクラスIタイピング〕

NIH標準法の補体依存性リンパ球傷害試験により血清学的HLAクラスIタイピングを行った。イラン人では、DNAのみを提供して戴いたため、MicroSSP HLA class I Generic DNA Typing Tray (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA)を用いた遺伝子解析にてHLAクラスIタイピングを行った。

〔HLA-B51アリルタイピング〕

HLA-B51陽性となった検体については、HLA-B51アリルタイピングをPCR-SBT (polymerase chain reaction-sequence based typing) 法にて行った。HLA-B遺伝子第2, 3エクソン領域を挟むプライマー (5' primer: CCG AGG ACG GAG CCC CGG; 3' primer: CCC ACT GCC CCT GGT ACC) をデザインし、PCR法にて特異的に増幅した。このプライマーはHLA-B51アリル21個全てとHLA-B*18, B*35, B*37, B*52, B*53, B*58, B*78を特異的に増幅する。PCR産物をMicron 100 (Millipore, MA)にて精製後、ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing kit (PE Biosystems)

と蛍光自動シーケンサーを用いたcycle-sequencing法にてその全塩基配列を決定することにより、HLA-Bアリルタイピングを行った。シーケンシングプライマーはPCRプライマーと同一でした。

（倫理面への配慮）

各民族の本病患者および健常者1人1人に対し、本研究の主旨を説明し、遺伝子解析を行うことに対する同意を得た上で採血を行った。得られたデータに関しては他へ漏れないように厳重に管理している。

C. 研究結果

〔血清学的HLAタイピング〕

表1に示すように、HLA-B51抗原頻度は、これら5民族において患者群で有意に上昇していた。ギリシャ人では患者群で75.9%、対照群で22.0% (Pc値=0.0000029, RR=11.2) と患者群で顕著に上昇していた。イラン人ではHLA-B51抗原は患者群で62.1%と高頻度であったが、対照群においても多く (31.8%) 存在していたため、患者群とB51抗原との相関はやや弱かった (Pc値=0.067, RR=3.5)。

〔HLA-B51アリルタイピング〕

今回、21種類のHLA-B51アリルを対象に遺伝子タイピングを行ったが、これら5民族でHLA-B*5110~B*5121アリルは、一例も検出されなかった。したがって、日本人、イタリア人、サウジアラビア人では、HLA-B51アリル頻度（分布）は、昨年の結果と同じであった。

ギリシャ人患者群では58人中44人 (75.9%) がHLA-B51抗原陽性であったが、その内、34人 (58.6%) がHLA-B*5101アリルで、13人 (22.4%) がHLA-B*5108アリルであった。HLA-B51陽性患者の内3

人は、HLA-B*5101とHLA-B*5108アレルの両方を持つヘテロ接合体であった。一方、対照群では41人中9人(22.0%)がHLA-B51抗原陽性であったが、9人すべてがHLA-B*5101アレルであり、HLA-B*5108アレルは一例も認めなかった。したがって、HLA-B*5101、HLA-B*5108アレルともに、患者群では対照群に比して有意に増加していた (HLA-B*5101 : $P_c=0.0075$, R.R.=5.0 ; HLA-B*5108 : $P_c=0.030$, R.R.=24.6) (表2)。

次に、HLA-B51陽性者で両群を再集計すると、HLA-B51陽性者におけるHLA-B*5101アレル頻度は、患者群では77.3%(34/44)であり、対照群では100%(9/9)であった。一方、HLA-B51陽性者におけるB*5108アレル頻度は、患者群では29.5%(13/44)であり、対照群では0%(0/9)であった。今回の解析では、HLA-B51陽性対照群が9人と少なかったため、信頼性の高い統計学的解析とは言えないが、HLA-B51アレル(サブタイプ)分布では、HLA-B*5108アレルが患者群ではやや有意に増加し、逆にHLA-B*5101アレルがやや有意に減少していたことになった (HLA-B*5101 : $P_c=0.22$, R.R.=0.17 ; HLA-B*5108 : $P_c=0.12$, R.R.=8.1) (表3)。

