

ベーチェット病におけるT細胞遊走性ケモカインの関与

| | | |
|-------|-------|---------------|
| 分担研究者 | 藤野雄次郎 | 東京厚生年金病院眼科 |
| | 蕪城俊克 | 東京大学医学部眼科 |
| | 吉田 淳 | 東京大学医学部眼科 |
| | 成見正作 | 東京大学医学部分子予防医学 |
| | 沼賀二郎 | 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 ベーチェット病の活動期には、末梢血中にhelper type-1 T細胞(Th1)細胞が優位になる事が報告されている。一方、血管内から血管外への白血球の遊走に様々なケモカインが関与する事が知られている。ベーチェット病におけるT細胞遊走性ケモカインの関与を明らかにする事を目的として、ベーチェット病患者の血漿中のT細胞遊走性ケモカイン濃度を測定した。眼炎症の活動性を有するベーチェット病患者19例(男性14例、女性5例、年齢 41.9 ± 10.9 才)、健常人15例(男性13例、女性2例、年齢 38.9 ± 9.0 才)から末梢血を採取した。ベーチェット病患者では、活動期(眼発作後1週間以内、眼以外の全身症状あり)と緩解期(最後の眼発作後1ヶ月以上経過、眼以外の全身症状1つ以下)の2つの時点で採血した。血漿中のT細胞遊走性ケモカイン(IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TARC)濃度をsandwich ELISA法で検討した。MIP-1 α は全ての症例で測定限界以下であった。IP-10は、活動期ベーチェット患者において、健常人のそれより有意に高値であった($p=0.024$, Mann-Whitney's U test)。MIP-1 β , RANTES, TARCは、有意差を認めなかった。同一のベーチェット患者での活動期と緩解期での比較では、活動期にIP-10, RANTESが有意に上昇していた($p=0.0157$ 及び $p=0.018$, Wilcoxon's signed-rank test)。ベーチェット病の病態にIP-10が関与している可能性がある。

A. 研究目的

ベーチェット病の眼炎症発作の原因として、末梢血リンパ球が産生するIFN γ やTNF α などの炎症性サイトカインが重要な働きをしている可能性が考えられている。特にType-1 helper T cell(Th1)細胞が産生するとされるIFN γ については、末梢血リンパ球のIFN γ 産生が眼炎症発作時に高くなる事が報告されている^{1,2)}。また、ベーチェット病患者の皮膚病変部にはメモリーT細胞(CD4+,

CD45RO+T細胞)浸潤が優位に見られる事³⁾などから、ベーチェット病の増悪には、メモリーT細胞、特にTh1細胞の炎症局所への浸潤が重要である可能性が示唆されている。一方、白血球が血管内から炎症局所へ遊走する際、ケモカインと総称される白血球遊走・活性化因子が重要な働きをしている事が明らかとなっている⁴⁾。このケモカインに対する受容体には、CC chemokine receptor (CCR)

1-5などが知られているが、白血球のサブタイプによって発現するケモカイン受容体が異なるという特徴がある。特にヘルパーT細胞は分化に従い、発現するケモカイン受容体に変化する。すなわち、未分化なnaiveT細胞の段階では、発現するケモカイン受容体はCXCR4、CCR7が多いのに対し、IL-12やIFN γ によってTh1細胞に分化誘導されると、ケモカイン受容体CXCR3、CCR5を特異的に発現し、またIL-4によってTh2細胞に分化するとCCR4を特異的に発現する⁵⁾。このケモカイン受容体のサブセットの違いが、末梢血中の多様な白血球を炎症局所への選択的に遊走させる際に重要な意味を持つと考えられる。

我々は、ベーチェット病患者の眼炎症の活動期において、末梢血中にCXCR3やCCR5受容体を発現したTh1細胞(CD4+, CD45RO+ memory T細胞)が増加する事を明らかにした⁶⁾。この結果は、ベーチェット病の活動期に末梢血中でTh1細胞の割合の増加する事を支持すると同時に、これらのケモカイン受容体がベーチェット病の活動性に関与している可能性も示唆する。一方、Th1細胞が発現するCXCR3、CCR5受容体に対するリガンドとしてはMIP-1 α 、MIP-1 β 、IP-10、RANTESなどが、Th2細胞が発現するCCR4受容体に対するリガンドとしてTARCなどが知られている。今回我々はケモカインのリガンド側に着目し、これら5種類のケモカインの血液中濃度とベーチェット病患者の眼炎症の病勢との関連性を明らかにする事を目的として以下の研究を試みた。

B. 研究方法

対象は、2000年1月から2001年12月に東京大学付属病院眼科及び東京厚生年金病院眼科に通院中で、眼症状を有し眼炎症発作を繰り返すベーチェット病患者19例(男性14例、女性5例、平均年齢41.9 \pm 10.9才)である。患者に検査の趣旨を説明し同意を頂いた後、活

動期と緩解期にそれぞれ採血を行った。活動期群(A群)は、比較的強い眼発作を起こしてから1週間以内で、かつ口腔内病変、皮膚病変、陰部潰瘍、関節炎などその他の全身症状が1つ以上ある事、緩解期群(I群)は、眼炎症が1ヶ月以上無く、かつその他の全身症状は1つ以下である事とした。さらに、コントロールとして健常人15例(男性13例、女性2例、平均年齢38.9 \pm 9.0才)から採血を行い、健常人群(N群)とした。

末梢血はEDTA入りチューブで採血し、遠心して血漿サンプルを得、-80 $^{\circ}$ Cで測定日まで保存した。後日、4種類のTh1細胞遊走性ケモカイン、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IP-10⁷⁾、RANTESおよびTh2細胞遊走性ケモカインTARCの濃度をサンドイッチELISA法で測定した。それぞれのケモカインの測定下限濃度は以下の通りである。MIP-1 α ; 7pg/ml、MIP-1 β ; 11pg/ml、RANTES; 8pg/ml、TARC; 7pg/ml、IP-10; 10pg/ml。

C. 研究結果

活動期ベーチェット病患者(A群)と健常人(N群)の比較

活動期ベーチェット病患者(A群)、緩解期患者(I群)と健常人(N群)からの血漿サンプル中の5種類のT細胞遊走性ケモカイン濃度をサンドイッチELISA法で測定した。MIP-1 α は全てのサンプルで測定限界以下であったが、MIP-1 β 、RANTES、IP-10、TARCは全てのサンプルで測定可能であった。活動期ベーチェット病患者(A群)と健常人(N群)での比較では、IP-10は、A群で445.4 \pm 72.9、N群で210.4 \pm 22.7pg/ml(Mean \pm S.E.)で、活動期ベーチェット病患者で有意に高値であった(図1a, p=0.024, Mann-Whitney's U test)。RANTESは、それぞれ31.8 \pm 5.2、21.6 \pm 4.5ng/mlであり有意差は認めなかった(図1b, p=0.093)。またMIP-1 β 、TARCの濃度は、それぞれ47.2 \pm 8.8、41.2 \pm 5.3 pg/ml及び

