

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
ヘーチェト病に関する調査研究
分担研究報告書
ヘーチェト病患者末梢血における細胞傷害性 T 細胞の
活性化レベルの検討

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講師
研究協力者 安岡秀剛 慶應義塾大学医学部内科助手
分担研究者 水木信久 横浜市立大学医学部眼科教授
研究協力者 西田朋美 横浜市立大学医学部眼科助手

研究要旨

ヘーチェト病の病態における CD4⁺ T 細胞の重要性が知られているか、CD8⁺ T 細胞、 γ T 細胞など細胞傷害活性を有する T 細胞に関する知見は少ない。そこで、我々はリンパ球活性化マーカー CD69 を用いて、ヘーチェト病患者末梢血における CD8⁺ T 細胞および γ T 細胞の活性化状態を検討した。対象はヘーチェト病 39 例(活動期 11 例、非活動期 28 例)で、健常人 13 例をコントロールとした。末梢血単核球における CD3⁺ CD4⁺、CD8⁺、pan- γ 、V δ 1⁺、V δ 2⁺ および CD69 の発現を多重染色によるフローサイトメトリーにより解析した。活動期ヘーチェト病では非活動期ヘーチェト病、健常人に比べて CD3⁺ T 細胞に対する活性化 CD3⁺、CD8⁺、 γ δ T 細胞の比率が高く、CD8⁺ T 細胞、 γ δ T 細胞中の CD69⁺細胞の比率も活動期で高かった。さらに、活動期には V δ 1/V δ 2 の比率が上昇し、V δ 1⁺ 細胞における CD69⁺ T 細胞の比率も高かった。一方、これらの検討では非活動期ヘーチェト病と健常人の間に差はみられなかった。また、予想に反して活性化 CD4⁺ T 細胞の比率は 3 群間で差を認めなかった。したがって、ヘーチェト病活動期に活性化された CD8⁺ T 細胞、 γ δ T 細胞が病態形成に関与する可能性が考えられた。特に、V δ 1⁺ γ δ T 細胞の活性化は V δ 1 のリカントである MICA を介した免疫応答の増強を反映している可能性がある。

A 研究目的

ヘーチェト病は口腔潰瘍、外陰部潰瘍、眼皮膚症状を主徴とした全身性炎症性疾患だが、その病態はいまだ明らかでない。ヘーチェト病患者の病変部組織では好中球のほか CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、 γ δ T 細胞など多彩な炎症性細胞の浸潤を認める。病変部からの CD4⁺ T 細胞株の樹立や¹⁾、ヒト熱ショックタンパク 60 および網膜抗原(S 抗原)に対する自己反応性 CD4⁺ T 細胞がヘーチェト病患者で特異的に検出されることから²⁾ CD4⁺ T 細胞の重要性が強調されてきた。また最近の検

討では活動期ヘーチェト病で末梢血単核球における IFN- γ 産生 T 細胞³⁾や IL-12 レセプター⁴⁾、CXCR3 発現細胞⁵⁾の増加が報告され、Th1 への偏倚が示されている。これまでヘーチェト病では CD4⁺ T 細胞の病態における役割が着目されてきたが、CD8⁺ T 細胞や γ δ T 細胞などの細胞傷害活性を持つリンパ球に関する知見はほとんどない。今回、我々はこれら細胞傷害活性を持つリンパ球に注目し、活動期および非活動期における末梢血中の細胞傷害性リンパ球の活性化状態について検討した。

B 研究方法および対象

1 対象

厚生労働省研究班の診断基準を満たすヘーチェット病39例を対象とし、健常人13例をコントロールとして用いた。新たな治療の開始や治療強化を要する臨床症状を有していた症例を活動期、それ以外を非活動期とした。活動期11例は眼病変または中枢神経症状の増悪に対して治療を要した。

2 細胞表面マーカーの解析

比重遠心法により分離した末梢血単核球(PBMC)をCD3、CD4、CD8、CD69、pan- $\gamma\delta$ T細胞レセプター、V δ 1陽性 $\gamma\delta$ T細胞レセプター、V δ 2陽性 $\gamma\delta$ T細胞レセプターに対するモノクローナル抗体を用いて多重染色し、フローサイトメリーにより解析した。

3 統計学的解析

活動期ヘーチェット病、非活動期ヘーチェット病、健常人の3群についてそれぞれ各群間の差をMann-Whitney U-testを用いて検定した。

(倫理面への配慮)

すべての患者検体は宇内の倫理委員会にて承認された文書による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

まず、CD3⁺T細胞中のCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞の比率について検討した。CD4およびCD8⁺T細胞の比率は活動期ヘーチェット病、非活動期ヘーチェット病、健常人の3群間で差を認めなかったが、 $\gamma\delta$ T細胞の比率は活動期と非活動期ヘーチェット病の間に有意差を認め、活動期でその比率が増

加していた(活動期 10 \pm 9%、非活動期 5 \pm 4%、 $P=0.03$)。

次にCD3⁺T細胞中のCD69⁺活性化T細胞の比率を検討した。CD4⁺CD69⁺T細胞の比率は各群間で差を認めなかったが、CD3⁺CD69⁺T細胞、CD8⁺CD69⁺T細胞、CD69⁺ $\gamma\delta$ T細胞の比率は活動期ヘーチェット病で非活動期に比べて有意に高値であった(CD3⁺CD69⁺T細胞 活動期 16 \pm 22%、非活動期 1.3 \pm 1.5%、 $P=0.002$ 、CD8⁺CD69⁺T細胞 活動期 9 \pm 11%、非活動期 0.8 \pm 1.1%、 $P=0.002$ 、CD69⁺ $\gamma\delta$ T細胞 活動期 4.3 \pm 8.5%、非活動期 0.3 \pm 0.3%、 $P=0.0004$)。活動期ヘーチェット病と健常人の間にも同様の差がみられたが、非活動期ヘーチェット病と健常人の間に有意差を認めなかった。

さらにCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞それぞれのサブセット中のCD69⁺活性化T細胞の比率を検討した。CD8⁺CD69⁺T細胞およびCD69⁺ $\gamma\delta$ T細胞は活動期ヘーチェット病で非活動期に比べて有意に増加していた(CD8⁺CD69⁺細胞 活動期 33 \pm 35%、非活動期 2 \pm 3%、 $P=0.002$ 、CD69⁺ $\gamma\delta$ T細胞 活動期 26 \pm 25%、非活動期 10 \pm 18%、 $P=0.003$)、CD4⁺CD69⁺T細胞の比率は活動期と非活動期で差を認めなかった。活動期ヘーチェット病と健常人の間にも同様の差がみられたが、非活動期ヘーチェット病と健常人の間に有意な差を認めなかった。

ヘーチェット病活動期に増加している $\gamma\delta$ T細胞がV δ 1とV δ 2いずれのT細胞受容体を有しているかを検討するため、 $\gamma\delta$ T細胞におけるV δ 1陽性細胞とV δ 2陽性細胞の比率を調べた。その結果、活動期ヘーチェット病では非活動期および健常人に比べてV δ 1/V δ 2比が有意に増加していた(図1)。さらに、V δ 1およびV δ 2陽性 $\gamma\delta$ T細胞におけるCD69⁺を発現する活性化T細胞の比率を検討した。CD69⁺活

活性化 T 細胞は V δ 1、V δ 2 のいずれにおいても活動期ヘーチェト病で非活動期、健常人に比へて増加していた(図 1)。

ヘーチェト病患者 2 例において、眼症状の急性増悪期および治療により軽快した時期の経時的な解析を行った。いずれの症例においても、活性化 CD3⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞の比率は症状の軽快とともに減少した。特に活動期に増加していた活性化 V δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の減少が顕著であった。

D 考察

活動期ヘーチェト病では CD69⁺ 活性化 CD8⁺ T 細胞および $\gamma\delta$ T 細胞の比率が増加し、特に $\gamma\delta$ T 細胞のうち V δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の増加が顕著であった。一方、予想に反して活動期患者で CD69⁺ 活性化 CD4⁺ T 細胞の増加は検出できなかった。非活動期ヘーチェト病と健常人における CD8⁺ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化状態には有意な差がなかったことから、活性化細胞傷害性リンパ球の活性化がヘーチェト病の病態に直接関与している可能性が考えられた。