イラン人患者群では58人中36人(62.1%)がHLA-B51抗原陽性であったが、その内、33人(56.9%)がHLA-B*5101アレルで、残りの3人(5.2%)がHLA-B*5108アレルであった。一方、対照群では44人中14人(31.8%)がHLA-B51抗原陽性であったが、13人(29.5%)がHLA-B*5101アレルで、1人(2.3%)がHLA-B*5108アレルであった。したがって、HLA-B*5101、アレルは、患者群で対照群に比してやや有意に増加していた ($P_c=0.17$, R.R.=3.2) が、HLA-B*5108アレル頻度では両群間に有意差はなかった (表4)。

イラン人においても同様に、HLA-B51陽性者で両群の再集計を試みた。これまでの解析では、各民族においてHLA-B51陽性対照群の人数が少ないため、統計学的解析の信頼性が低いことが想定されたため、イラン人では新たにHLA-B51陽性対照群を7人増やして(計21人)再集計した(表5)。その結果、HLA-B51陽性者におけるHLA-B*5101アレル頻度は、患者群では91.7%(33/36)であり、対照群では90.5%(19/21)であった。一方、HLA-B51陽性者におけるB*5108アレル頻度は、患者群では8.3%(3/36)であり、対照群では4.8%(1/21)であった。したがって、イラン人ではHLA-B51アレル(サブタイプ)分布において、両群間に有意差はなかった。また、HLA-B51陽性対照群の人数を増やしたことにより、対照群において、HLA-B*5102アレル陽性者が1人(1/21)(4.8%)認められた。

D. 考察

昨年に引き続き、HLAクラスIタイピングおよびHLA-B51抗原サブタイピングを異なる5民族を対象として行った。その結果、日本人、イタリア人、サウジアラビア人、ギリシャ人、イラン人において、本病患者群でHLA-B51抗原頻度が顕著に上昇していた。これらの結果は、過去の報告とほぼ一致しており、本病が人種を越えてHLA-B51抗原と相関していることが再確認された。イラン人では、今まで血清学的にHLA-B5との相関が報告されているにすぎなかったが、今回HLA遺伝子タイピングを行ったことにより、イラン人においても他の民族と同様に、HLA-B5のスプリット抗原であるHLA-B51抗原との相関が存在することが明らかとなった。

HLA-B51サブタイピングでは、現在

認められている21種類 (HLA-B*5101～B*5121) 全てのHLA-B51アレルを対象として行った。今回、アレル数を拡大して検索したが、これら5民族でHLA-B*5110～B*5121アレルは、一例も認められなかった。表6にこれら5民族のHLA-B51サブタイピングの結果をまとめてみた。日本人のHLA-B51抗原は、ほとんどHLA-B*5101アレルにコードされており、HLA-B*5102が一例認められるものの、HLA-B*5108は一例も認められなかった。したがって、日本人の本病患者群におけるHLA-B51抗原頻度の顕著な上昇は、HLA-B*5101アレルの顕著な増加によるものであるといえる。一方、ギリシャ人、イラン人、イタリア人、サウジアラビア人では、HLA-B*5101アレルが最も高頻度に認められたが、HLA-B*5108も5～20%程度認められ、本病患者群におけるHLA-B51抗原頻度の顕著な上昇は、HLA-B*5101アレルの増加によるものばかりでなく、HLA-B*5108アレルの増加によるものも一部あると考えられた。