69.2±16.5、44.8±6.6pg/mlで、両群間に有意差はなかった（図1c及びd, p=0.803及びp=0.306）。

同一患者における活動期（A群）と緩解期（I群）の比較

同一患者において活動期(A群)と緩解期(I群)での血漿中ケモカイン濃度について比較検討した。IP-10はA群で445.4±72.9、I群で236.9±20.3pg/mlであり、緩解期に比べ活動期で高値を示す症例が多く、両群間に有意差を認めた(p=0.0157, Wilcoxon's signed-rank test)。RANTESについては、それぞれ31.8±5.2、23.6±4.8ng/mlであり、緩解期に比べ活動期で有意に高値であった(p=0.018)。MIP-1β、TARCは、それぞれ47.2±8.8、35.9±5.3pg/ml及び69.2±16.5、58.2±13.0pg/mlであり、両群間で有意差はなかった(p=0.112及びp=0.472)。

D. 考察

ケモカイン及びその受容体は、白血球の血管外への遊走に非常に重要な分子で有ることがノックアウトマウスの実験により明らかとなっている⁸⁾。このことから、ケモカイン及びその受容体を標的とした炎症に対する新しい治療の可能性が示唆されている。

これまでに我々は、ベーチェット病患者の末梢血中において2種類のケモカイン(IL-8、MCP-1)の濃度が健常人と比べ有意に増加している事を報告した⁹⁾。さらに、先の本研究会において、活動性ベーチェット病患者では、末梢血T細胞表面に発現するケモカイン受容体CXCR3、CCR5の発現率が健常人に比べ有意に増加している事を明らかにした。CXCR3、CCR5はTh1細胞に特異的に発現するケモカイン受容体であることから、今回の結果はベーチェット病の増悪期には、末梢血中でTh2細胞に比べてTh1細胞が優位となる報告^{1,2)}と矛盾しない結果であると考えられた。

今回はケモカインのリガンド側に着目し、

これら5種類のケモカインの血液中濃度とベーチェット病患者の眼炎症の病勢との関連性を調べた。その結果、MIP-1αは、ベーチェット病、正常人すべてのサンプルで測定限界以下であった。IP-10は活動期ベーチェット患者で健常人より有意に高値であった。一方、血漿中MIP-1β、RANTES、TARCはベーチェット患者と健常人で有意差はなかった。さらにベーチェット病の病勢と血漿中ケモカイン濃度の検討では、IP-10とRANTESが活動期で緩解期に比べ有意に高値であった。このことはベーチェット病にTh1細胞及びそれを血管外へと遊走させるケモカインが病態に関与している可能性を示唆するものとする。IP-10、RANTESの病態への関与のメカニズムについては今後の検討課題であるとする。

E. 結論

T細胞遊走性ケモカインのうち、IP-10は活動期ベーチェット患者において、健常人のそれより血漿中濃度が有意に高値であったこと、また、同一患者での活動期と緩解期での比較で、活動期に有意に上昇していたことから、ベーチェット病の病態にIP-10が関与している可能性がある。

G. 研究発表

学会発症 蕪城俊克、他：日本眼科学会講演予定 2002

引用文献

- 1) Raziuddin S. et al.: J. Rheumatol. 25:329-33,1998.
- 2) 大野重昭、他：厚生省特定疾患 免疫疾患調査研究班 ベーチェット病分科会平成8年度業績集 P391-395,1997.
- 3) Gul A, et al.: Br. J. Dermatol. 132: 901-7,1995.
- 4) 松島綱治：細胞工学17: 1022-1029, 1998.
- 5) Bonocchi R, et al.: JEM 187: 129-34, 1998.

- 6) 藤野雄次郎、他：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12年度研究報告書 P33-38,2001.
- 7) Narumi S, et al.: Journal of Immunology 158: 5536-44, 1997.
- 8) Cacalano G, et al.: Science 265 (5172): 682-4, 1994.
- 9) 藤野雄次郎、他：厚生省特定疾患 免疫疾患調査研究班 ベーチェット病分科会 平成9年度業績集 P105-108,1998.