今回の結果を一元的に説明する分子として MICA が挙げられる。MICA は V δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞のリガンドであり、MICA 発現細胞は V δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化を直接誘導する⁷⁾。一方、MICA は細胞傷害活性を持つ CD8⁺ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、NK 細胞に発現する killer activating receptor である NKG2D も結合し、これら細胞における細胞傷害活性を増強する⁸⁾。MICA の発現は粘膜上皮細胞、表皮細胞、血管内皮細胞などに限局し⁹⁾、その発現は熱などのストレスによって誘導される⁷⁾。したがって、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、傷ついた

細胞が $\gamma\delta$ 細胞をはじめとした細胞傷害活性を有するリンパ球によって認識されて除去される際の目印と考えられている。ヘーチェト病の臨床症状の悪化が細菌感染や機械的刺激により誘導されることから、これらストレスにより上皮や血管内皮で発現誘導される MICA を介した免疫応答が誘因となる可能性がある。ヘーチェト病患者では何らかの理由で MICA を介した免疫応答が亢進し、傷ついた細胞に対する免疫応答が過剰となるのかもしれない。その結果、組織傷害が過剰となりヘーチェト病に特徴的な病変の形成につながる可能性がある。この仮説については今後のさらなる検証が必要であるか、ヘーチェト病の病因、病態を解明する上で重要な知見と考えられる。

E 結論

活動期ヘーチェト病患者末梢血では活性化 CD8⁺ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞の比率が増加していた。さらに $\gamma\delta$ T 細胞のうち特に V δ 1 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の比率が増加し、ヘーチェト病の炎症性病態と関連する可能性が示された。

F 健康危険情報

特記すべきことなし。

<引用文献>

- 1) Mochizuki M, Morita E, Yamamoto S, et al Characteristics of T cell lines established from skin lesions of Behcet's disease J Dermatol Sci 15:9, 1997
- 2) Kaneko S, Suzuki N, Yamashita N, et al Characterization of T cells specific for an epitope of human 60-kD heat shock protein (hsp) in patients with Behcet's disease (BD) in Japan Clin Exp Immunol 108:204, 1997

3) de Smet MD, Dayan M Prospective determination of T-cell responses to S-antigen in Behcet's disease patients and controls Invest Ophthalmol Vis Sci 41 3480, 2000

4) Franssantio MA, Dammacco R, Cafforio P, et al Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease a putative pathogenic role of interleukin-12 Arthritis Rheum 42 1967, 1999

5) 岳野光洋、永俣裕子、松田隆秀、他 ヘーチェト病の自然免疫と獲得免疫 厚生科学研究ヘーチェト病に関する研究平成 13 年度研究報告書、2002, pp49-54

6) 金子史男、中村晃一郎、東條理子 ヘーチェト病患者末梢血白血球におけるケモカイン受容体の発現の関与について 厚生科学研究ヘーチェト病に関する研究平成 13 年度研究報告書、2002, pp60-63

7) Groh V, Steinle A, Bauer S, et al Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells Science 279 1737-1740, 1998

8) Bauer S, Groh V, Wu J, et al Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA Science 285 727-729, 1999

9) 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 93 12445-12450, 1996

G 研究発表

1 論文発表 なし

2 学会発表
安岡秀剛、水木信久、西田朋美、他 ヘーチェト病における細胞傷害性T細胞の活性化レベルの検討 第31回日本臨床免疫学会(東京) 2003 10

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 なし

3 その他 なし

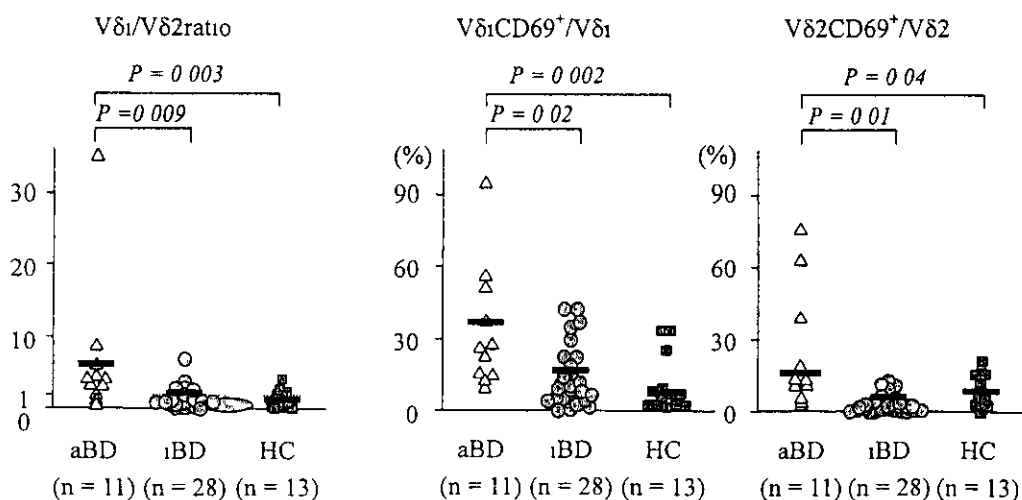


図1 活動期ヘーチェト病、非活動期ヘーチェト病および健常人におけるVδ1/Vδ2比およびVδ1およびVδ2陽性 $\gamma\delta$ T細胞におけるCD69 活性化細胞の比率 aBD 活動期ヘーチェト病 iBD 非活動期ヘーチェト病 HC 健常人

厚生科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

微生物由来 CpG DNA に対するヘーチェット病患者単核球の反応性の検討

研究協力者 佐藤由紀夫 福島県立医科大学医学部内科学第2講座教授

研究要旨 微生物由来のCpGモチーフを有するDNA (CpG DNA)は抗原提示細胞 (APC)を刺激し多量のIL-12、IFN- γ を産生させることにより免疫を活性化し、種々の自己免疫疾患の病態に関与することが明らかにされている。また、ヘーチェット病 (BD)の病態への細菌感染の関与が推定されていることより、BD患者末梢血単核球 (PBMC)のCpG DNAに対する反応性を検討した。その結果、BD患者PBMCは健常人PBMCに比しCpG DNAに対する反応性が高いことが示された。CpG DNAはAPCのToll like receptor 9 (TLR9)を介して免疫を活性化させることより、BD患者のTLR9の構造または機能に異常がある可能性が推測された。さらに、細菌由来核酸成分はCpG DNAを介してBDを増悪させる可能性が示されたことより、TLR9をターゲットにしたBDの新しい治療戦略が考えられる。

共同研究者

小林 浩子 福島県立医科大学第2内科 助手
関根 英治 福島県立医科大学第2内科 助手
坂本 夏美 福島県立医科大学第2内科大学院生

A 研究目的

微生物genome中に存在するCpG DNA [非メチル化シトシンの次がクアニンであるモチーフ (CpG motif)を有するDNA]は直接哺乳類のB細胞、樹状細胞、単核球を活性化して種々のTh1タイプの炎症性cytokine (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α)を産生させ、Th1タイプの免疫活性化を引き起こすアジュバント作用を有することを、研究協力者は報告してきた (Sato Y, et al. Science, 1996)。

近年、Th1タイプのアジュバント作用を有するCpG DNAと自己免疫疾患との関連が注目されており、自己抗原をCpG DNAとともに免疫することにより自己抗原に対する免疫寛容が破綻できることが明らかにされている (Bachmayer K, et al. Science 283, 1999)。また、ヘーチェット病 (BD) の病態に細菌感染が関与することが推定されている。

以上より、BDの病態に細菌由来のCpG DNAが関与するならば、BD患者ではCpG DNAに対する反応性が高まっている可能性がある。よって、BD患者末梢血単核球 (PBMC)と健常人PBMCでCpG DNAに対する反応性に差があるかを検討した。