B51陽性者のみで集計して、HLA-B51アレル頻度を比較すると、日本人、イタリア人、サウジアラビア人共に、患者群と対照群で有意差を認めるものはなかった。今回新たに解析したイラン人においても、B51アレル (サブタイプ) 分布に有意差は認められなかった。しかしながら、ギリシャ人では患者群でB51陽性患者44人中、34人(77.3%)がB*5101アレルであったが、B*5108アレルも13人(29.5%)認められた。対照群ではB51陽性者が9人しかいないため、統計学的な信頼性は高くないものの、全員がB*5101アレルであり、サブタイプ分布に軽度ながら有意差が認められた。すなわち、ギリシャ人では、患者群ではB*5108アレル頻度が軽度有意に上昇し、逆にB*5101アレルが軽度有意に低

下していた。今後さらに、HLA-B51陽性健常者の数を増やして解析する必要があると考えられた。

今までのデータにおいて、このように、無作為に健常集団を選出して解析すると、対照群におけるHLA-B51陽性者は自ずと少なくなり、B51陽性者内でのB*51アレル (サブタイプ) 分布は、統計学的に信頼性の高い有意差検定とは言えないところがあった。したがって、イラン人では故意にB51陽性健常者を増やして、B*51サブタイプの分布を再計算してみた。

その結果、イラン人対照群ではB51陽性者が21人となり、その内19人(90.5%)がB*5101アレルで、B*5102アレルとB*5108アレルがそれぞれ1人ずつ(4.8%)認められた。したがって、B51陽性健常者を増やして、比較的信頼性の高い統計学的有意差検定を行ってみても、やはりイラン人において、両群間でB*51サブタイプ分布に有意差は認められなかった。

また、興味深いことに、イラン人では、HLA-B*5102アレルを有する健常者が1人認められ、日本人におけるHLA-B*5102アレル頻度と似ていた。一方、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人では、全ての患者群および対照群でHLA-B*5102アレルは1人も認められなかった。したがって、イラン人ではHLA-B*5108、HLA-B*5102アレル共に認められ、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人(HLA-B*5108)と日本人(HLA-B*5102)のどちらの遺伝的要素も保持している中間的位置に存在する民族であると推測された。

E. 結論

日本人のB51抗原は、ほとんどがB*5101アレルにコードされ、本病患者群におけるB51抗原頻度の顕著な上昇は、

B*5101アレルの顕著な増加によるものであったが、ギリシャ人、イタリア人、サウジアラビア人、イラン人の本病患者群におけるB51抗原頻度の顕著な上昇は、B*5101アレルの増加によるものばかりでなく、B*5108アレルの増加によるものも一部あった。B51陽性者における各B*51アレル頻度（サブタイプ分布）では、ギリシャ人で軽度に有意差が認められたものの、その他の民族では患者群、対照群間に有意差は認められなかった。したがって、各民族間における本病と相関するHLA-B*51アレルの相違は、各民族におけるB*51アレル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。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Ando H, Yabuki K, Goto k, Palimeris G, Kaklamani E, Pivetti-Pezzi P, Ohno S, Inoko H: Localization of the pathogenic gene of Behçet's disease onto the HLA-B locus by investigation of microsatellite polymorphism in three different populations. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 41: 3702-3708, 2000.
- 2) Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Mizuki N, Seki SS, Honma T, Inoko H, Asakura H: A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 57: 9-14, 2001.

- 3) Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Tsuchiya K, Kondo M, Naruse T, Mizuki N, Itoh K, 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* 71: 263-270, 2001.
- 4) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Nomura E, Ohno S, Inoko H: HLA-B*51 allele analysis by the PCR-SBT method and a strong association of HLA-B*5101 with Japanese patients with Behçet's disease. *Tissue Antigens*, in press.
- 5) Mizuki N, Yabuki K, Ota M, Verity D, Katsuyama Y, Ando H, Goto K, Nomura E, Imagawa Y, Madanat W, Fayyad F, Stanford M, Ohno S, Inoko H: Microsatellite mapping of a susceptibility locus within the HLA region for Behçet's disease using Jordanian patients. *Hum Immunol*, in press.
- 6) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Nikbin B, Davatchi F, Chams H, Ghaderi AA, Ohno S, Inoko H: HLA class I genotyping including HLA-B*51 allele typing in the Iranian patients with Behçet's disease. *Tissue Antigens*, in press.