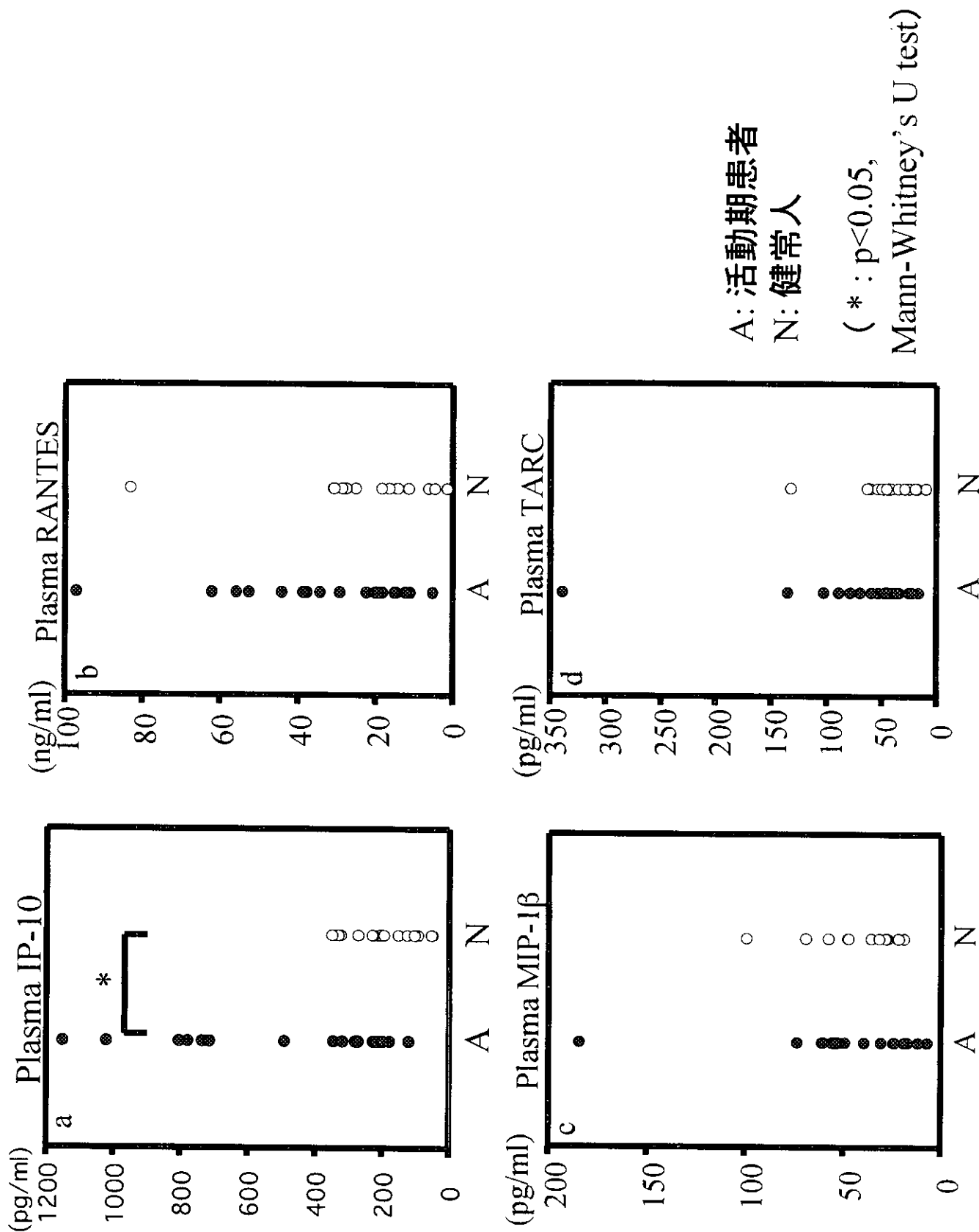


図1. 活動期患者及び健康人の血漿中T細胞遊走性ケモカイン濃度

ベーチェット病患者末梢血白血球におけるケモカイン受容体発現の関与について

分担研究者 金子史男 福島県立医科大学皮膚科教室教授

研究要旨：ベーチェット病患者の末梢血メモリーT細胞におけるCCケモカイン受容体4(CCR4)およびCXCR3発現について検討した。また同時にT細胞活性がその病態に関与する皮膚疾患である乾癬患者、アトピー性皮膚炎患者についても検討し、比較した。乾癬患者のCD4陽性細胞中のCXCR3発現は25.6%であり、健常人のそれと比較して優位に高値を示した。またTh2細胞が優位であると考えられるアトピー性皮膚炎患者の末梢血CD4陽性細胞中のCCR4発現率は22.4%であり、健常人のそれと比較して有意に高値を示した(P<0.05)。ベーチェット病患者末梢血中のCD4陽性細胞におけるCCR4、CXCR3発現率について検討した結果、CD4陽性細胞中のCXCR3発現率に関して、35.2%と健常人(9.1%)に比べて有意に高値を認めた。ベーチェット病ではCXCR3発現亢進にみられるTh1サイトカインの亢進がその病態に重要である可能性が推測された。

分担研究者：金子史男（福島県立医科大学皮膚科教室）

共同研究者：中村晃一郎、東條理子（福島県立医科大学皮膚科）

A. 研究目的

ベーチェット病は、口腔粘膜、眼、皮膚などの全身に炎症を生じる疾患であり、皮膚に結節性紅斑様皮疹における白血球浸潤、針反応において白血球からなる無菌性膿疱を生じるなど、皮膚においての白血球機能亢進があると考えられる。白血球遊走に影響を及ぼす種々の活性化因子(IL-8 など)の産生亢進が認められている。いっぽうベーチェット病の病

態には組織障害にT細胞の関与があり、T細胞の分化から見た場合、ベーチェット病ではIFN- γ を主体とするTh1作用の働きが重視されている。最近Th1細胞、Th2細胞に、ケモカイン受容体であるCCR4およびCXCR3が特異的に発現することが報告されており、これらの発現が病巣部への白血球の遊走に重要であると推測される。そこで今回ベーチェット病患者4名、健常人8名、乾癬患者10名、アトピー性皮膚炎13名を対象に、末梢血から単核球を採取し、CD4およびCD8陽性CD45RO陽性細胞におけるCCR4発現、CXCR3発現率について検討した。

B. 研究方法

健常人から CD4 陽性 T 細胞をマックスビーズを用いて採取し、PMA 刺激下に細胞内サイトカイン産生能、すなわち IL-4、IFN- γ について検討した。次に乾癬患者、ベーチェット病患者、アトピー性皮膚炎患者、健常人について CD4 陽性 CD45RO 陽性細胞に発現する CCR4、および CXCR3 発現率について検討した。

C. 研究結果

健常人末梢血を用いた細胞内サイトカインの検討から、CCR4 陽性細胞は主として IL-4 を産生する細胞であり、また CXCR3 は IFN- γ を産生する細胞であることが確認された。つぎに Th1 細胞が優位であるとされる炎症性皮膚疾患である乾癬患者についてその発現について検討した。CD4 陽性細胞中の CXCR3 発現は 25.6%であり、健常人のそれと比較して優位に高値を示した($P<0.05$)。また Th2 細胞が優位であると考えられるアトピー性皮膚炎患者の末梢血 CD4 陽性細胞中の CCR4 発現率は 22.4%であり、健常人のそれと比較して有意に高値を示した($P<0.05$)。つぎベーチェット病患者末梢血中の CD4 陽性細胞における CCR4、CXCR3 発現率について検討した。その結果、CD4 陽性細胞中の CXCR3 発現率は 35.2%であり、健常人のそれ(9.1%)に比べて有意に高値を認めた。したがって以下のご結果が明らかにされた。第一に、ベーチェット病患者末梢血の CD4 陽性 CD45RO 陽性細胞中の CXCR3 発現率は、健常人のそれと比較して有意に高値を示した。第二にベーチェット病患者末梢血の CD8 陽性 CXCR3 発現率は 健常人と比べて若干高い傾向を示したが、有意差は認めなかった。第三にアトピー性皮膚炎患者

末梢血 CD4 陽性 CD45RO 陽性細胞中の CCR4 発現率は高値を示し、いっぽう乾癬患者末梢血 CD4 陽性 CD45RO 陽性細胞の CXCR3 発現率は、健常人に比較して高値を示した。

6. 考察

これまでベーチェット病の病態には、IL-12 受容体の異常など、Th1 サイトカインがその病態に重要であることが報告されている。我々の今回の結果も、ケモカイン受容体 (CCR4、CXCR3)発現率から見た場合、ベーチェット病は Th1 に傾いた病態であることが示され、IFN- γ 産生増強がその病態に重要である可能性が推測された。

白血球が皮膚へ浸潤するにはにはさまざまな走化因子の関与が考えられる。血管内に存在する白血球は接着分子を発現しながら血管か内皮を通過し、皮膚では走化因子によって炎症局所に遊走すると考えらる。とくに、ベーチェット病でみられる白血球走化能亢進、局所の白血球浸潤には、好中球の走化、活性化因子である IL-8 や Gro- α の関与が重要であると考えられる。さらに今回の結果で明らかにされたようにベーチェット病の病態形成には、IL-8 などの白血球活性化因子の産生亢進のみでなく、Th1 細胞上の CXCR3 発現率の亢進によって、サイトカインに反応し IFN- γ 産生を生じることが、ベーチェット病でみられる炎症反応の惹起に関与することを示唆していると考えられる。