B 研究方法

BD患者または健常人PBMCを 10^6 cells/mlのCpG DNAと共に3日間培養後、³H-Tを用いて細胞増殖assayを行った。また、培養上清を回収し、上清中のIL-6の濃度をELISAにて測定した。

(倫理面への配慮)

当大学の倫理委員会の承認を得、検体および情報の取り扱いについては倫理委員会の定める規定に従った。

C 研究結果

BD患者PBMCは健常人PBMCに比してCpG DNA刺激に対する増殖反応が有意に高まっていた (図1)。また、CpG DNA刺激前のBD患者PBMCからのIL-6産生は健常人PBMCからのIL-6産生に比して有意に高かったが、CpG DNA刺激前後でのBD患者PBMCからのIL-6産生量に有意差は認めなかった (図2)。

D 考察

BD患者では扁桃炎、齦炎、歯周炎が多くみられることから、連鎖球菌などの微生物感染が病因に関与すると考えられており、実際に *Streptococcus sanguis* 由来の抗原に対するアレルギー反応や感作リンパ球の存在が示されている。すなわち、これらの

細菌抗原に対して誘導された過剰な免疫反応が BD の病態に関与している可能性がある。近年種々の自己免疫疾患における微生物由来の免疫活性化物質の役割が注目されており BD においても細菌抗原に対する過剰な免疫反応の誘導にこれらの免疫活性化物質が関与している可能性がある。

微生物由来の免疫活性化物質として脂質、蛋白質、核酸がある。とくに、細菌核酸に含まれる CpG DNA は抗原提示細胞等に発現している TLR9 を介して強い免疫活性化作用を示し、自然免疫 (innate immunity) の重要な一構成要員として注目されている。よって BD 患者 PBMC と健常人 PBMC で CpG DNA に対する反応性に差があるかを検討したところ BD 患者 PBMC は健常人 PBMC に比して CpG DNA 刺激に対する増殖反応が有意に高まっていることが示された。

以上の結果は細菌由来核酸成分は CpG DNA を介して BD を増悪させる可能性を示しており TLR9 をターゲットとした BD の新しい治療戦略が考えられる。さらに BD 患者の TLR9 の構造または機能に異常があることが推測されたことより BD 患者群と健常人群との間において塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) を含めた TLR9 の遺伝子変異多型が存在する可能性がある。よって、現在我々は TLR9 genomic DNA の塩基配列を解読し健常人の TLR9 の塩基配列と BD 患者の塩基配列を比較し、変異または多型の検出を行なっている。

E 結論

BD 患者では細菌由来 CpG DNA に対する反応性が高いことが証明され、細菌由来核酸成分は CpG DNA を介して BD を増悪させる可能性が示された。さらに BD 患者の TLR9 の構造または機能に異常がある可能性が推測された。

F 健康危険情報

特記すべき事なし

G 研究発表

1 論文発表

1 Shishido S, Koga H, Harada M, Kumenu H, Hanada S, Taniguchi F, Kumashiro R, Ohira H, Sato Y, Namba M, Ueno J, Sata M. hydrogen peroxidase overproduction in megamitochondria of troglitazone-treated human hepatocytes

Hepatology 37 2003, 136-147

2 Ohira H, Takeda J, Rai T, Shishido S, Sato Y. Two cases of primary biliary cirrhosis complicated with syringomyelia. Am J Gastroenterol, 98, 2003, 224-226

3 Irisawa A, Obara K, Bhutani MS, Saito A, Shishido H, Shibukawa G, Takagi I, Yamamoto G, Seino O, Shishido I, Kasukawa R, Sato Y. Role of para-esophageal collateral veins in patients with portal hypertension based on the results of endoscopic ultrasonography and liver scintigraphy analysis. J Gastroenterol Hepatol, 18, 2003, 309-14

4 Ohira H, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Rai T, Shishido S, Sato Y. Adhesion molecules and CXC chemokines in endotoxin-induced liver injury. Fukushima J Med Sci 49, 2003, 1-14

5 Rai T, Ohira I, Yojo J, Takiguchi J, Shishido S, Sato Y, Nozawa Y, Masuda I. A case of hepatic inflammatory pseudotumor with primary biliary cirrhosis. Hepatol Res, 26, 2003, 249-253

6 Ohira H, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Rai T, Shishido S, Sato Y. Adhesion molecules and CXC chemokines in endotoxin-induced liver injury. Fukushima J Med Sci 49 (1), 2003 1-13

7 Kobayashi H, Watanabe H, Seino I, Suzuki S, Sato Y. Quantitative imaging of cerebral blood flow using SPECT with 123I-iodoamphetamine in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. J Rheumatol, 30, 2003, 2076-2077

8 Nakamura N, Yoshida S, Shinzawa J, Yoshida S, Sasaki Y, Sato M, Ito I, Kumashima S, Sato Y, Abe M. Signet ring cell lymphoma. J Clin Exp Hematopathol, 43 (2), 2003, 71-76

9 Shibukawa G, Irisawa A, Obara K, Takagi I, Yamamoto G, Hikichi I, Oyama J, Sato N, Saito A, Takiguchi I, Sakamoto H, Sato Y. Variceal recurrence after endoscopic sclerotherapy associated with the perforating veins in lower esophagus independently. Hepato-Gastroenterology (in press)

10 Ohira H, Takiguchi J, Rai T, Abe K, Yokokawa J, Sato Y. High frequency of anti-ribosomal P antibody in patients with systemic lupus erythematosus-associated hepatitis. Hepatol Res (in press)

II Ito J, Ohira H, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Rai I, Shishido S, Sato Y, Kasukawa R. Autoimmune hepatitis accompanied by systemic lupus erythematosus. Internal Med (in press)

2 学会発表
なし

II 知的財産権の出願, 登録状況
なし

Proliferative responses of PBMC to CpG DNA

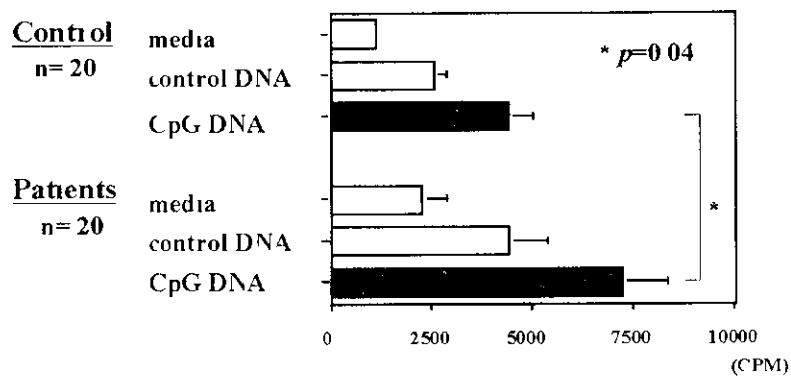


図 1

IL-6 production from PBMC stimulated by CpG DNA

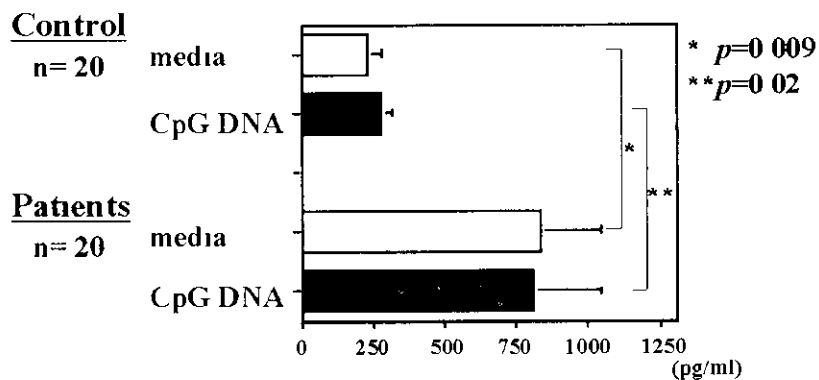


図 2

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

ヘーチェノト病に関する調査研究

Behcet 病における IL-12p40 および IRF-1 プロモーター領域の遺伝子多型解析

分担研究者	金子史男	福島県立医科大学医学部皮膚科学教室教授
共同研究者	柳堀浩克	福島県立医科大学 皮膚科学講座
	井上智子	福島県立医科大学 皮膚科学講座
	東條理子	福島県立医科大学 皮膚科学講座
	尾山徳孝	福島県立医科大学 皮膚科学講座
	中村晃一郎	福島県立医科大学 皮膚科学講座
	西田朋美	横浜市立大学 医学部眼科
	水木信久	横浜市立大学 医学部眼科