2. 学会発表

- 1) 矢吹和朗、後藤香織、水木信久、野村英一、大野重昭、太田正穂、勝山善彦、猪子英俊、WP Maksymowych: HLA-B遺伝子近傍のマイクロサテライトを用いた急性前部ぶどう膜炎患者の多型性解析。日本眼科学会雑誌。第104巻(臨増)。p197, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

(表1) HLA-B51抗原頻度

	対照群	患者群	Pc値	相対危険率
日本人	13.6% (18/132)	59.4% (57/96)	0.0000000000098	9.3
イタリア人	17.9% (5/28)	71.4% (15/21)	0.0042	11.5
サウジアラビア人	22.2% (4/18)	76.9% (10/13)	0.10	11.7
ギリシャ人	22.0% (9/41)	75.9% (44/58)	0.0000029	11.2
イラン人	31.8% (14/44)	62.1% (36/58)	0.067	3.5

(表2) ギリシャ人のHLA-B*51アレル頻度

HLA	対照群 (N=41)	患者群 (N=58)	Pc値	相対危険率
HLA-B51	9 [22.0%]	44 [75.9%]	0.0000029	11.2
HLA-B*5101	9 [22.0%]	34 [58.6%]	0.0075	5.0
HLA-B*5102	0 [0 %]	0 [1.0%]		
HLA-B*5103	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5104	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5105	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5106	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5107	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5108	0 [0 %]	13 [22.4%]	0.030	24.6
HLA-B*5109 ~B*5121	0 [0 %]	0 [0 %]		

(表3) ギリシャ人のHLA-B51陽性者におけるHLA-B*51アレル頻度

HLA	対照群 (N=9)	患者群 (N=44)	Pc値	相対危険率
HLA-B*5101	9 [100%]	34 [77.3%]	0.22	0.17
HLA-B*5102	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5103	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5104	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5105	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5106	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5107	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5108	0 [0 %]	13 [29.5%]	0.12	8.1
HLA-B*5109 ~B*5121	0 [0 %]	0 [0 %]		

(表4) イラン人のHLA-B*51アレル頻度

HLA	対照群 (N=44)	患者群 (N=58)	Pc値	相対危険率
HLA-B51	14 [31.8%]	36 [62.1%]	0.067	3.5
HLA-B*5101	13 [29.5%]	33 [56.9%]	0.17	3.2
HLA-B*5102	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5103	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5104	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5105	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5106	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5107	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5108	1 [2.3%]	3 [5.2%]	N.S.	N.S.
HLA-B*5109 ~B*5121	0 [0 %]	0 [0 %]		

(表5) イラン人のHLA-B51陽性者におけるHLA-B*51アレル頻度

HLA	対照群 (N=21)	患者群 (N=36)	Pc値	相対危険率
HLA-B*5101	19 [90.5%]	33 [91.7%]	N.S.	N.S.
HLA-B*5102	1 [4.8%]	0 [0 %]	N.S.	N.S.
HLA-B*5103	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5104	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5105	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5106	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5107	0 [0 %]	0 [0 %]		
HLA-B*5108	1 [4.8%]	3 [8.3%]	N.S.	N.S.
HLA-B*5109 ~B*5121	0 [0 %]	0 [0 %]		

(表6) 5民族患者群のHLA-B*51アレル頻度のまとめ

HLA	日本人 (N=96)	ギリシャ人 (N=58)	イラン人 (N=58)	イタリア人 (N=21)	サウジアラビア人 (N=13)
HLA-B51	57 [59.4%]	44 [75.9%]	36 [62.1%]	15 [71.4%]	10 [76.9%]
HLA-B*5101	56 [58.3%]	34 [58.6%]	33 [56.9%]	11 [52.4%]	9 [69.2%]
HLA-B*5102	1 [1.0%]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]
HLA-B*5103	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]
HLA-B*5104	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]
HLA-B*5105	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]
HLA-B*5106	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]
HLA-B*5107	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]
HLA-B*5108	0 [0 %]	13 [22.4%]	3 [5.2%]	4 [19.0%]	1 [7.7%]
HLA-B*5109 ~B*5121	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]