ケモカイン受容体を介して T 細胞の IL-2 産生、接着分子発現の亢進が誘導されるなど、表皮角化細胞、血管内皮細胞、樹状細胞からケモカインを介しての T 細胞への活性化の機

序が推測されている。ペーチェット病における炎症反応の機序について、これらの細胞の役割についても今後解析する必要があると考えられる。

E. 結論

ペーチェット病患者末梢血中の CD4 陽性細胞における CCR4、CXCR3 発現率について検討した。CD4 陽性 CD45RO 陽性細胞中の CXCR3 発現率は 35.2%と健常人(9.1%)に比べて有意に高値を認めた。

乾癬患者では、CD4 陽性細胞中の CXCR 3 発現率は健常人に比べて高値を示し、またアトピー性皮膚炎患者の末梢血 CD4 陽性細胞中の CCR4 発現率は 22.4%であり、健常人のそれと比較して有意に高値を示した(P<0.05)。

ケモカイン受容体と T 細胞の機能についてもクロストークの生じる可能性が報告されており、ペーチェット病における T 細胞、白血球機能解析が必要であると考えられた。

謝辞

本研究は東京大学大学院医学研究系皮膚科湧川基史先生との共同研究であり深謝致します。

F. 文献

Wakugawa M, Nakamura K, Kakinuma T, Onai N, Matsushima K, Tamaki K. CC chemokine receptor 4 expression on peripheral blood CD4+ T cells reflects disease activity of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 117: 188-96, 2001.

表 1. ペーチェット病、アトピー性皮膚炎、乾癬患者、健常人における末梢血 CD4 陽性 CD45RO 陽性 T 細胞における CCR4、CXCR 陽性率(%)。

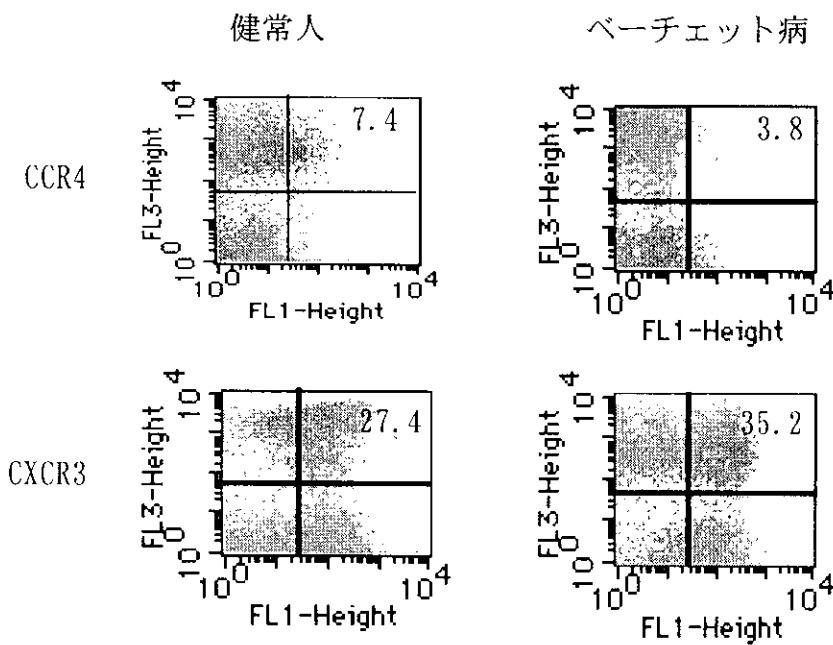
図 2. 健常人、ペーチェット病患者末梢血における CCR4、CXCR3 発現率 (FACS)。

表1. ペーチェット病、アトピー性皮膚炎、乾癬患者、健常人における末梢血 CD4 陽性 CD45RO 陽性 T 細胞における CCR4、CXCR 陽性率(%)

| | CD4+CCR4+ | CD4+CXCR3+ | CD8+CCR4+ | CD8+CXCR3+ |
|----------|--------------------|--------------------|-----------|------------|
| 健常人 | 5.3±3.5% | 9.1±5.1% | 4.9±1.1% | 40.1±5.6% |
| ペーチェット病 | 4.5±3.3% | <u>28.3±14.6%*</u> | 3.1±0.8% | 58.9±28.3% |
| アトピー性皮膚炎 | <u>22.4±18.1%*</u> | 9.2±5.5% | 7.6±5.3% | 49.5±12.7% |
| 乾癬 | 6.5±5.0% | <u>25.6±8.5%*</u> | 2.9±3.2% | 57.5±12.7% |

*p<0.05 compared to control

図2. 健常人、ペーチェット病患者末梢血におけるCCR4、CXCR3発現率 (FACS)。



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） |
| | 南場 研一 | （北海道大学大学院医学研究科） |
| | 北明 大州 | （北海道大学大学院医学研究科） |
| | 佐藤 出 | （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） |
| | 新野 正明 | （北海道大学大学院医学研究科） |

研究要旨 ベーチェット病のモデル系である実験的自己免疫ブドウ膜炎(EAU)では、病態形成に対して、各種のサイトカイン、ケモカインの関与が知られている。今年度では、MCP-1 ケモカインの EAU に及ぼす影響を解析した。また神経炎(EAE)モデル動物を用い、核内受容体 PPAR- γ の特異的リガンドによる治療実験を行った。

A. 研究目的

MCP-1 は CC ケモカインに属し、単球やメモリー T 細胞の走化性亢進をもたらす。我々が作製した、ヒト β アクチンプロモーターでヒト MCP-1 の発現を駆動するトランスジェニックマウス(Tgm)においては、血中に高濃度のヒト MCP-1 蛋白を発現し、接触性過敏反応が増強することなどがこれまでの解析から明らかとなっている。今回、ブドウ膜炎の抑制にケモカイン、特に MCP-1 を標的とする戦略が可能かを研究する目的で、MCP-1 Tgm を用いた実験的自己免疫性ブドウ膜炎(EAU)マウスモデルを解析した。

また、核内受容体の一つである PPAR- γ は、脂肪代謝や糖代謝において重要な働きを示すが、一方でこの受容体を介した免疫系の調節

作用も最近報告されている。我々は、PPAR- γ を介した免疫抑制機能に注目し、PPAR- γ 特異的リガンドの一つであるトログリタゾンの投与による、EAE の発症、進展への効果も検討した。

B. 研究方法

1. EAU 発症実験

EAU は MCP-1 Tgm, non-Tgm (B6 の背景)あるいは B6 の頸部背側、腰部背側に human interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) peptide 1-20+完全フロイントアジュバント 100 μ l を投与し、同日百日咳毒素 0.1 μ g/マウスを腹膜内投与することによって誘導した。翌日より、マウスを散瞳後、眼底を Bonnoscope と Super Field NC Lens (Volk Optical)にて観察