研究要旨 Behcet 病 (BD) における慢性炎症に Th1 型サイトカインが重要な役割を果たしている。今回我々はその産生調節に関与する IL12 p 40 の SNP 解析と Interferon regulatory factor (IRF) 1 プロモーター領域について検討した。IL12 p 40 の untranslated region の single nucleotide polymorphism (SNP) 解析は BD 患者 85 例、健康人 65 例を対象とし、末梢血有核細胞より抽出した genomic DNA を PCR で増幅した後、IL12p40 の SNP は制限酵素 Taq I で RFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析をおこなったところ、BD 患者群と正常人群間でアリル C がやや増加傾向を示すものの有意差を認めなかった。次に IRF 1 promoter の SNP は制限酵素 Bal I を用いて RFLP 解析をおこなったところ、こちらも有意差を認めなかった。今後はさらに検体数を増やし解析をする必要かあると思われる。

- A 背景 BD と IL 12 に関して、活動期の BD では Th1 型サイトカインである IFN γ 、IL12 の産生量が増加している報告や、病勢に応じて Th1 と Th2 のバランスが変化すると報告されている。BD の病態には種々の細胞性免疫機序が関与すると考えられており特に Th1 型サイトカインの産生調節を行う IL12 が病態に深く関与していると思われる。(図 1)
- B 研究目的 Th1 優位型の疾患で重要な役割を果たしている IL12 と IRF 1 について BD 患者における遺伝子的検討を行う事を目的としてこれまでの報告をもとに IL 12 p40 の SNP 解析 (図 2)、IRF 1 の SNP 解析 (図 3) を行った。
- C 方法 BD 患者 85 名 正常人 65 名より genomic DNA を抽出し PCR で増幅した後、IL12 p40 では制限酵素 TaqI を用いて restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析を行った。次に IRF 1 promoter の SNP は PCR で増幅した後制限酵素 Bal I を用いて RFLP 解析をおこなった。これらの結果を、HLA B51 の有無、病型で分別して統計的に解析を行なった。
- D 結果 IL12p40 の allele は BD 患者で alleleA 80、alleleC94、健康人コントロールでは alleleA 66 alleleC64 であった。Genotype は BD 患者で A/A 16、

A/C 48、C/C 23、健常人コントロールで A/A 16、A/C 48、C/C 23 であった。これらの結果を Fisher's exact test で統計処理したところ、BD 群と正常人群で有意差はみられなかった (図 5)。IRF 1 の allele は BD 患者で alleleA 44、alleleG130、健常人コントロールでは alleleA 37 alleleG93 であった。Genotype は BD 患者で A/A 16、A/G 48 G/G 23、健常人コントロールで A/A 16 A/G 48、G/G 23 であった。これらの結果を Fisher's exact test で統計処理したところ BD 群と健常人群で有意差はみられなかった (図 5)。

E 考按 今回は IL 12 p40 と IRF 1 の SNP 検索において有意差を認めなかったか、BD 群の検体数が 85 と少ないため、今後はさらに検体数を増やし解析をする必要があると思われる。さらに、これまでの報告より IRF 1 プロモーター領域の SNP において GenotypeA/A の Th1 型サイトカイン増加という報告を元に Genotype 別の Th1 型サイトカイン産生量を調べると要かあると思われる。

G 研究発表 ヘーシェント病に関する調査研究 平成 15 年度第 2 回研究会 (H15 1 16 福島)

H 文献

- 1) MA Hall E mcGhann et al Genetic polymorphism of IL 12 p40 gene in immunemediated disease Gene Immun 2000 1 219 24
- 2) Hidetsugu S, Shimichiro T et al The detection of IRF 1 promoter polymorphism and their possible contribution to T helper 1 response in chronic hepatitis C J Interf Cytok Res 2002 22 693 700

図の説明

- 図 1 これまでに報告のあった BD と IL12 に関する報告
- 図 2 IL 12 p40 の UTR における SNP 部位と制限酵素 TaqI のサイト
- 図 3 IRF 1 プロモーターにおける SNP 部位と制限酵素 BalI のサイト
- 図 4 方法
用いた PCR プライマー、IL 12p40 は制限酵素 TaqI での RFLP 解析を行った。IRF 1 プロモーターは制限酵素 BalI での RFLP 解析を行なった。
- 図 5 IL 12 p40 の結果
BD 群と正常人群で有意差を認めない。
- 図 6 IRF 1 プロモーターの結果
BD 群と正常人群で有意差を認めない。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
ヘーチェント病に関する調査研究
分担研究報告書

ヘーチェント病における抗菌蛋白質 granulysin の関与についての研究

分担研究者 岩月啓氏 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚 粘膜 結合織学 教授
共同研究者 山崎 修 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚 粘膜 結合織学
森實 真 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚 粘膜 結合織学
大野貴司 岡山大学大学院医歯学研究科皮膚 粘膜 結合織学

研究要旨 GranulysinはT細胞、NK細胞より放出されるタンパクで、細菌、真菌などに対し強力な抗菌活性を有するとともに抗ウイルス活性についても報告され、細胞傷害性T細胞の活性の指標とも考えられている。我々はヘーチェント病の病態、病変形成におけるgranulysin発現リンパ球の関与について研究した。免疫染色では毛嚢炎、口腔内アフタ、外陰部潰瘍にgranulysin陽性細胞を認めた。結節性紅斑では陽性細胞を認めなかった。またELISAによりgranulysinの血清中濃度を測定した。9例中1例に異常高値を認めただけ、その症例にヘーチェント病の活動性、感染徴候は認めなかった。活動性のある病期の測定も行い、ヘーチェント病におけるgranulysin発現リンパ球の病因的意義との関連を評価する必要があると考えられた。

A 研究目的

ヘーチェント病の病変部に侵潤する細胞はTに好中球であるか、多数のリンパ球の侵潤も認める。GranulysinはT細胞、NK細胞より放出されるタンパクで、細菌、真菌などに対し強力な抗菌活性を有するとともに抗ウイルス活性についても報告されている。また、細胞傷害性T細胞の活性を示す指標とも考えられている。我々はヘーチェント病の病変形成と、本症における細胞傷害性T細胞活性を評価するマーカーとしてのgranulysinの関与について研究した。

B 研究方法

ヘーチェント病の皮膚、粘膜病変（毛嚢炎、口腔内アフタ、陰部潰瘍、結節性紅斑）におけるgranulysinの発現を免疫染色法で検討した。さらにgranulysinを発現している細胞を同定するためgranulysinとリンパ球表面マーカー（CD3、4、8）をそれぞれヒオチン標識二次抗体とFITC標識二次抗体を用いて二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

また岡山大学医学部歯学部付属病院、岡山済生会総合病院に通院するヘーチェント病の患者9例について、血清中granulysin濃度をELISAによって測定した。

（倫理面への配慮）

十分なインフォームドコンセントにより検体をご提供頂いた。

C 研究結果

免疫染色では毛嚢炎、外陰部潰瘍、口腔内アフ

タにおいてはほぼ全例でgranulysinが発現していたか、結節性紅斑では発現していなかった（表1）、（図1）。共焦点レーザー顕微鏡による観察では毛嚢炎においてgranulysinがCD4+細胞に発現していた。

血清中granulysin濃度は8例では低値を示していたか、例だけ5674ng/ml（健康人の平均は37ng/ml）と高値を示した。しかしながらこの症例は採血時、ヘーチェント病の活動性はほとんどなく、また急性ウイルス感染症を疑う臨床症状、血液学的データも全く認めなかった。