ベーチェット病による難治性ぶどう膜炎のあたらしい治療に関する研究
分担研究者 中村聡 横浜市立大学医学部 講師

研究要旨

ベーチェット病の眼症状である網膜ぶどう膜炎発作は繰り返すと黄斑変性、網脈絡膜萎縮、視神経萎縮などを起こして失明する患者も多い。このぶどう膜炎の活動性とTNF-alpha産生能が相関を有することが明らかになり、あたらしい治療法として抗TNF-alpha抗体の使用が注目されている。今回行われた前期II相臨床試験ではぶどう膜炎の発作は投与により軽快し、霧視などの眼科的自覚症状、あるいは口内炎などの全身症状も著しく改善した。今後効果の持続、長期投与時の副作用の問題など今後慎重に検討していく必要があると考えられるが、従来の治療が奏効しない重症例への効果が期待される。

A.研究目的

ベーチェット病は口腔粘膜のアフタ性潰瘍、外陰部潰瘍、眼症状、皮膚症状の4つを主症状とし、神経、腸管、血管などに多彩な急性炎症を反復しつつ慢性の経過をたどる難治性疾患である。眼症状は約70%にみられ、虹彩毛様体炎型と網膜ぶどう膜炎型に大別され、後者の割合が多い。90%の症例は両眼性である。典型的には慢性の炎症に加えて発作性に炎症の増悪があり、2-3週間で徐々に軽快する。網膜ぶどう膜炎型発作の際には眼底に血管炎による出血、虚血性変化とリンパ球浸潤による白色滲出斑がみられる。後述する治療が奏効せずこの発作を繰り返すと黄斑変性、網脈絡膜萎縮、視神経萎縮などを起こして失明する患者も多い。

虹彩毛様体炎型のぶどう膜炎は主にステロイド点眼薬で治療する。網膜ぶどう膜炎型の重症患者には局所治療に加えて内服治療薬としてコルヒチン、ステロイド、シクロスポリンなどが用いられている。コルヒチンは多核白血球遊走阻止作用によりぶどう膜炎発作の頻度を下げる効果があり一部の患者には有効だが、効かない例も多い。ステロイド薬の内服は発作時に短期間用いるには有用だが、ベーチェット病の活動性は数年から数十年にわたるため、長期間投与によるさまざまな副作用が出現する。また日本では長期投与により視力予後がかえって悪化するという報告もある。免疫抑制薬であるシクロスポリンは網膜ぶどう膜炎を有するベーチェット病について健康保険による処方認められ、コルヒチンやステロイドによる治療がうまくいかない症例に用いられている。しかし現状ではシクロスポリンを使っても炎症を沈静化できない症例が尙少なからずある。

ベーチェット病の炎症局所には好中球が集合して活性酸素を産生し組織傷害を起こすことから、以前は好中球の異常が原因で起こると考えられていた。しかし最近ではT細胞の活性化が先立つことがわかり、主としてIL-2産生を抑制するシクロスポリンが治療に用いられ、有効性が確認されている。しかしこのシクロスポリン治療によってもぶどう膜炎の活動性を抑制できない症例が存在する。ベーチェット病におけるTNF-alphaの関与については1990年Akoglu¹⁾、Hamzaoui²⁾らが報告して以来、いくつかの研究がなされてきた。疾患の活動性とTNF-alphaの相関については、活動性の解釈により見解が分かれ、Sayinalp³⁾は主症状の発現数で分けて違いがみられなかったと報告している。我々はぶどう膜炎の活動性で分けて解析し、活動性ぶどう膜炎を有する患者のTNF-alpha産生能は、非活動性ぶどう膜炎を有する患者や正常対照と比べて有意に亢進していたと報告した⁴⁾。少なくとも眼症状の活動性とTNF-alphaは相関を有するものと考えられる。