し、Thurau らの基準に従って、スコア化 (0~4) した。また、眼球についてはグルタルアルデヒド前固定/ホルマリン後固定の後、パラフィン切片を Hematoxylin/eosin 染色し、病理組織学的評価 (0~4) を行った。抗 MCP-1 抗体投与は 5 μ g/マウス/日で、連日 (3 週間) 行った。

2. EAE 発症実験

EAE は MOG35-55 ペプチドを用いて 8~10 週齢の B6 マウス (♀) に誘導した。トログリタゾンは 0.5% の carboxymethyl cellulose (CMC) 液に溶解し、1 日 1 回金属ゾンデにて強制経口投与した。コントロール群には、CMC 液のみ投与した。臨床症状は連日観察し、clinical score を評価した。

C. 研究成果

1. EAU における MCP-1 の役割

感作後 19 日目の段階では、ブドウ膜炎発症眼が non-Tgm では 1/10 (10%) であるのに対し、MCP-1 Tgm では 9/20 (45%) と Tgm で早期の発症を認めた。一方感作後 23 日目では、Tgm は 85%、non-Tgm でも 70%、clinical score では、Tgm、1.8、non-Tgm、1.3 であった。EAU のピーク時においては、Tgm、non-Tgm ともにスコア 2 前後になり、またその後の症状の消退においても、両方で差は認められなかった。すなわち、Tgm においては EAU ピーク時の重症度は増強されないが、発症が促進されることが判明した。Tgm で認められる発症促進は、MCP-1 がブドウ膜炎発症抑制の標的となり得ることを示唆する。

2. トログリタゾンによる EAE 抑制

トログリタゾンの濃度を 0、50、そして、100 mg/kg/day の濃度に分け、MOG 初回免疫前日より、一日一回投与し、clinical score が 0 に

なるまで投与した時の経過を追跡した。その結果、トログリタゾン投与群では、一日当たりの量が 50 mg/kg、100 mg/kg のいずれでも、maximum clinical score は control 群より有意に改善していた。一方、発症するまでの日数は、50 mg/kg 投与群は control 群と差がなく、100 mg/kg 投与群は control 群より有意に発症が遅延していた。

3. トログリタゾンによる EAE 抑制効果時期

次に、トログリタゾンが induction phase と effector phase のいずれに有効であるかをみるため、発症日近傍の MOG 免疫 9 日目までと、MOG 免疫 9 日目以降からトログリタゾンを投与したグループに分けて検討した。その結果、9 日目までのグループでは、発症日が遅くなるものの、その後の maximum clinical score には影響を与えなかった。一方、9 日目以降にトログリタゾンを投与したグループでは、maximum clinical score は有意に改善していたことから、トログリタゾンは主に、effector phase に作用すると考えられた。また、MOG 投与 25-30 日目に、下位腰髄を取り出し、H&E 染色を行い、炎症部位を比較検討した。その結果、トログリタゾン投与群で著明に炎症が抑制されていた。

4. トログリタゾンによる抑制機序

トログリタゾンの治療効果の機序に関して、最近 PPAR- γ の抗炎症作用が注目されている。最後に、マクロファージにおける各種サイトカインなどの発現抑制効果について検討するため、初回の MOG 投与から 25 日前後に、全脊髄を取り出し、RT-PCR を行った。その結果、脂肪組織に特異的に発現する PPAR- γ 2 の発現は認められなかったが、マクロファージなどに発現する PPAR- γ 1 は、トログリタゾン投与群で発現が増強していた。さらに、IL-1 β

や TNF- α の発現は、トログリタゾン投与群で抑制されていた。以上の結果を EF-1 との比較により、半定量的に評価したところ、proinflammatory cytokine、特に TNF- α の発現が、トログリタゾン投与群で有意に抑制されていた。一方、トログリタゾンで発現が抑制されるといわれている iNOS は、トログリタゾン投与群と control 群で差が認められなかった。

D. 考察

ベーチェット病は全身病としての側面と、臓器特異的自己免疫疾患の側面を持つ。今回 EAU と EAE モデルを用い、ケモカイン、サイトカインの役割を検討し、また、これらのファクターが治療のターゲット分子となり得るかについても検証した。

その結果、MCP-1 ケモカインは EAU 増悪に働き、抗 MCP-1 抗体による治療の可能性が示唆された。さらに EAE モデルを用い、核内レセプターの一つである PPAR- γ 特異的リガンドであるトログリタゾンが proinflammatory cytokine の発現を抑制することにより、EAE 抑制効果を示す結果を得た。これらのことから、PPAR- γ アゴニストによる、自己免疫疾患の新治療法の道が拓けた。しかし、トログリタゾンは、重篤な肝障害を惹起する可能性が報告されている。これまで、PPAR- γ のリガンドはいくつか開発されてきており、今後副作用が少なく、抗炎症作用が強い薬剤が開発されれば、ベーチェット病などの自己免疫疾患への臨床応用の可能性が出てくるものと思われる。