D 考察

ヘーチェント病の病変部において侵潤している細胞はTに好中球であるか、リンパ球も多く侵潤している。GranulysinはT細胞、NK細胞の細胞傷害性分子を含む顆粒から放出されるタンパクで、細菌、真菌などに対し強力な抗菌活性を有するとともに抗ウイルス活性も報告されている。さらに腫瘍細胞、ウイルス感染細胞のアポトーシスを誘導するとも報告されている。

我々の行った免疫染色ではヘーチェント病患者の毛嚢炎、口腔内アフタからgranulysinの発現が確認され、病変部形成に関与している可能性が示唆された。しかしながら結節性紅斑部ではgranulysinは発現を認めなかった。これらの結果は、本症における毛嚢炎や口腔内アフタと外陰部潰瘍の形成には細胞傷害性T細胞が関与しているか、結節性紅斑の形成は組織病

因的には異なる機序が働いている可能性を示唆する。

Granulysinの血清中濃度は急性ウイルス感染症などで一過性に高値を示すとされている。今回の測定では9例中1例に高値を認めたかヘーチェント病の活動性なし、急性ウイルス感染症を示唆する所見もなく原因が不明であった。今回の9例はいずれも病勢的に落ち着いた症例ばかりであり、発症時や急性増悪時などの活動性の高い状況での測定も検討する必要があると考えられた。

E 結論

ヘーチェント病の毛嚢炎、外陰部潰瘍、口腔内アフタでgranulysinの発現を認めた。しかし結節性紅斑部のリンパ球にはgranulysinの発現は認めなかった。

ヘーチェント病患者におけるgranulysin血清中濃度を測定したか病態・病勢との関連は不明であった。

F 健康危険情報

特記事項なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) T Ono, S Morizane, O Yamasaki, Y Shirafuji, W-K Huh, H Akiyama, and K Iwatsuki. Involvement of granulysin-producing T-cells in the development of superficial microbial folliculitis. *Br J Dermatol* 2004 in press
- 2) Akiyama H, Morizane S, Yamasaki O, Oono T, and Iwatsuki K. Assessment of *Streptococcus pyogenes* microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy. *J Dermatol Sci* 32: 193-9, 2003
- 3) Akiyama H, Hamada T, Huh W-K, Yamasaki O, Oono T, Fujimoto W and Iwatsuki K. Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in skin lesions of bullous impetigo, atopic dermatitis and pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol* 148: 526-32, 2003
- 4) Oono T, Huh W-K, Shirafuji Y, Akiyama H, Iwatsuki K. Localization of human beta-defensin -2 and human neutrophil peptides in superficial folliculitis. *Br J Dermatol* 148: 171-92, 2003

2 学会発表

- 1) 山崎修 森實真、大野貴司 岩月啓氏。ヘーチェント病におけるgranulysinの関与についての研究。ヘーチェント病に関する調

査研究平成15年度第1回研究班会議 (H15 7 18福島)

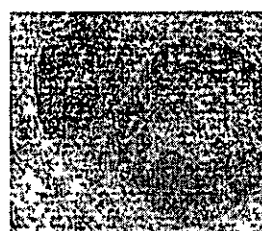
- 2) 森實真、山崎修、大野貴司、岩月啓氏、片山治子、小川一行、水田欽也。ヘーチェント病患者におけるgranulysinの血清中濃度について。ヘーチェント病に関する調査研究平成15年度第2回研究班会議 (H16 1 16 福島)
- 3) T Ono, O Yamasaki, W-K Huh, H Akiyama and K Iwatsuki. Involvement of granulysin-producing T-cells in the development of superficial microbial folliculitis. The fourth Joint Meeting of the ESDR (European Society for Dermatological Research), JSID (Japanese Society for Investigative Dermatology) and SID (Society for Investigative Dermatology), Miami, April 30-May 4, 2003

II 知的財産権の出願 登録状況

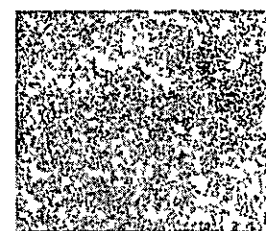
特記事項なし

表1 ヘーチェント病の皮膚・粘膜病変におけるgranulysinの発現

皮膚・粘膜病変	陽性例/症例数
毛嚢炎	4/4
外陰部潰瘍	3/3
口腔内アフタ	3/4
結節性紅斑	0/9



毛嚢炎(+)



口腔内アフタ(+)



外陰部潰瘍(+)

図1 皮膚・粘膜病変におけるgranulysinの発現

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

ヘーチェノト病に関する調査研究

ヘーチェノト病(BD)における血清 IP 10 値の検索と表皮ケラチノサイト(KC)の STAT-1 転写調節因子の制御に関する研究

分担研究者 中村晃一郎 福島県立医科大学医学部皮膚科学教室
共同研究者 王 宏偉 福島県立医科大学 皮膚科学講座
柳堀浩克 福島県立医科大学 皮膚科学講座
尾山徳孝 福島県立医科大学 皮膚科学講座
全子史男 福島県立医科大学 皮膚科学講座教授

研究要旨

ヘーチェノト病(BD)では患者末梢血に CXCR3 陽性 T 細胞の増加を認め、末梢血 Th₁、TC₁ 優位な病態の関与が報告されている。BD 患者の血清 CXCL10/IP 10 濃度について検討した。健康人(n=15)、BD 患者(n=27)の血清 IP 10 値はそれぞれ 239.4pg/ml、155.7pg/ml であった。BD 病変部における STAT 1 発現について免疫組織学的に検討したところ IP 10/CXCR3 promoter 領域に存在する STAT 1 発現は BD 病変部の表皮基底層、ならびに浸潤白血球に強く認められた。また表皮 KC 細胞株である HaCaT 細胞の STAT 1、NFκB 転写調節活性について検索したところ表皮 KC 細胞の STAT 1 および NFκB 転写活性は TNF α、IFN γ によって増強し、NFκB 転写活性は genistein によって抑制を受けた。これらの結果は BD において STAT 1、NFκB 転写活性の亢進を示唆しており、BD における STAT 1、NFκB を標的とした治療の可能性を示唆していると考えられた。

- A 背景 BD では患者末梢血に CXCR3 陽性 T 細胞の増加を認め、末梢血 Th₁、TC₁ 優位な病態の関与が報告されている。また Th₁ 細胞から産生される IFN γ を解する伝達経路には signal transducer and activator of transcription 1 (STAT 1) を解する経路が重要であると考えられる。IP 10/CXCL10 は Th₁ の病変部遊走、活性化に関与するサイトカインであり、その promoter 領域に STAT 1、NFκB が存在する。
- B 研究目的 Th₁ 細胞の遊走活性化に関与する IP 10/CXCL10 血清値を検討する。また IP 10 遺伝子 promoter 領域に存在する STAT 1 転写活性について検討する。
- C 方法 BD 患者 27 名、健康人 15 名より血清 IP 10/CXCL10 値を検討した。血清 IP 10 値は健康人 239.4pg/ml、BD 患者 155.7pg/ml であった。免疫組織学的に BD 患者病変部皮膚から STAT 1 発現について検討した。STAT 1 は BD 患者病変部表皮基底層、および浸潤白血球に強く発現していた。表皮角化細胞である HaCaT 細胞を用いて STAT 1 転写活性調節について gel shift 法によって検討した。STAT 1 活性は IFN γ (10μg/ml)、TNF α (10μg/ml) によって増強し、刺激後 60 分で最高値を示した。ノクロスポリン (10⁻⁶ - 10⁻¹²M) による STAT 1 転写活性抑制は軽度であった。genistein (5μM)、LY294002 (20μM) による

STAT1 転写活性抑制は 110/122, 99/122 であった。NFκB は IFN γ、TNF α によって増強し、この増強は genistein LY294002 によって抑制を受けた。63/96, 83/96 であった。