一方ヒトのぶどう膜炎のモデルである自己免疫性網膜ぶどう膜炎(EAU)でも、ぶどう膜炎の重症化にはTNF-alpha産生能の違いが関与すること⁵⁾、また通常ラットのモデルでは網膜由来抗原による免疫後10日頃より炎症が出現するが、この発症に一致してTNF-alphaの上昇がみられることが明らかになった⁶⁾。これらの結果からぶどう膜炎にたいする抗TNF-alpha抗体の有効性が期待されたため、ラットのぶどう膜炎モデルに抗体を免疫7日後より14日まで連続投与し、治療実験を行った。その結果炎症の発症時期に抗TNF-alpha抗体を投与することでぶどう膜炎の明らかな軽減がみられた⁶⁾。

このようなヒト、および動物モデルの研究結果より、ぶどう膜炎の活動性が高くTNF-alpha産生の亢進しているベーチェット病の治療に抗TNF-alpha抗体が有用である可能性が想定された。

B.研究方法

使用した抗体はヒト-マウスキメラ型モノクローナル抗体infliximabである。これはRemicadeの名

でセントコア社から発売されているが、これまでに慢性関節リウマチやクローン病の治療に用いられ、良好な効果を有することが報告されている7), 8).

今回おこなった前期II相臨床試験では網膜ぶどう膜炎を有するベーチェット病患者でシクロスポリン治療の効果が不十分、あるいは副作用により投与が不可能になった症例を対象とした。投与量は1回あたり5mg/kgもしくは10mg/kgの2用量を0週、2週、6週、10週の4回点滴静注し、臨床症状により判定する有効性と副作用について図1に示すスケジュールで検討した。導入の条件として同意取得日から遡って14週間の遡及期間の眼発作回数と同意取得後14週以内の観察期間の眼発作回数の合計が3回以上ある例とされているが、当施設でこの条件に合致し導入された症例は4例で、全例5mg/kgが割りつけられた。

また治験期間中、投与前、投与後1週、4週の時点で末梢血よりリンパ球を分離しTNF-alpha, ILFN-gamma, L-4のサイトカインmRNAおよびapoptosis関連酵素(システインプロテアーゼ)であるCaspase8の測定、細胞内サイトカイン染色によるTh1(IFN-gamma)/Th2(IL-4)比の解析をおこなった。

倫理面への配慮

治験の計画段階で横浜市大医学部倫理委員会に当該薬物投与の可否につき審査を受けて承認された。また実際の治験にあたっては説明文書を用いた上で文書による同意を得ている。

C. 研究結果

ぶどう膜炎の発作は投与開始後に軽快し、霧視などの眼科的自覚症状、あるいは口内炎などの全身症状も著しく改善した。ぶどう膜炎の発作回数については、遡及期間、観察期間および投与開始後14週間について表1に示す。一方副作用については投与を中止する必要のあった重篤な例はなかったが、抗核抗体、抗ds-DNA抗体の上昇がみられた(図2)。また、この前期II相臨床試験後全例ぶどう膜炎の発作を再発するようになった。

サイトカイン等の測定結果は現在解析中である。

D. 考察

現在他施設の結果とともに詳細を解析中であるが本薬物のベーチェット病のぶどう膜炎に対する有効性は強く期待できる。しかしぶどう膜炎の炎症を抑えるだけでなく、抗核抗体の上昇など、免疫系に与える影響の広がりについては十分確認されていない。このため今後の注意深い経過観察が必要と思われる。