E. 結論

ベーチェット病における自己免疫反応制御による治療モデルとして、ケモカインを標的

とする方法と、PPAR- γ を介する発症抑制法の二つの新戦略について検討し、いずれも有効との結論を得た。

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) Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Tone, S., Itoh, D., Tosa, N., Negishi, I., Ogasawara, K., Ueda, T., and Onoé, K.: Defective development of NK1.1⁺ T cell antigen receptor $\alpha\beta$ ⁺ cells in zeta-associated protein 70 null mice with an accumulation of NK1.1⁺ CD3⁺ NK-like cells in the thymus. *Blood*, 97, 1765-1775, 2001.
- 2) 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 in patients with Wegener's granulomatosis and relapsing polychondritis. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 110, 1035-1040, 2001.
- 3) 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.*, 69, 732-740, 2001.
- 4) 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 spontaneously leukemia-prone mice. *J. Clin. Exp. Hemathopathol.* 41, 61-68, 2001.
- 5) Niino, M., Iwabuchi, K., Kikuchi, S., Ato, M., Morohashi, T., Ogata, A., Tashiro, K., and Onoé, K.: Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J. Neuroimmunol.* 116, 40-48, 2001.
- 6) Kizaki, T., Suzuki, K., Hitomi, Y., Iwabuchi, K., Onoé, K., Ishida, H., Izawa, T., Ji, L.L., and Ohno, H.: Immunomodulation by acute cold stress: activation and apoptosis of murine peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283, 700-706, 2001.
- 7) Yanagawa, Y., Iwabuchi, K., and Onoé, K.: Enhancement of stromal cell-derived factor-1 α -induced chemotaxis for CD4/8 double positive thymocytes by fibronectin and laminin in mice. *Immunology*, 104, 43-49, 2001.
- 8) Watano, K., Iwabuchi, K., Fujii, S., Ishimori, N., Mitsuhashi, S., Ato, M., Kitabatake, A. and Onoé, K.: Allograft inflammatory factor-1 augments productions of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line. *Immunology*, 104, 307-316, 2001.
- 9) Kizaki, T., Suzuki, K., Hitomi, Y., Iwabuchi, K., Onoé, K., Haga, S., Ishida, H., Ookawara, T., Suzuki, K. and Ohno, H.: Negative regulation of LPS-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by AP-1 in macrophage cell line J774A.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 1031-1038, 2001.
- 10) Nagata, J., Higashiucato, Y., Maeda, G., Chinen, I., Saito, M., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Effects of water-soluble hemicellulose from soybean hull on serum antibody levels and activation of macrophages in rats. *J. Agr. Food. Chem.*, 49, 4965-4970, 2001.
- 11) Mizumoto, N., Iwabuchi, K., Nakamura, H., Ato, M., Shibaki, A., Kawashima, T., Kobayashi, H., Iwabuchi, C., Ohkawara, A. and Onoé, K.: Enhanced contact hypersensitivity in human monocyte chemoattractant protein-1 transgenic mouse. *Immunobiology*, 204: 477-493, 2001.
- 12) Ohwatari, R., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Morohashi, T., Sawa, H., Hioki, K., Kobayashi, K., Fukuda, S., Inuyama, Y. and Onoé, K.: Developmental and functional analyses of CD8⁺ NK1.1⁺ T cells in the class I restricted TCR transgenic mice. *Cell. Immunol.* 213: 24-33, 2001.
- 13) Yanagawa, Y., Iijima, N., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Activation of extracellular signal-related kinase by TNF- α controls the maturation and function of murine dendritic cells. *J. Leukocyte Biol.*, 71: 125-132, 2002.
- 14) Onoé, K., Kitaichi, N., Ohno, S., Iwabuchi, C., and Iwabuchi, K.: 「NK and NK-T cells possibly involved in Behçet's disease」, "Immunology of Behçet's Disease". Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands (in press)
- 15) 小野江和則：免疫応答とNK/NKT細胞。

- 血液フロンティア, 11:1363-1371, 2001.
- 16) 岩渕和也, 岩渕千雅子, 刀祢さおり, 土佐紀子, 上出利光, 小野江和則: 胸腺内NK-T細胞の分化経路. 日本呼吸器外科学会雑誌, 15, 2001.
 - 17) 小野江和則: 「運動生理・生化学辞典」大野秀樹他編, 大修館書店, 東京, 2001.
 - 18) 小野江和則: 免疫寛容. 「肝臓移植の実際」藤堂 省編, 日本医学館, 東京. (印刷中)
 - 19) 小野江和則: 「免疫学辞典」, 大沢利昭他編, 東京化学同人, 東京, (印刷中)
 - 20) 小野江和則: 「医学大辞典」, 伊藤正男編, 医学書院, 東京. (印刷中)
 - 21) 小野江和則: 自己免疫疾患の成立機構. 「New Mook 眼科, 眼の自己免疫疾患」大野重昭, 水流忠彦, 吉田晃敏編, 金原出版, 東京. (印刷中)
2. 学会発表
- 1) 北市伸義, 小竹 聡, 大野重昭, 諸橋大樹, 小野江和則: 抗CD116抗体投与による実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎の制御. 第105回日本眼科学会総会, 2001. (於 横浜)
 - 2) 岩渕和也, 岩渕千雅子, 刀祢さおり, 土佐紀子, 上出利光, 小野江和則: 胸腺内NKT細胞の分化系路. 第20回日本胸腺研究会, 2001. (於 札幌)
 - 3) 小野江和則: (司会) 特別講演 垣生園子, 胸腺細胞の分化と増殖. 第20回日本胸腺研究会, 2001. (於 札幌)
 - 4) 小野江和則, 岩渕和也, 阿戸 学: NK-T細胞分化には胸腺髄質上皮細胞が必要である. 第90回日本病理学会総会, 2001. (於 東京)
 - 5) 岩渕和也, 阿戸 学, 小野江和則: ZAP-70ノックアウトマウスにおけるNKT前駆細胞の同定. 第90回日本病理学会総会, 2001. (於 東京)
 - 6) 石森直樹, 岩渕和也, 小野江和則: 混合異系骨髄キメラはアポE欠損マウスにおける動脈硬化病巣進展を抑制する: マクロファージ(Mφ)機能の解析. 第41回日本リンパ網内系学会総会, 2001. (於 秋田)
 - 7) 石森直樹, 岩渕和也, 藤井 聡, 綿野敬子, 中井之人, 三島鉄也, 北島 顕, 小野江和則: 骨髄移植による動脈硬化性疾患への実験治療. 第5回北海道臓器移植フォーラム, 2001. (於 札幌)
 - 8) 小野江和則: 特別講演 NK/NK-T細胞について. 第35回東北アレルギー懇話会, 2001. (於 福島)
 - 9) 新野正明, 岩渕和也, 阿戸 学, 諸橋大樹, 小野江和則: ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR- γ) 特異的リガンド、トログリタゾンによる実験的自己免疫性脳脊髄炎抑制. 第28回北海道免疫研究会, 2001. (於 札幌)
 - 10) 柳川芳毅, 岩渕和也, 鈴木 元, 中田有紀子, 小野江和則: ケモカインによる胸腺T細胞遊走に対するfigronectinおよびlamininの影響. 第11回Kyoto T Cell Conference, 2001. (於 京都)
 - 11) 荒浪利昌, 岩渕和也, 小野江和則: 同系混合リンパ球反応で増殖するT細胞亜群. 第11回Kyoto T Cell Conference, 2001. (於 京都)
 - 12) 小野江和則: シンポジウム「同種造血幹細胞移植と免疫寛容」T細胞の分化と免疫寛容. 第4回日本造血細胞移植学会,

2001. (於 札幌)
- 13) 石森直樹, 中井之人, 岩渕和也, 藤井 聡, 綿野敬子, 三島鉄也, 中山俊憲, 谷口 克, KAER Luc Van, 小野江和則: 動脈硬化病巣進展における NKT 細胞の役割. 第 31 回日本免疫学会, 2001. (於 大阪)
 - 14) 岩渕和也, 岩渕千雅子, 刀裨さおり, 大渡隆一郎, 小野江和則: ZAP-70 ノックアウト(-/-)マウスを用いた NKT 細胞分化の研究. 第 31 回日本免疫学会, 2001. (於 大阪)
 - 15) 新野正明, 岩渕和也, 菊地誠志, 阿戸 学, 諸橋大樹, 田代邦雄, 小野江和則: ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体_特異的リガンド、トログリタゾンによる実験的自己免疫性脳脊髄炎抑制. 第 31 回日本免疫学会, 2001. (於 大阪)
 - 16) 柳川芳毅, 岩渕和也, 鈴木 元, 中田有紀子, 小野江和則: ケモカインによる胸腺 T 細胞遊走に対する fibronectin および laminin の影響. 第 31 回日本免疫学会, 2001. (於 大阪)
 - 17) 荒浪利昌, 岩渕和也, 小野江和則: 同系混合リンパ球反応で増殖する T 細胞亜群. 第 31 回日本免疫学会, 2001. (於 大阪)
 - 18) 綿野敬子, 岩渕和也, 藤井 聡, 三島鉄也, 中井之人, 阿戸 学, 小野江和則: アログラフト炎症因子(AIF)-1 の粥状動脈硬化巣における発現. 第 31 回日本免疫学会, 2001. (於 大阪)
 - 19) 島田茂樹, 岩渕和也, 山田秀人, 小野江和則: Allograft Inflammatory Factor-1 の妊娠時および非妊娠時マウス子宮における発現についての研究. 第 31 回日本免疫学会, 2001. (於 大阪)
 - 20) Niino M., Iwabuchi, K., Kikuchi, S., Ato,