D 考按 BD 患者血清中の IP 10/ CXCL10 濃度が健康人と比較して有意差を見なかったことは、IP 10 かむしろ血中ではなく、病変部皮膚で発現亢進がある可能性を示している。病変部皮膚では表皮角化細胞および浸潤白血球で、IP 10 遺伝子 promoter 領域に存在する STAT1 転写活性発現を認めたことから、BD 病変部には STAT1 亢進がみられ、IFN γ 産生亢進に関わるシグナルとして重要であると考えられた。また表皮角化細胞の STAT1 転写活性には、NFκB とともに IFN γ、TNF α によって増強し、IFN γ によってこれらの転写活性が調節を受けていることが確認された。また NFκB 転写活性は LY294002 genistein で抑制されたことから PI-3kinase tyrosine kinase の経路の関与が認められた。BD の病態にこれらの経路が重要であると考えられた。

E 研究論文

Tsunemi Y, Nishibu A, Saeki H, Oyama N, Nakamura K, Kishimoto M, Mitsui H, Tada Y, Torii H, Komine M, Asahina A, Kaneko F, Tamaki K. Lack of Association between the Promoter Polymorphisms at Positions 308 and 238 of the Tumor Necrosis Factor Alpha Gene and Psoriasis vulgaris in Japanese Patients. *Dermatology* 207:371-4, 2003

Kagami S, Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Nakamura K, Takekoshi T, Kishimoto M, Mitsui H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. Significant elevation of serum levels of eotaxin 3/CCL26, but not of eotaxin 2/CCL24 in patients with atopic dermatitis: serum eotaxin 3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 134:309-13, 2003

Tsunemi Y, Sekiya T, Saeki H, Hui H, Ohta K, Nakamura K, Kakinuma T, Fujita H, Asano N

Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. Lack of association of CCR3 single nucleotide polymorphism with atopic dermatitis in Japanese population. *J Dermatol Sci* 33:130-3, 2003

Isunemi Y, Idezuki T, Nakamura K, Tamaki K. Dermal endothelial cells express eotaxin in hypereosinophilic syndrome. *J Am Acad Dermatol* 49:918-21, 2003

Xiao T, Fujita H, Saeki H, Mitsui H, Sugaya M, Tada Y, Kakinuma T, Torii H, Nakamura K, Asahina A, Tamaki K. Thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17) produced by mouse epidermal Langerhans cells is upregulated by TNF alpha and IL4 and downregulated by IFN gamma. *Cytokine* 7:23-32, 2003

Zheng X, Nakamura K, Tojo M, Akiba H, Oyama N, Nishibu A, Kaneko F, Tsunemi Y, Kakinuma T, Saeki H, Tamaki K. Ultraviolet A irradiation inhibits thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17) production by a human keratinocyte HaCaT cell line. *Eur J Dermatol* 13:348-53, 2003

Takahashi T, Nakamura K, Chiba S, Kanda Y, Tamaki K, Hui H. V alpha 24(+) natural killer T cells are markedly decreased in atopic dermatitis patients. *Hum Immunol* 64:586-592, 2003

Sugaya M, Nakamura K, Mitsui H, Takekoshi T, Saeki H, Tamaki K. Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1. *J Dermatol Sci* 31:179-87, 2003

Tsunemi Y, Ihn H, Nakamura K, Tamaki K. Post transplantation chronic graft versus host disease with overlapping features similar to those of various collagen diseases. *Int J Dermatol* 42:292-4, 2003

Wakugawa M, Nakamura K, Kakinuma T, Tamaki K. CC Chemokine Receptor 4 as a Possible Target for Therapy of Atopic Dermatitis. *Drug News Perspect* 15:175-9, 2003

Xiao T, Kagami S, Saeki H, Sugaya M, Kakinuma T, Fujita H, Yano S, Mitsui H, Torii H, Komine M, Asahina A, Nakamura K, Tamaki K. Both IL4 and IL13 inhibit the TNF alpha and IFN gamma enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. *J Dermatol Sci* 31:111-7, 2003

Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Asano N, Mitsui H, Tada Y, Wakugawa M, Watanabe T, Torii H, Komine M, Asahina A, Nakamura K, Tamaki K. Increased serum cutaneous T cell attracting chemokine (CCL27) levels in patients

with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris J Allergy Clin Immunol 111 592 7 2003

Zheng X Nakamura K, Furukawa H, Nishibu A, Takahashi M, Tojo M, Kaneko F, Kakinuma T, Tamaki K Demonstration of TARC and CCR4 mRNA expression and distribution using in situ RT-PCR in the lesional skin of atopic dermatitis J Dermatol 30 26 32, 2003

Kakinuma T, Wakugawa M Nakamura K, Hino H, Matsushima K, Tamaki K High level of thymus and activation regulated chemokine in blister fluid and sera of patients with bullous pemphigoid Br J Dermatol 148 203 10 2003

Kakinuma T, Sugaya M Nakamura K, Kaneko F, Wakugawa M, Matsushima K, Tamaki K Thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17) in mycosis fungoides serum TARC levels reflect the disease activity of mycosis fungoides J Am Acad Dermatol 48 23 30 2003

Saeki H, Kakinuma T, Wakugawa M Nakamura K, Tamaki K Atopic dermatitis and chemokines Role of TARC/CCL17 and MDC/CCL22 in the pathogenesis of atopic dermatitis In Pandala SG, Editor Recent Research Developments in Allergy & Clinical Immunology Vol 3 Kerala Research Signpost 23 36 2003

Tojo M, Zheng X, Yanagihori H, Oyama N, Takahashi K Nakamura K, Kaneko F Detection of herpes virus genomes in skin lesions from patients with Behcet disease and other related inflammatory diseases Acta Derm Venereol 83 14 2003

Tojo M, Yanagihori H, Zheng X, Oyama N, Isogai E, Kimura K Nakamura K, Kaneko F Beta 1 DNA fragment encoding streptococcal antigen in skin lesions from patients with Behcet's disease Journal of Applied Research 3 232 8 2003

Tojo M, Kiyosawa H, Iwatsuki K, Nakamura K, Kaneko F Expression of the GLI2 oncogene and its isoforms in human basal cell carcinoma Br J Dermatol 148 892 897 2003

Sakuma Oyama Y, Nishibu A, Oyama N, Saito M Nakamura K, Kaneko F A case of recurrent cutaneous eosinophilic vasculitis successful adjuvant therapy with suptast tosilate Br J Dermatol 2003

Kawakami Y, Nishibu A, Kikuchi S, Ohtsuka M Nakamura K, Nozawa Y, Abe M, Iwatsuki K, Kaneko F Multicentric Castleman's disease associated with inherited epidermolysis bullosa J Dermatol 30 689 93 2003

Nishibu A, Hashiguchi T, Yotsumoto S, Takahashi M Nakamura K, Kaneko F A frameshift

mutation of the ED1 gene in sibling cases with X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia Dermatology 207 178 81 2003

Tojo M, Yanagihori H, Zheng X, Oyama N, Isogai E, Nakamura K, Kaneko F Detection of microbial DNA in skin lesions from patients with Behcet's disease Adv Exp Med Biol 528 185 90, 2003

Kaneko F, Nakamura K, Sato M, Tojo M, Zheng X, Zhang JZ Epidemiology of Behcet's disease in Asian countries and Japan Adv Exp Med Biol 528 25 9, 2003

F 文献

- 1) STAT 1 polymorphism and their possible contribution to T helper 1 response in chronic hepatitis C J Interf Cytok Res 2002;22 693 700