また本抗体の効果は2か月程度持続し、その後炎症病態は再活性化するものと考えられる。薬物の体内の半減期は日本におけるクローン病第II相試験の結果から151-246時間とされている(田辺製薬社内資料)。しかし炎症の抑制効果はこの期間を越えてみられたことから本病の炎症病態の形成は単一のサイトカイン、あるいは特定の細胞によるものではなく、複数のサイトカインや免疫応答細胞による相互作用と増強効果の結果と思われるものの、TNF-alphaがその中心に近い役割を担っているものと推測される。

E. 結論

ベーチェット病は多くは青壮年に発症し、頻発するぶどう膜炎発作により失明に至ることの多い難治性疾患である。今回我々の使用した抗TNF-alpha抗体は効果の持続、長期投与時の副作用の問題など今後慎重に検討していく必要があると考えられるが、従来の治療が奏効しない重症例への効果が期待される。

引用文献

- 1) Akoglu, T.F. et al.: TNF, soluble IL-2R and soluble CD-8 in Behcet's disease [letter]. J Rheumatol 17:1107-8, 1990
- 2) Hamzaoui, K. et al.: Production of TNF-alpha and IL-1 in active Behcet's disease [letter]. J Rheumatol 17:1428-9, 1990
- 3) Sayinalp, N. et al.: Cytokines in Behcet's disease. J Rheumatol 23:321-2, 1996
- 4) 中村聡, 他: ベーチェット病患者における末梢血単球の in vitro tumor necrosis factor-alpha 産生能. 日本眼科学会雑誌 96:1282-5, 1992
- 5) Nakamura, S. et al.: The role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 35:3884-9, 1994

- 6)中村聡: ぶどう膜炎の細胞生物学.日本眼科学会雑誌 101:975-986, 1997
7)Elliott, M.J. et al.: Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis.Lancet 344:1125-7, 1994
8)Present, D.H. et al.: Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease.N Engl J Med 340:1398-405, 1999

F.研究発表

1.論文発表

Shao H, Woon MD, Nakamura S, Sohn JH, Morton PA, Arbuckle JA, Bora NS, Kaplan HJ: CTLA4+ FC inhibits the induction and severity of experimental acute anterior uveitis (EAAU). Invest Ophthalmol Vis Sci 2000, 41: s107.

総説

中村 聡：ぶどう膜炎の新しい病因と治療（ベーチェット病）. Ophthalmology Times JAPAN 2000, 3 : 60-61.

中村 聡：交感性眼炎の早期発見と処置. 臨眼（臨増）2000, 54 : 311-313.

著書

中村聡：難治性ぶどう膜炎・難治白内障手術のレスキュー（ベーチェット病）. 大野重昭編. メジカルビュー社 東京 70-71, 2001

2.学会発表

Nakamura S, Ohno S: The effect of anti-TNF-alpha monoclonal antibodies in Behcet's disease. 6th International Symposium on Ocular Inflammation Symposium. 2000/6/21 Istanbul, Turkey

中村 聡：サイトカインからみたEAU. 第34回日本眼炎症学会 シンポジウム「実験的ぶどう膜炎 (EAU)の現状と将来」 2000/7/8 金沢

G.知的所有権の取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

評価期間

	0	3d	1w	2w	4w	6w	8w	10w	12w	14w	22w	26w
治療投与	●			●		●		●				
眼症状検査	●	●		●	●	●	●	●	●	●		
一般臨床検査	●			●		●		●		●		●
血中濃度	●	●	●	●		●		●	●	●	●	●
抗核抗体・ 抗ds-DNA抗体	●					●				●		●

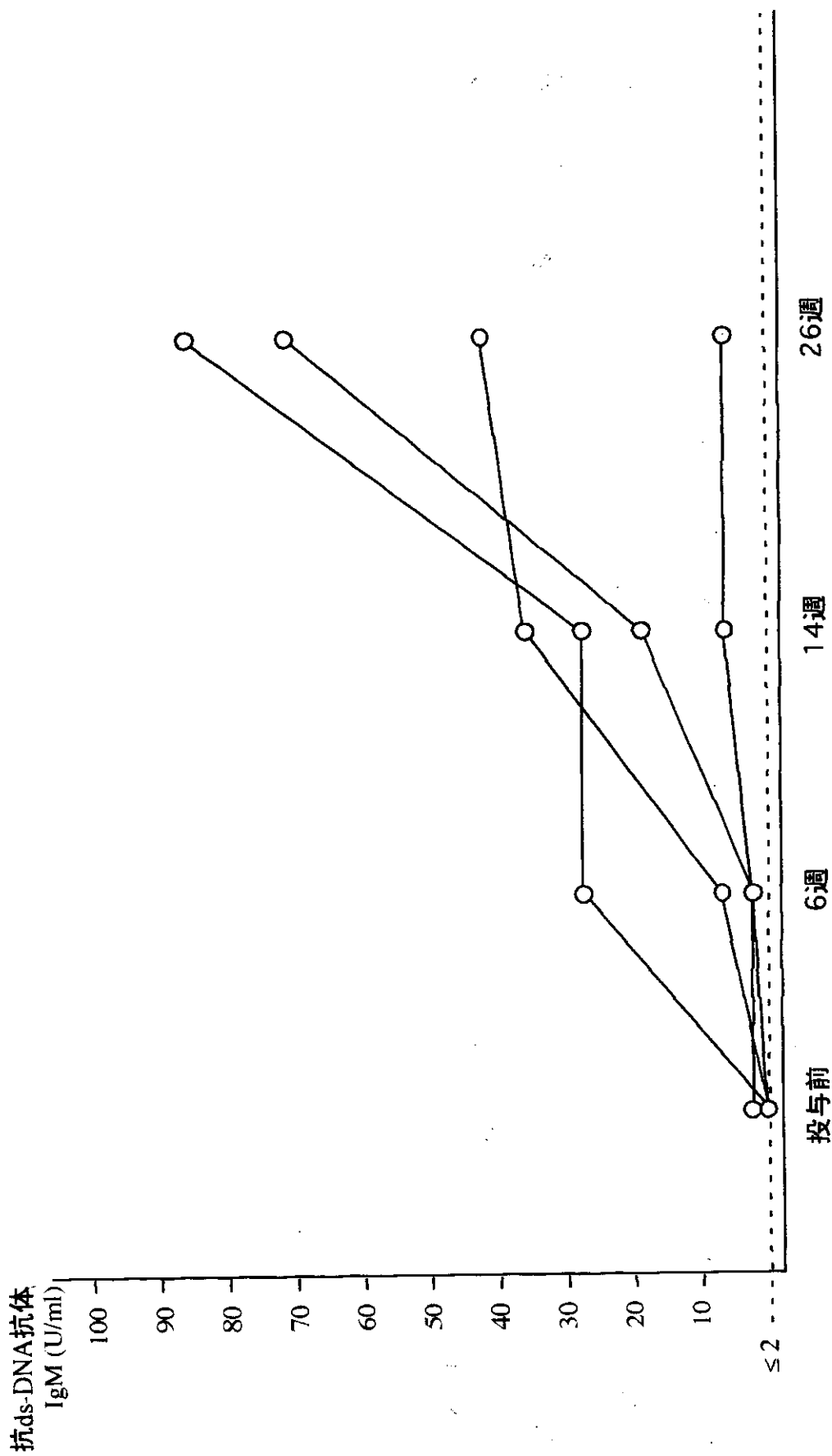


図1 臨床試験スケジュール

図2 抗TNF-alpha抗体投与中の抗ds-DNA抗体価

表1 ぶどう膜炎の発作回数

症例	週及期間*	観察期間	(週数)	評価期間*
1	3	1	(8)	0
2	3	3	(12)	0
3	3	3	(5)	0
4	2	1	(4)	1

* : 回/14週