M., Morohashi, T., Ogata, A., Tashiro, K., Onoé, K.: Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in CC57BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . 国際シンポジウム “NK/NK-T 細胞と自己免疫-多発性硬化症と免疫寛容の理解に向けて-”, 2001. (於 東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（臨床調査研究事業）
分担研究報告書

ベーチェット病に関する調査研究

前房水免疫抑制物質により誘導される調節性 T 細胞の投与による自己免疫性網膜ぶどう膜炎の抑制

| | | |
|-------|------|----------------------|
| 分担研究者 | 小竹 聡 | 北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野 |
| | 南場研一 | 北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野 |
| | 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

最近、前房水中の免疫抑制物質が調節性 T 細胞を誘導することにより炎症性 T 細胞を抑制することが明らかとなった。我々は前房水免疫抑制物質により誘導された調節性 T 細胞を用いて実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎（EAU）を抑制することを試みた。網膜視細胞間レチノイド結合蛋白由来のペプチドでマウスを免疫し所属リンパ節から T 細胞を得た。この T 細胞を抗原提示細胞とアルファメラニン細胞刺激ホルモン（ α -MSH）、TGF- β_2 とともに 24 時間培養して調節性 T 細胞を誘導した。その培養上清中には IFN- γ の産生が少なく、逆に TGF- β の産生が多くみられた。EAU は 15 日目に最も強くみられ、平均重症度は 2.2、発症率 90%であったが、調節性 T 細胞を静注したマウスでは EAU が有意に抑制され、平均重症度は 1.1、発症率は 45%であった。前房水中の免疫抑制物質により誘導される調節性 T 細胞の投与により EAU を抑制することが可能であることが証明され、調節性 T 細胞の投与によるベーチェット病をはじめとするぶどう膜炎の治療の可能性が示唆された。

A. 研究目的

眼内は炎症を最小限にとどめるための様々な機構を備えている。その一つは前房水中の免疫抑制物質の存在である。これらの免疫抑制物質

は免疫反応、炎症反応を抑制する働きがある。最近になり、前房水中の免疫抑制物質は直接的に免疫反応を抑制するだけでなく、炎症性 T 細胞を抑制する調節性 T 細胞を誘導するこ

とが明らかとなった¹²⁾。

今回はその調節性T細胞を用いて実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) を抑制することを試みた。

B. 研究方法

網膜視細胞間レチノイド結合蛋白由来のペプチド (IRBPp) (あるいは OVA, S-Ag) 50 μ g で B10.RIII マウスを免疫し7日後の所属リンパ節からT細胞を得た。これをあらかじめ 5 μ g/ml IRBPp (あるいは OVA, S-Ag) とともに一晚培養した付着性脾細胞 (抗原提示細胞) と 30pg/ml アルファメラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH)、5ng/ml TGF- β_2 とともに 24 時間培養して調節性 T 細胞を誘導した。培養上清中のサイトカインは ELISA 法と Bio assay で測定した。IRBPp 反応性調節性 T 細胞を B10.RIII マウスに静注するとともに IRBPp 50 μ g を免疫し、6 日目から眼底を観察し網膜ぶどう膜炎の重症度を 0 から 5 に判定した。

C. 研究結果と考察

免疫後に所属リンパ節から得た T 細胞を培養し、その増殖反応、サイトカインの産生をみたところ、 α -MSH、TGF- β_2 とともに T 細胞を培養した上清中には IFN- γ の産生が少なく、逆に TGF- β の産生が多く

みられた。増殖反応は抑制されていたが、増殖能は完全には抑制されていなかった (表 1)。

| 処理 | IFN γ | IL-4 | IL-10 | TGF- β | 増殖反応 |
|------------------------------|--------------|------|-------|--------------|------|
| No Treat. | +++ | - | ++ | - | +++ |
| α -MSH | ++ | - | + | + | +++ |
| TGF- β_2 | + | - | + | ++ | ++ |
| α -MSH/TGF- β_2 | +/- | - | +/- | +++ | + |

表 1 レギュラトリー T 細胞の性質

レギュラトリー T 細胞 (α -MSH/TGF- β_2 処理 T 細胞) は IL-4/IL-10 産生 T 細胞 (Th2) ではなく、TGF- β 産生 T 細胞である。

IRBPp で B10.RIII マウスを免疫すると EAU は 15 日目に最も強くみられ、平均重症度は 2.2、発症率 90% であったが、IRBPp 反応性調節性 T 細胞を静注したマウスでは EAU が抑制され、その抑制は調節性 T 細胞の数依存性であった (図 1)。

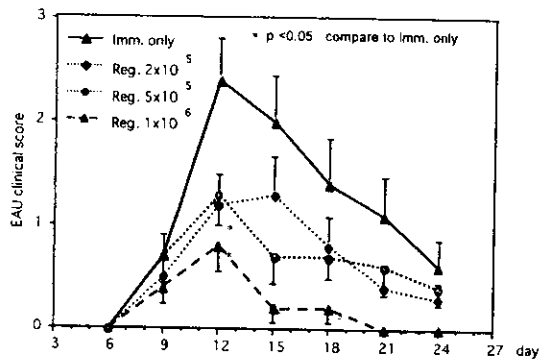


図 1 レギュラトリー T 細胞による EAU の抑制

次に調節性 T 細胞の働きについて、その抗原特異性につき検討した。前述の IRBPp 反応性調節性 T 細胞に加え、OVA 反応性調節性 T 細胞、S-Ag

反応性調節性T細胞を誘導し、それぞれを B10.RIII に静注し、EAU の経過について観察した。IRBPp と S-Ag は網膜抗原である。図 2 に示すように、IRBPp 反応性調節性T細胞と S-Ag 反応性調節性T細胞は EAU を有意に抑制したが、OVA 反応性調節性T細胞は EAU を抑制しなかった。