図の説明

図1 ヘーチェット病皮膚疹部の STAT 1 染色性。表皮ケラチノサイト 真皮浸潤白血球に STAT 1 陽性所見を認める。

図2 表皮ケラチノサイトの STAT 1 転写活性 (gel shift assay)。

図3 ケラチノサイトの NFκB 転写活性に対するサイトカインの作用。

NfκB 活性は TNF α IFN-γ によって増強し、genistein によって部分的に抑制される。

図1 ヘーチェット病皮膚疹部のSTAT 1染色

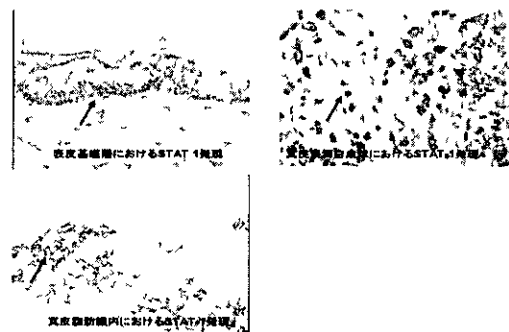


図2 表皮ケラチノサイトのSTAT-1転写活性

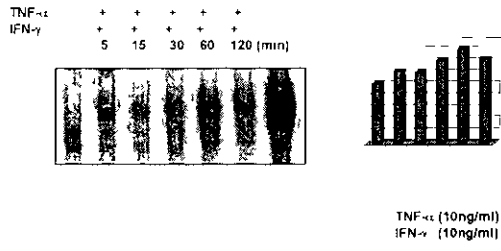
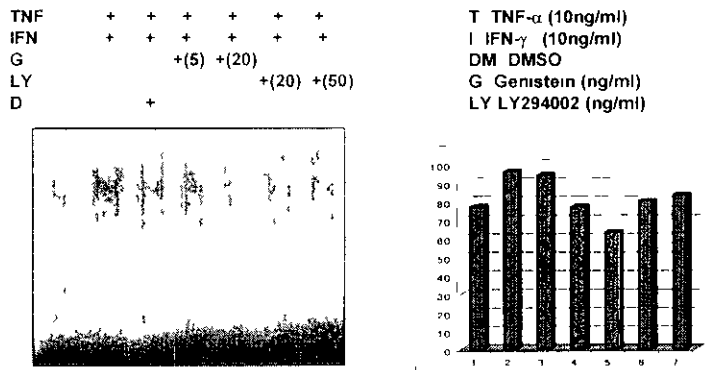


図3 KCの NF κ B (p65)転写活性に対する IFN- γ TNF- α の増強作用と genistein LY294002によるNF κ B (p65)転写活性の抑制



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
ヘーチェント病に関する調査研究
分担研究報告書
パン酵母マンナンに対するヘーチェント病患者血清の反応性
－疾患コントロールとの比較

分担研究者	磯貝恵美子	北海道医療大学歯学部口腔衛生
研究協力者	松尾幸毅	産業技術総合研究所
	磯貝 浩	札幌医科大学医学部実験動物施設
	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
	大神一侓	北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野
	杉山俊郎	北海道大学大学院医学研究科消化器病学分野
	小能恵二	岡山大学医学部細菌学教室
	東條理子	福島県立医科大学医学部皮膚科
	金子史男	福島県立医科大学医学部皮膚科

研究要旨

Anti-*Saccharomyces cerevisiae* Mannan 抗体 (ASCA) はクローン病 (CD) と潰瘍性大腸炎 (UC) との鑑別診断に用いられている。この抗体は CD にかきらず、いくつかの炎症性疾患でも陽性となることか報告されている。我々はヘーチェント病 (BD) 患者で抗体陽性率および抗体価は健常対照者に比較して有意に高いことを見つけた。ASCA-IgA は 13/30 (BD), 14/25 (CD), 4/31 (UC), 1/8 (VKH), 0/6 (Sar), 4/22 (その他), ASCA-IgG は 8/30 (BD), 19/25 (CD), 3/31 (UC), 0/8 (VKH), 1/6 (Sar), 1/22 (その他) で陽性であった。健常対照者ではどちらも 3/50 に陽性が認められた。BD における陽性率および抗体価はともに CD と UC の中間的な値をとることかわかった。マンノース結合レクチン (MBL) 定量については結合活性および単クローン性抗体を用いたサントイノチ ELISA を試みたか、どちらの方法を用いてもそれぞれの疾患と健常者との間に有意差は見られなかった。

A 研究目的

抗 *Saccharomyces cerevisiae* マンナン抗体 (ASCA) はクローン病 (CD) のマーカーとして知られている。この抗体は CD にかきらず、いくつかの炎症性疾患でも陽性となることか報告されている。ヘーチェント病 (BD) 患者では ASCA についてまったく異なる 2 つの意見か存在している。そこで、ASCA の意義を探る目的で患者血清を調べた。あわせて、マンノース結合レクチン (MBL) の定量を行った。

B 研究方法

対象疾患としてはフトウ膜炎を呈する BD 疾患コントロールとして VKH, サルコイドーシスなどを さらに ASCA か陽性となる疾患として CD, UC との鑑別診断で ASCA 陽性

率か低い UC を調べた。

ASCA の検出にはマイクロプレートに *Saccharomyces cerevisiae* Mannan をコートした ELISA によって IgA および IgG 抗体を調べた。MBP の検出には 2 つの方法を選択した。すなわち、マンナンをコートしたマイクロプレートを用いた Binding assay および 2 種類の MBL に対する単クローン性抗体を用いたサントイノチ ELISA を用いた。

C 研究結果

BD 患者では陽性率および抗体価ともに健康成人に比べて高かった。30 人中 13 人 (43.3%) で IgA 抗体か陽性となった (図 1)。CD 患者では 25 人中 14 人 (56.0%) で IgA 抗体か陽性となった。一方 健康成人やコントロール疾患では陽性率は低かった。BD 患

者では IgG 抗体は 8 人 (26.7%) が陽性を示した (図 2)。CD 患者では IgG 抗体は 19 人 (76.0%) が陽性を示した。一方、健康成人やコントロール疾患では陽性率は低かった。BD 患者における抗体価分布パターンを見ると、IgA 抗体価ではカントオフ値周辺と高い抗体価を示す 2 つの群が存在していた (図 3)。IgG 抗体価では健康成人と同レベルのカントオフ以下の群、カントオフ周辺群、高い抗体価を示す群の 3 つに分かれた。また、IgG 単独陽性を示す患者はいなかった。

ASCA 陽性の理由に障害を受けた粘膜からマンナン抗原が流入し、MBL による中和が不全であったため抗原認識されるという仮説を立てた。そこで、血中 MBL 定量の結果に差があるかどうか調べた。Mannose-binding assay, サントインチ LI ISA とちらの方法を用いても健康成人との間に差はなかった (図 4 および 5)。また、他の疾患コントロールにおいても健康成人と差は見られなかった。以上のように、MBL はどの疾患についても健康成人との間に有意な差はなかった。

D 考察

BD 患者では ASCA-IgA 陽性率は 43.3% と健康成人に比べて高いたくなく、疾患コントロールに比べても高かった。このことは ASCA の測定は CD だけでなく、BD でも応用できることを示している。特に、消化管 BD では類症鑑別を必要とする疾患があるため、その鑑別に利用できるかもしれない。一方 CD は ASCA 陽性となる代表疾患である。この病態と BD との大きな違いは IgG 抗体価が CD の方が著明に高いことである。同様に陽性を示した場合でも、こうしたことを踏まえれば有用可能となるであろう。

ASCA 陽性率を諸外国と比較すると、日本では 43.3%、イスラエルでは 48.1%、韓国では 41.7% であった。一方、健康成人では通常 10% 前後が陽性になるにもかかわらず、フランスではわずか 3% の BD 患者が陽性を示したにすぎない。少なくとも、ノルクロートラインで日本と同様高い抗体価が示されたことは、外因として共通の要素があると考えられる。

ASCA 産生のメカニズムには粘膜ハリヤ

一が破壊されることと特殊なフローラが関連しているのかもしれない。口腔微生物由来のマンノース繰り返し構造や N-アセチルグルコサミンの糖鎖は Macrophage mannose receptor (MMR) dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN) を介して抗原として認識される。このプロセスでは単に免疫応答が誘導されるだけでなく、T 細胞の活性化が起こること知られている (図 6)。BD における炎症と自己免疫様病態にはこのようなメカニズムが関与するのかもしれない。

ASCA 産生に MBL の低下が関与するのかもしれないという仮説を立てた。すなわち、自然免疫機構として存在する MBL が低下すると体内に流入したマンナンなどは中和されない。それを効率よく取り除くために特異的免疫機構が働き、抗体が産生されるというものである。しかし、実際に結合活性およびサントインチ LI ISA で MBL を定量してみると、差はなかった。MBL の低下と ASCA 産生は無関係か、あるいは病状がすでに安定しているため MBL は正常レベルであるのか、また全く別の理由なのかは現在のところ不明である。

E 結論

- 1 BD 患者では陽性率および抗体価ともに健康成人や疾患コントロールに比べて高かった。
- 2 陽性率はノルクロートラインの諸外国とほぼ同程度であった。
- 3 MBL を定量したところ、どの疾患についても健康成人との間に有意な差は見られなかった。

F 健康危険情報

特記事項なし。

G 研究発表

- 1 論文発表
著書

- 1 Isogai, E., Hirata, M, Isogai, H, Matuso, K, Kimura, K, Yokota, K, Oguma, K, Tojo, M, Kaneko, F, Kotake, S, and Ohono, S
Antimicrobial activity of synthetic

- human CAP18 peptides to *Streptococcus sanguis* isolated from patients with Behcet's disease In Adamantiades Behcet's disease (Ed C C Zouboulis), Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol 528, Kluwer Academic/Pleenum Publishers, New York, P 195 200 2003
- 2 Kaneko, F, Tojo, M, Sato, M, and Isogai, E The role of infectious agents in pathogenesis of behcet's disease In Adamantiades Behcet's disease (Ed C C Zouboulis), Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol 528, Kluwer Academic/Pleenum Publishers, New York, P 181 184, 2003
 - 3 Tojo, M, Yanagihori, H, Zheng X Oyama, N, Isogai, E, Nakamura, K, and Kaneko, F Detection of Microbial DNA in skin lesions from patients with Behcet's disease In Adamantiades Behcet's disease (Ed C C Zouboulis), Advances in Experimental Medicine and Biology Vol 528, Kluwer Academic/Pleenum Publishers, New York P 185 190 2003
- 総説
- 1 磯貝忠美子、磯貝 浩 畜産の研究特集号「人獣共通感染症」ライム病 2003
 - 2 磯貝忠美子、磯貝 浩 ライム病 モタノメティア 49 (11) 308-314, 2003
 - 3 Zierhut M, Mizuki N, Ohno S Inoko H, Gul A Onoe K, Isogai E Immunology and functional genomics of Behcet's disease Cell Mol Life Sci 2003 Sep;60(9) 1903 22
- 原著
- 1 Kobayashi Sakamoto M, Isogai E, Hirose K *Porphyromonas gingivalis* modulates the production of interleukin 8 and monocyte chemotactic protein 1 in human vascular endothelial cells Current Microbiology, 46, 109 114, 2003
 - 2 Tana S Watarai, E Isogai, K Oguma Induction of intestinal IgA and IgG antibodies preventing adhesion of verotoxin producing *Escherichia coli* to Caco 2 cells by oral immunization with liposomes Lett Appl Microbiol 36 135 139, 2003
 - 3 Tomoyasu, T, Takaya, A Isogai, E, and Yamamoto, T Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for Salmonella flagellum biogenesis, by the ATP dependent ClpXP protease Molecular Microbiol 48(2) 443 452, 2003
 - 4 Isogai E, Isogai, H, Kotake, S, Ohno, S, Kimura, K, Oguma K Role of *Streptococcus sanguis* and traumatic factors in Behcet's disease J Appl Res 3(4), 64 75, 2003
 - 5 Isogai, E, Isogai, H, Matsuo, K, Hirose, K, Kowashi, Y, Okumura, K, Hirata, M Sensitivity of genera *Porphyromonas* and *Prevotella* to the bactericidal action of C terminal domain oh human CAP18 and its analogues Oral Microbiol Immunol 18 329 332, 2003
 - 6 Nishikawa, T Isogai E, Isogai, H, Ikeno, H, Kimura, K Takechi, H, Fujiwara, Y, Ogimura, S, Okayasu, T, and Arashima, S Inhibitory effect of growth and toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by tea Jpn J School Health 44 160 162, 2003
 - 7 Ohgami K, Iheva IB, Shiratori K, Isogai E, Yoshida K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N, Ohno S Effect of human cationic antimicrobial protein 18 Peptide on endotoxin induced uveitis in rats Invest Ophthalmol Vis Sci 44(10) 4412 4418, 2003
 - 8 Tojo, M, Yanagihori, H, Zheng, X, Oyama, N, Isogai, E, Kimura, K, Nakamura, K, Kaneko, F Bes 1 DNA fragment encoding streptococcal antigen in skin lesions from patients with Behcet's disease J Appl Res 3(3), 232 238, 2003
 - 9 Kobayashi Sakamoto M, Isogai E, Hirose K, Chiba I NF kappaB dependent induction of osteoprotegerin

by *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells BBRC 2004

国際学会発表

- 1 Isogai, H, Isogai, E, Okumura, K, Hirose, K, Nishikawa, T
Bactericidal and tumoricidal activity of synthetic peptide from 18kD cationic antimicrobial protein 103th ASM General Meeting, Washington DC, USA, 2003
- 2 Isogai, E, Isogai, H, Matsuo, K, Hirose, K, Kowashi, Y, Okumura, K, Hirata, M Sensitivity of genera *Porphyromonas* and *Prevotella* to the bactericidal action of C terminal domain oh human CAP18 and its analogues Third Federation of Asia Pacific Microbiology Societies Conference, Kuala Lumpur, 15-18 October, 2003
- 3 Isogai, H, Isogai, E, Kawahara, M, Tsuji, M Lyme disease, babesiosis and ehrlichiosis among patients bitten by ticks in Japan Polymicrobial Diseases, Lake Tahoe, USA, 2003

国内学会発表

- 1 川原 眞、磯貝忠美子、力久泰子 楊孝康 磯貝 浩。北海道におけるマタニおよび野鼠のアナプラスマ科細菌の分布調査。第76回日本細菌学会、H15 4 1-4 3、能本
- 2 西川武志 磯貝忠美子、磯貝浩ほか、茶およびカテキン含有飲料の病原性大腸菌に対する抑制作用について 第76回日本細菌学会、H15 4 1-4 3 能本
- 3 鹿野内 宗、木村浩一、磯貝 浩 磯貝忠美子 西川武志。耐性菌を原理的に生しないアンチセンスおよびRNAi法による大腸菌O157の治療薬開発。第76回日本細菌学会、H15 4 1-4 3、能本
- 4 関 鋭 林 松男、坂口義彦 藤波良仁 横田喜治、磯貝 浩、磯貝忠美子 長町采子 小能恵子。種々の連鎖球菌の鉄ノック蛋白質60遺伝子の塩基配列の決定とその解析。第76回日本

細菌学会 H15 4 1-4 3 能本

- 5 磯貝忠美子 磯貝 浩、平田陸正、松尾幸毅、小能恵子。ヘーチェット病患者由来口腔ストレプトコッカスに対するCAP18の作用。第76回日本細菌学会、H15 4 1-4 3 能本 (ワークショップ講演)
- 6 磯貝 浩、磯貝忠美子、広瀬公治、平田陸正。生体由来抗菌タンパクCAP18合成ペプチドによる抗菌作用と抗腫瘍活性。第76回日本細菌学会、H15 4 1-4 3、能本 (ワークショップ講演)
- 7 磯貝忠美子、木村浩一、磯貝 浩 兼田直也、五十川理恵、西根 勤。マイクロチップ電気泳動によるライム病診断の簡便化 第40回レプトスピラシンポシウム H15 3 31 (福岡)

H 知的財産権の出願、登録状況
特記事項なし。

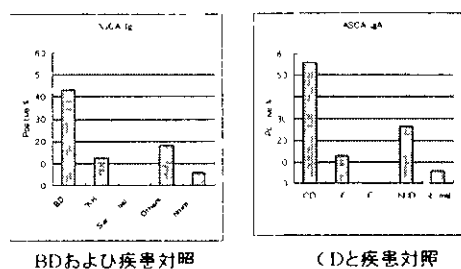


図1 ASCA IgA陽性率
BD患者では30人中17人(43.3%)でIgA抗体が陽性となった。クローン病では25人中14人(56.0%)でIgA抗体が陽性となった。BD患者では陽性率が高いことがわかる。