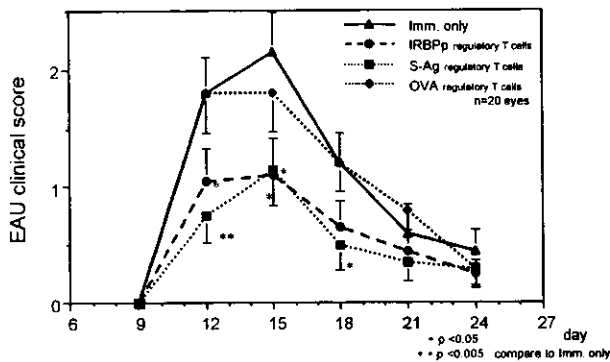


図 2 レギュラトリーT細胞の抗原特異性

S-Ag 反応性調節性T細胞が IRBPp の免疫により誘導された EAU を抑制したことは非常に興味深い事実である。EAU の発症とともに網膜内の S-Ag も炎症部位で抗原提示され、投与した S-Ag 反応性調節性T細胞を再活性化させたのではないかと推察している。この事実から考えると、網膜抗原反応性調節性T細胞であれば自己免疫性ぶどう膜炎に対して有効であり、必ずしも抗原が同定されていなくても良い可能性がある。

D. 結論

前房水中に存在する免疫抑制物質により誘導された調節性T細胞を投与することにより、EAU を抗原特異的に抑制することができた。ぶどう膜炎の発症の起点となっている抗原に対する調節性T細胞を in vitro で誘導し投与することにより、ペーチェット病をはじめとする自己免疫性のぶどう膜炎を治療できる可能性が示唆された。

E. 参考文献

- 1) Taylor AW, Alard P, Yee DG, and Streilein JW, *Curr Eye Res* 16: 900-908., 1997.
- 2) Nishida T, and Taylor AW: Specific aqueous humor factors induce activation of regulatory T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 2268-2274., 1999

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 著書

1. 小竹聡: Behcet 病の難治症例に神経症状が出現してきた. 大野重昭編, 難治ぶどう膜炎・難治白内障の手術のレスキュー. メディカルビュー社,

東京, 2001, 66-69.

2. 小竹聡: サルコイドーシスの病因. 眼科診療 Q&A. 中島章偏, 六法出版, 名古屋, 2001, pp787:2-3.

3. 小竹聡: 杉浦徴候. Amsler 徴候. 眼科診療プラクティス 68 所見から診るぶどう膜炎. 臼井正彦編, 文光堂, 東京, 2001, p10, p15.

総説

1. 小竹聡, 大野重昭: 若年性関節リウマチ: ぶどう膜炎の診断・長期管理. 小児内科, 33: 815-817, 2001.

2. 南場研一, 小竹聡: ぶどう膜疾患. ステロイド薬治療の EBM. 臨眼, 55 (増刊号): 154-162, 2001.

3. 小竹聡, 坂本泰二: ぶどう膜炎のテーラーメイド治療時代がくる? あたらしい眼科, 19: 81-82, 2002.

原著

1. Goda, C., Kotake, S., Ohno, S.: Hypopyon uveitis in Japan. International Ophthalmology Clinics, 42(1):79-83, 2002.

2. Kotake, S., Kitaichi, N., Ohno, S.: Macrophage migration inhibitory factor in uveitis. International Ophthalmology Clinics, 42(1):99-103, 2002

3. 合田千穂, 小竹聡, 笹本洋一, 大野重昭: ベーチェット病における網膜光凝固術の検討. 眼紀, 52: 468-470, 2001.

4. 齊藤航, 小竹聡, 笹本洋一, 高橋光

生, 大野重昭: 多発性硬化症に伴う肉芽腫性汎ぶどう膜炎の 1 例. 日眼会誌, 106: 99-102, 2002.

2、学会発表

教育講演

1. 小竹聡: ぶどう膜疾患とサイトカイン. 日本眼科学会専門医制度第 34 回講習会. 2001. 横浜.

2. 小竹聡: 真菌・寄生虫感染症-内眼部 (結核も含む). 第 42 回日本眼科医会生涯教育講座. 2001. 名古屋, 神戸, 東京, 福岡.

シンポジウム

1. Ohno, S., Kotake, S.: Epidemiology of Behcet's disease in Japan. 13th Congress of the European Society of Ophthalmology. 2001. Istanbul. Turkey.

2. 小竹聡: 21 世紀のぶどう膜炎・動向と対策. ベーチェット病の動向. 第 35 回日本眼炎症学会. 2001. 東京.

3. 小竹聡: サルコイドーシスのステロイド治療. 北大におけるステロイド治療. 第 35 回日本眼炎症学会. 2001. 東京.

4. 小竹聡: 眼炎症・感染症診療アップデート. 難治性眼感染症との戦い. 結核性ぶどう膜炎の現況. 第 55 回日本臨床眼科学会. 2001. 京都.

一般講演

1. 北市伸義, 小竹聡, 大野重昭, 諸橋大樹, 小野江和則: 抗 CD161 抗体投

- 与による実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎の制御. 第 105 回日本眼科学会総会. 2001. 横浜.
2. 有賀俊英, 小竹聡, 大野重昭, 青木功喜, 内尾英一: アデノウイルス結膜炎の病因に関する長期分子疫学的検討. 第 105 回日本眼科学会総会. 2001. 横浜.
3. 合田千穂, 小竹聡, 大野重昭: ベーチェット病眼発作と原田病発症の季節的特徴. 第 35 回日本眼炎症学会. 東京. 2001.
4. 有賀俊英, 小竹聡, 大野重昭, 菊池正幸, 赤石尚一, 藤田晃三, 音無克彦, 能戸清, 青木功喜: 札幌市における眼感染症サーベイランス. 第 2 回アデノウイルス研究会. 横浜. 2001.
5. 渡辺一順, 小竹聡, 合田千穂, 小川綾, 中村佳代子, 大野重昭: 長期間観察できた地図状脈絡膜炎の一例. 第 39 回北日本眼科学会. 札幌. 2001.
6. 東こずえ, 小竹聡, 合田千穂, 南場研一, 大野重昭: ヘルペスイウルス性ぶどう膜炎の臨床像の検討. 第 55 回日本臨床眼科学会. 2001. 京都.
7. 有賀俊英, 小竹聡, 大野重昭, 青木功喜, 内尾英一, 伊藤典彦: クラミジア結膜炎の長期疫学的観察と動向. 第 55 回日本臨床眼科学会. 2001. 京都.
8. 小川綾, 小竹聡, 合田千穂, 南場研一, 大野重昭: サルコイドーシスの眼症状に対するステロイド薬全身投与に関する検討. 第 21 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会. 2001. 東京.
9. 有賀俊英, 小竹聡, 大野重昭, 青木功喜, 大橋勉, 内尾英一, 伊藤典彦: クラミジア結膜炎の長期疫学的観察. 第 14 回日本性感染症学会. 2001. 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし