

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

ラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎におけるhuman cationic antimicrobial protein18  
の治療効果

分担研究者 大野重昭（北海道大学視覚器病学分野）  
研究協力者 大神一浩、白取謙治、鈴木由香利、  
金学海、北市伸義（北海道大学視覚器病学分野）  
磯貝恵美子（北海道医療大学）

研究要旨

目的：Human cationic antimicrobial protein18 (hCAP18, 18kDa) は好中球由来の塩基性タンパクである。hCAP18 の C 末端側の 27 個のアミノ酸からなるペプチドは LPS 結合能があり、エンドトキシンショック敗血症の治療に有効であることが知られている。今回エンドトキシン誘発ぶどう膜炎 (EIU) における hCAP18 の治療効果を検討した。

方法：ルイスラットに LPS 投与と同時に hCAP18 を 1、10、100  $\mu\text{g}$ 、それぞれ尾静脈内投与した。24 時間後に前房水を採取し、前房水中の NO、TNF- $\alpha$ 、PGE2、MCP-1 および MIP-2 濃度を ELISA 法にて測定した。また、前房水中のタンパク濃度および炎症細胞数を測定した。

結果：hCAP18 を 10  $\mu\text{g}$ 、100  $\mu\text{g}$  投与した群は、前房水中のタンパク濃度、炎症細胞数、TNF- $\alpha$  濃度および NO 濃度を有意に抑制した。hCAP18、10  $\mu\text{g}$  群の抗炎症効果は、100  $\mu\text{g}$  群とほぼ同程度であった。1  $\mu\text{g}$  群は EIU を抑制しなかった。

結論：hCAP18 は EIU を抑制した。その作用機序として、hCAP18 は LPS の toll like receptor への結合することを阻害することが示唆された。

A. 研究目的

Human cationic antimicrobial protein 18(hCAP18, 18kDa) は好中球由来の塩基性タンパクである。hCAP18 の C 末端側の 27 個のアミノ酸からなるペプチドには LPS 結合能があり、エンドトキシンショック敗血症の治療に有効であることが知られている。エンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデル(EIU)は眼組織での自然免疫異常のモデルであるため、hCAP18 は EIU に有効ではないかと考えられた。内眼炎に対し、これまでにない作用機序を持った治療薬の開発、研究は急務である。

そこで、ラット EIU モデルにおける hCAP18 の治療効果を検討した。

B. 研究方法

6 週齢雄性ルイスラットの両後肢足蹠皮下に LPS を 50 $\mu\text{g}$ (計 100 $\mu\text{g}$ )投与し、ラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルを作成した。

hCAP18 は 1、10 または 100 $\mu\text{g}$  を LPS

投与直後に尾静脈内に投与した。対照群として溶媒である PBS 投与群を設けた。1 群を 8 匹とした。LPS 投与 24 時間後に前房水を採取し、前房水中のタンパク濃度、前房水中炎症細胞数、PGE2、TNF- $\alpha$  および NO 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

本試験は北海道大学医学部動物実験委員会の承認を得て、予め計画を立て必要最小限の動物を用いることとし、動物に苦痛を与えないように注意を払いながら実験をおこなった。

C. 研究結果

1. 前房水中のタンパク濃度への影響；

対照群と比較して、hCAP18 の 10, 100 $\mu\text{g}$  投与群では濃度依存的に前房水中のタンパク濃度が有意に低下した。

2. 前房水中の炎症細胞数への影響；

細胞数は前房水をチュルク染色液で染色した後、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。その結果、タンパク濃度と同様に、hCAP18 投与群では 10, 100 $\mu\text{g}$  投与群で有

意な低下がみられた。1 $\mu$ g 投与群では影響はみられなかった。

3. 前房水中の PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  および NO 濃度への影響；

前房水中の TNF- $\alpha$  および NO 濃度は前房水を PBS で希釈し、ELISA 法により測定した。その結果、LPS で惹起された TNF- $\alpha$  および NO 濃度ともに 10, 100 $\mu$ g 投与群で著しく抑制した。

実験期間中に動物に異常はみられなかった。

#### D. 考察

以上の結果から hCAP18 は抗炎症作用を有することが示唆された。その作用機序は hCAP18 が LPS の toll like receptor への結合を阻害することが推察された。今後、他の眼疾患動物病態モデルでの薬効検討を行うと同時に、安全性の確認のため、毒性試験などを計画しており、臨床応用可能かどうかを検討する必要があると思われた。

#### E. 結論

hCAP18 は消炎作用があり、その作用機序として、LPS が toll like receptor への結合を阻害することが考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

a. Ohgami K, Ilieva B.I, Shiratori K, Jin X.H, Suzuki Y, Yoshida K, Kase S and Ohno S; Anti-inflammatory effects of aronia crude extract against rat endotoxin-induced uveitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* (in press)

b. Nishida T, Miyata S, Itoh Y, Mizuki N, Ohgami K, Shiratori K, Ilieva B.I,

Ohno S, Taylor A.W; Anti-inflammatory effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone against rat endotoxin-induced uveitis and the time course of inflammatory agents in aqueous humor. *International Immunopharmacology* 2004 ;4:1059-1066

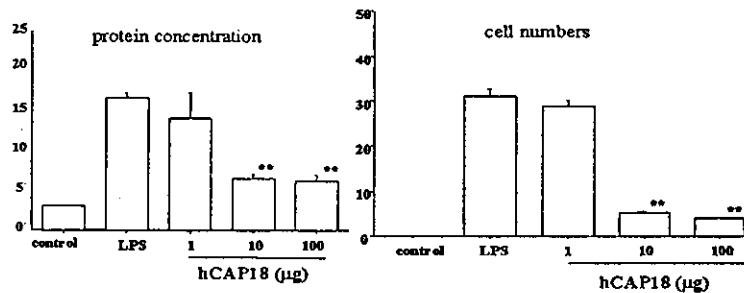
c. Shiratori K, Ohgami K, Ilieva IB, Koyama Y, Yoshida K, Ohno S; Inhibition of endotoxin-induced uveitis and potentiation of cyclooxygenase-2 protein expression by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2004;45:159-164

##### 2. 学会発表

a. Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Yazawa K, and Ohno S; The effects of Ginkgo Biloba Extract on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Vitro and in Vivo. XI International Conference on Behcet's Disease Oct.27-31, 2004, Antalya (Turkey)

b. Ohgami K, Shiratori K, Ilieva I, Yazawa K, and Ohno S; The effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. Association for Research in Vision and Ophthalmology Apr. 26-30, 2004, Fort Lauderdale (USA)

c. 大神一浩、白取謙治、イリアナイリエバ、吉田和彦、矢澤一良、大野重昭；ラットエンドトキシン誘発ぶどう膜炎におけるイチョウハ抽出物の治療効果 第108回日本眼科学会総会 4月15日～18日 東京



Effect of hCAP18 on LPS-induced protein concentration and cell numbers in aqueous humor. The aqueous humor was collected 24 hours after LPS treatment. Each value represents the mean  $\pm$  SD of 8 rats. Asterisks (\*\*) indicate a significant difference from the LPS group at  $p < 0.01$

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担報告研究

「HO-1 発現誘導によるザイモザン惹起性炎症の抑制」  
—ベーチェット病の治療応用を見据えて—

分担研究者 石ヶ坪良明（横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科）  
共同研究者 武田由希子、桐野洋平、岩崎美佳、岳野光洋  
（横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科）

ストレス誘導蛋白、heme oxygenase (HO)-1 は炎症制御作用を有している。私どもは Heme oxygenase (HO)-1 のベーチェット病への治療応用を検討するため、マウスの背部 airpouch 内にザイモザンを投与して好中球炎症モデルを作成し、これに対する HO-1 誘導の及ぼす影響を解析した。その結果、1) airpouch 内へのザイモザン投与 6 時間後より著明な好中球主体の炎症細胞の浸潤が観察された。2) hemin を airpouch 内に投与しても局所における HO-1 の発現誘導にパラツキがあり、炎症反応の抑制も明確でなかった。3) hemin 前処理胎児線維芽細胞の注入により、コントロールに比し、有意に浸潤白血球数、IL-1、KC の産生が低下していた。以上の成績は、HO-1 誘導により好中球性炎症を制御されることを示しており、ベーチェット病への治療にも応用可能と考えられる。

A. 研究目的

Heme Oxygenase (HO) はヘムを CO とビリベルジン、2 価鉄に分解する酵素である。CO は MAPK リン酸化による炎症制御、血管拡張作用、抗アポトーシス作用を、ビリベルジンはビリルビンに代謝され抗酸化作用を発揮する。さらに 2 価鉄は抗酸化作用を有するフェリチンを誘導する。このように HO はその代謝産物により "cytoprotection" と総称される機能を有している。特に HO-1 は酸化ストレス、サイトカインなど種々の刺激によって誘導されるストレス蛋白で呼吸器、循環器、神経系など様々な疾患の病態に関与している。さらに、私どもの研究室では、HO-1 遺伝子による強制発現が肺の炎症性疾患や線維症マウスモデルに有効であることを報告している。

しかし、ベーチェット病 (B 病) や膠原病など全身性炎症疾患の病態形成における HO-1 の役割は十分検討されていなかった。昨年度、私どもは B 病患者末梢血単核細胞、多核白血球における HO-1 蛋白および mRNA の発現を検討し、その発現自体には異常がないことを確認した。今年度は、

マウスの airpouch 内炎症モデルにおいて HO-1 の誘導が消炎作用を発揮するかどうかを検討した。

B. 研究方法

- ①対象：CB57/BL6 マウス (6-8 週令、雌)。
- ②airpouch 炎症モデル：マウス背部皮下に滅菌空気を注入して airpouch を作成後、ザイモザン投与により局所炎症を惹起した。このモデルに HO-1 誘導作用を持つヘミン (100  $\mu$ M) を直接投与したとき、あるいはあらかじめヘミン 100  $\mu$ M で 24 時間処理した  $5 \times 10^5$  個の胎児線維芽細胞 (in vitro で hemin により) を airpouch 内に投与したときの炎症に及ぼす影響を評価した。
- ③浸潤細胞数の算定および染色：ザイモザン投与後 4 時間、24 時間目に 1ml の生理的食塩水を用いて airpouch 内の浸潤液を回収し、細胞数を算定し、May-Gimesa 染色でその分画を同定した。
- ④ real time PCR 法：Trizol を用いて浸潤細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成した。TNF- $\alpha$ 、KC (IL-8 カウンターパート) 特異的プライマーとプローブを用いて、

ABI 7700 sequence detection system (Perkin Elmer)により mRNA 発現量を解析し、GAPDH により補正定量化した。

#### C. 研究結果

① airpouch におけるザイモザンによる炎症惹起：4 時間後には好中球主体の炎症浸潤が確認された。

② ヘミン処理の影響：airpouch 内に直接ヘミンあるいはコントロールとして PBS を投与し、その後ザイモザンによる炎症惹起を比較した。しかし、ヘミン投与群における浸潤細胞数にはバラつきが大きく、コントロールに比して有意な減少は認められなかった。

③ ヘミン前処理胎児線維芽細胞の影響：次に、あらかじめ *in vitro* でヘミン 100  $\mu$ M で 24 時間処理し、HO-1 の発現を十分に誘導した胎児線維芽細胞(CB57/BL6 マウス由来)を airpouch 内に投与し、その炎症に対する影響を検討した。その結果、ヘミン前処理胎児線維芽細胞の投与により、浸潤細胞数はコントロール(PBS 前処理胎児線維芽細胞)に比し有意に減少した(図 1)。また、TNF- $\alpha$ 、KC の発現も有意に低下していた(図 2)。

#### D. 考察

今回の検討により、HO-1 発現誘導によりザイモザン惹起性の好中球炎症が抑制されることが明らかになった。ヘミンを直接投与した場合、炎症抑制作用は明らかでなかった。airpouch 内の HO-1 の発現をウェスタン法、免疫組織法により検討した結果、その発現にバラつきがあることが要因と考えられた。そこで、あらかじめ同系の胎児線維芽細胞に HO-1 発現を誘導して投与することで、airpouch 内の炎症所見は著明に抑制された。

今回検討したのは、浸潤細胞数と一部の炎症性サイトカインのみであったが、HO-1 発現誘導により COX-2 や iNOS の発現も抑制することが知られており、今後この点についても検証する予定である。また、HO-1 によるヘム分解産物、すなわち CO、ビリルビン、Fe イオンのうちどの産

物が直接的に炎症抑制効果につながるのか、検討していくことで、最終的な薬理的標的を解明し、臨床応用の礎を築きたい。

#### E. 結論

HO-1 発現誘導は好中球炎症の制御に働き、ベーチェット病炎症に応用できる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Takeno, M. and Ishigatsubo, Y.: Behçet's disease and inflammatory bowel diseases. *Internal Med.* 43(3):172-173, 2004

(2) Takeda Y, Takeno M, Iwasaki M, Kobayashi H, Kirino Y, Ueda A, Nagahama K, Aoki I, Ishigatsubo Y. Chemical induction of HO-1 suppresses lupus nephritis by reducing local iNOS expression and synthesis of anti-dsDNA antibody. *Clin Exp Immunol.* 2004 Nov;138(2):237-44.

##### 2. 学会発表

(1) Takeda Y, Takeno M, Iwasaki M, Kirino Y, Ueda A, Nagahama K, Aoki I, Ishigatsubo Y. Protective effects of heme dependent heme oxygenase-1 induction on lupus nephritis in MRL/lpr. 68th Annual Scientific Meeting. San Antonio, Texas, October 18, 2004

(2) Takeno M, Nakamura S, Ohno S, Ishigatsubo Y. Treatment with anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody modulates cytokine profile in patients with Behçet's disease. XI International Conference of Behçet's disease. Antalya, Turkey, October 30, 2004

(3) Takeno M, Nagafuchi H, Shimoyama Y, Ishigatsubo Y, Suzuki N. Upregulated expression of IL-12 receptor is associated with active disease in Behçet's disease. XI International Conference of Behçet's disease. Antalya, Turkey, October 30, 2004

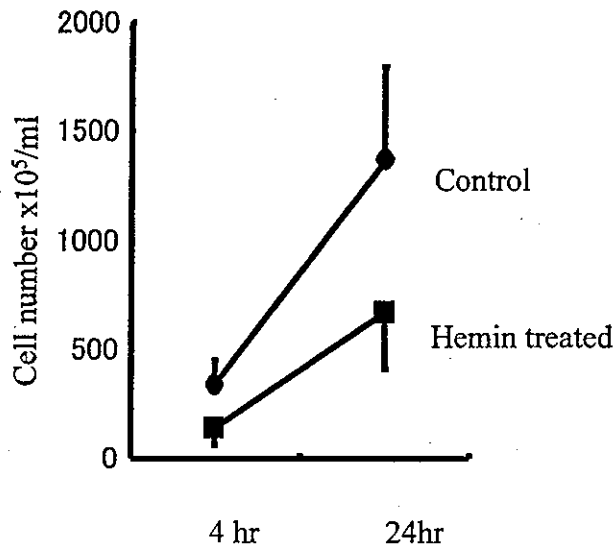


図1. ザイモザン惹起性aripouch内炎症細胞浸潤  
ヘミン処理した胎児線維芽細胞の投与により炎症細胞浸潤が抑制される

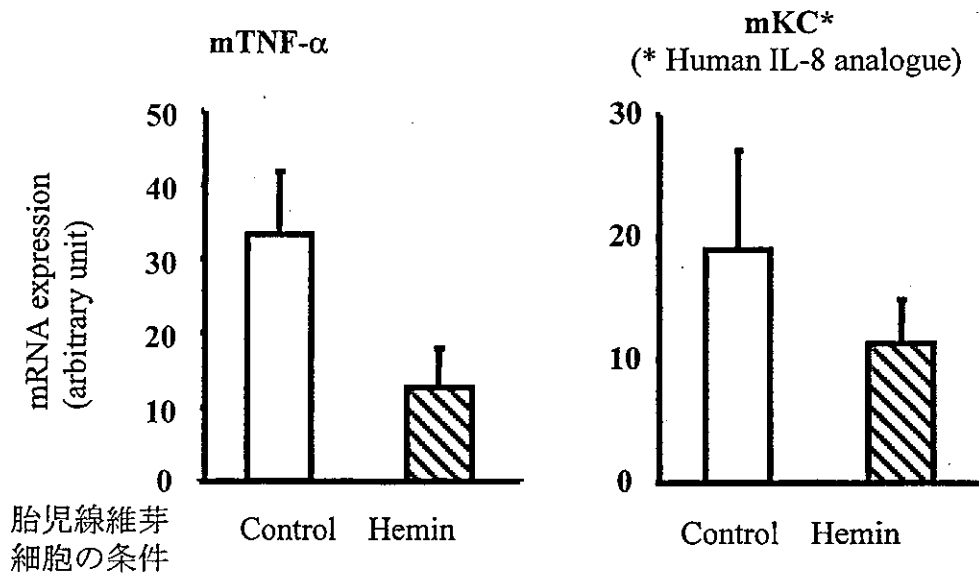


図2. aripouch内浸潤細胞におけるサイトカインmRNAの発現  
ヘミン処理した胎児線維芽細胞の投与により浸潤細胞におけるTNF-α、CKのmRNA発現が抑制される

$\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン関連制御性 T 細胞を用いた同種異系網膜移植生着に関する研究

分担研究者 大野 重昭 北海道大学大学院医学研究科 視覚器病学 教授

研究協力者 北市 伸義, Tat-Fong Ng, Michael J Young, Andrew W Taylor, 小野江和則

### 研究要旨

我々はこれまでアルファメラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) が抗原特異的制御性 T 細胞を誘導することを報告した。網膜自己抗原特異的 T 細胞を養子移入することでマウスぶどう膜炎モデルの T 細胞活性は抑制される。今回我々はこの制御性 T 細胞を用いて同種異系網膜移植片の生存が可能になるか検討した。

GFP トランスジェニックマウス (H-2<sup>b</sup>) から網膜組織を得、顕微鏡下で 7 週齢 B10.RIII マウス (H-2<sup>d</sup>) 硝子体腔内に移植した。同時に視細胞間レチノイド結合蛋白 (IRBP) 特異的制御性 T 細胞を 1 匹あたり  $1 \times 10^6$  個養子移入した。制御性 T 細胞は IRBP 感作 T 細胞を  $\alpha$ -MSH と培養して誘導した。

制御性 T 細胞を静脈内投与した群は網膜移植後 14 日目でも網膜移植片が全例で生着していたが対照群では 25% のみであった。制御性 T 細胞注射群では骨髄由来細胞が移植片外に、一方対照群では移植片内にみられた。

本結果は将来の網膜移植の臨床応用へむけて、その免疫学的障壁をクリアする一つの可能性を示している。

#### A. 研究目的

ぶどう膜炎等により低下した視力を回復する手段として網膜移植は実現が切望される治療法の一つである。しかし現実には眼の免疫学的特殊性により同種異系網膜移植は成功例がない。

一方、最近免疫学領域では制御性 T 細胞の研究が急速に展開されており、自己免疫寛容を維持し、自己免疫疾患の発症を抑制する可能性が指摘されている。

本研究の目的は、眼前房水内に存在する  $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) で誘導された網膜抗原特異的制御性 T 細胞を用いて遺伝背景の異なるマウス間で網膜移植を行ない、生着が得られるか検討することである。

#### B. 研究方法

<制御性 T 細胞の誘導> B10.RIII マウス

(H-2<sup>d</sup>) を網膜視細胞間レチノイド結合蛋白 (IRBP) ペプチドと完全フロインドアジュバントのエマルジョンを皮下注射して免疫した。7 日後に所属リンパ節よりリンパ球を回収し、*in vitro* で  $\alpha$ -MSH, TGF- $\beta_2$  と共に 24 時間培養して制御性 T 細胞を誘導した。  
<網膜移植> 生後 8 日の GFP トランスジェニックマウス (H-2<sup>b</sup>) から網膜組織を得、顕微鏡下で 7 週齢 B10.RIII マウス (H-2<sup>d</sup>) 硝子体腔内に移植した。同時に IRBP 特異的制御性 T 細胞を 1 匹あたり  $1 \times 10^6$  個養子移入した。ほかに、何も養子移入しないもの、無関係な抗原である卵白アルブミン特異的制御性 T 細胞を養子移入した群を対照群とした。

<評価> 移植後 7、14 日後に散瞳し、経瞳孔的に蛍光色素を発する移植片を観察した。移植後 14 日目に眼球を摘出し、IRBP, recoverin, GS-Lectin, CD3 抗体を用いて免疫

組織学的に移植片を検討した。

### C. 研究結果

#### 経瞳孔的観察

〈網膜移植 7 日後〉 全ての群で移植片は確認され、各群間で移植片の大きさに差はなかった。

〈網膜移植 14 日後〉 網膜抗原特異的制御性 T 細胞静脈注射群では全ての移植片が残存していた。また 7 日目と比較して大きさに差はなかった。しかし、対照群（制御性 T 細胞なし、卵白アルブミン特異的制御性 T 細胞注射群）ではいずれも移植片は一部の個体で残存していたが、その大きさは 7 日目と比較して有意に縮小していた ( $p < 0.05$ )。

#### 免疫組織学的観察

〈網膜視細胞〉 IRBP および recoverin で移植後 14 日目の眼組織を免疫染色し、網膜視細胞の有無を観察した。網膜抗原特異的制御性 T 細胞注射群では単に大きさが保たれているだけではなく、移植片に網膜視細胞が豊富に残存していた。一方、対照群では網膜視細胞は消失していた。

〈免疫細胞〉 GS-Lectin および CD3 で免疫染色することにより、移植片内のマイクログリア/マクロファージと T 細胞の存在の有無を検討した。治療群、対照群いずれにおいても移植網膜片内にマイクログリア/マクロファージと T 細胞が観察された。

### D. まとめ

1. 網膜自己抗原 (IRBP) 特異的制御性 T 細胞を養子移入することにより、同種異系網膜移植片は生存した。
2. 網膜自己抗原特異的制御性 T 細胞は網膜視細胞をも生存させた。
3. 網膜自己抗原特異的制御性 T 細胞は移植片内への免疫細胞の侵入は妨げなかった。

### E. 結論

1. 制御性 T 細胞による自己免疫制御は将来網膜移植を可能にするために有用である可能性がある。
2.  $\alpha$ -MSH, TGF- $\beta_2$  を用いて誘導する免疫制御機構は他臓器、他組織の移植にも有用である可能性がある。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

論文発表 なし。

学会発表 Annual Meeting of ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology), 2004 年 5 月 米国フロリダ州フォートローダーデイル (口演)。

### 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（難治性疾患克服研究事業）  
分担報告研究

腸管ベーチェット病の診療実態－診療ガイドライン作成に向けて－

分担研究者 石ヶ坪良明（横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科学）  
研究協力者 岳野光洋（横浜市立大学大学院医学研究科病態免疫制御内科学）  
共同研究者 上野文昭（大船中央病院・難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班）

腸管ベーチェット病はしばしば炎症性腸疾患との鑑別が問題となり、治療指針も十分確立していない。昨年度、難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班の「炎症性腸疾患の診療ガイドライン開発と診療オプションの策定」の中で「エキスパート・パネルによる Guided Implicit Review をもとに、「腸管ベーチェット・単純性潰瘍診療に関するコンセンサス・ステートメントを作成する」に一般内科医エキスパートとして参加した。このガイドライン作成プロジェクトの目的は Delphi 法を用いて各パネラーの意見を集約し、コンセンサスを形成するという手法の妥当性を検討することになり、実用性については十分検討されていない。今後、その成果のもとに眼科医、皮膚科医の意見を調節し、実用性の高い「腸管ベーチェット病の診療ガイドライン」の作成を提唱したい。

A. 研究目的

腸管ベーチェット病は臨床的にしばしば炎症性腸疾患との鑑別が問題になる。腸管ベーチェット病の典型例では、回盲部に punched out lesion と表現され、その形態からだけでは単純性潰瘍との鑑別は困難である。こうした臨床上的問題を背景に昨年度、難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班（慶応大 日比紀文 班長）において、「炎症性腸疾患の診療ガイドライン開発と診療オプションの策定」の中で「エキスパート・パネルによる Guided Implicit Review をもとに、腸管ベーチェット・単純性潰瘍診療に関するコンセンサス・ステートメントを作成する」というプロジェクトが持たれ、そのステートメントが示された。今年度以降、そのステートメントを「腸管ベーチェット病の診療ガイドライン」の作成にどのように生かしていくかを検討した。

B. 研究方法

Delphi 法による腸管ベーチェット・単純性潰瘍診療に関するコンセンサス・ステートメントの作成：以下のメンバーから構成さ

れる評価委員によって Delphi 法を用いてコンセンサス・ステートメントを作成する作業を行った。

評価委員：上野文昭（大船中央病院内科）、尾藤誠司（国立病院東京医療センター臨床研究センター）、岩男 泰（慶應義塾大内科）、小林健二（東海大消化器内科）、松本誉之（大阪市大消化器器官制御内科）、松井敏幸（福岡大筑紫病院消化器科）、五十嵐正広（北里大内科）、飯塚文瑛（東京女子医大消化器内科）、杉田 昭（横浜市大市民総合医療センター・難病医療センター）、福島恒男（横浜市立市民病院外科）、樋渡信夫（いわき市立総合磐城共立病院）、松田隆秀（聖マリアンナ医大総合内科）、岳野光洋（横浜市大1内）。

C. 研究結果

付記に昨年度、難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班（慶応大 日比紀文 班長）において、上野文昭（大船中央病院内科）ほか報告した「腸管ベーチェット・単純性潰瘍診療に関するコンセンサス・ステートメント」を示す。



#### D. 考察

示されたステートメントは、エキスパートパネラーのコンセンサスを反映しているものの、あくまでも個々の知識、診療経験に基づく学術的なものであり、保険適応など実務的な面は考慮されておらず、実用化となると、まだいくつかのハードルが残されている。また、眼科医、皮膚科医など内科以外のベーチェット病診療科との調整も今後の課題である。消化器専門医の意見がほぼ集約されていると考えると、消化器専門医、一般内科医、眼科医・皮膚科医、病院経営・保険診療に関する有識者各2名程度のワーキンググループを立ち上げ、進展させることを提案したい。

#### E. 結論

「腸管ベーチェット・単純性潰瘍診療に関するコンセンサス・ステートメント」(難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班)にもとづく「腸管ベーチェット病の診療ガイドライン」作成を目的としたワーキンググループ立ち上げを提案したい。

#### F. 健康危険情報

特記事項なり

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Takeno, M. and Ishigatsubo, Y.: Behçet's disease and inflammatory bowel diseases. *Internal Med.* 43(3):172-173, 2004

付記：腸管ベーチェット病・単純性潰瘍の診療に関する推奨指標(案)

(難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班(慶応大 日比紀文 班長)、上野文昭(大船中央病院内科))

#### ○ 診断

##### A. 診断基準

1. 回盲部に卵円形の巨大潰瘍，その他の潰瘍があるか，または他の腸疾患と診断できないような小腸・大腸の潰瘍や炎症があり，ベーチェット病診断基準の完全型あるいは不全型の条件を満たせば腸管ベーチェット病と診断する。
2. 回盲部に卵円形の巨大潰瘍またはその他の潰瘍があり，ベーチェット病診断基準の完全型あるいは不全型の条件を満たさない場合，単純性潰瘍と診断する。
3. 単純性潰瘍の経過中に，ベーチェット病の診断基準を満たすような症状が出現した場合には，その時点で腸管ベーチェット病と診断する。

##### B. 診断法

1. 腸管ベーチェット病の臨床所見として，腹痛，血便，口腔内アフタ，皮膚所見，陰部潰瘍，関節痛などに注目するが，これらは一度に揃わなくてもよい。
2. 腸管ベーチェット病・単純性潰瘍を診断するためには，大腸内視鏡検査(含生検)，注腸X線造影，血液炎症反応検査を行う。また腸管ベーチェット病を疑う例では，上部消化管内視鏡検査や小腸造影などにより，診断と病変範囲を確定する必要がある。
3. 腸管ベーチェット病・単純性潰瘍の診断に際しては，結核，クローン病，分類不能大腸炎，薬剤性腸炎などの可能性を除外する必要がある。
4. 腸管ベーチェット病疑診例では，皮膚科，眼科，整形外科，神経内科などの診察を依頼すべきである。

### C. 重症度の評価基準

1. 腸管ペーチェット病・単純性潰瘍の重症度に関しては明確な基準を設けることができない。全身症状の有無、腹部症状の程度、潰瘍の深さや出血の有無、炎症反応や貧血の程度などから総合的に判断する。

### ○ 治療

#### A. 標準的治療

1. 腸管ペーチェット病と単純性潰瘍に対する各種治療法の適応は基本的に同一と考えてよいが、眼病変を有するペーチェット病症例では、眼科医の治療方針と調整すべきである。
2. 5-ASA 製剤を基本薬として使用し、有症状者をはじめとしてほとんどすべての例で適応となる。メサラジンの投与量は成人の場合 2.25~3.0g/day を基本とし、サラゾスルファピリジンは 3~4g/day を基本とする。
3. ステロイドは一般に腹部症状や全身症状の強い例や出血を繰り返す例などで適応となる。また、軽症例でも 5-ASA 製剤投与後、症状の改善が見られない例でも適応と考えられる。
4. ステロイドの初期投与量は PSL 0.5~1.0mg/kg/day を目安として開始し、初期治療の期間は 1~2 週程度として改善があれば週 5mg ぐらいずつ漸減し、可能なら中止する。維持療法はできるだけ避け、10mg/day を超えた長期投与は行わないようにする。
5. ステロイドを漸減・中止する指標として、臨床症状の消失、CRP 値、潰瘍の治癒を考慮する。
6. 免疫抑制薬はステロイド抵抗例や依存例で適応となり、アザチオプリン 50~100mg/day などを投与する。
7. 成分栄養剤を用いた経腸栄養療法は、薬物治療抵抗例や重症度の高い例などで適応となる。また、完全静脈栄養や絶食にて症状改善が得られた例では経腸栄養に移行する。
8. 経腸栄養剤は、症状や炎症反応が改善し潰瘍が縮小すれば減量し、患者の認容性を考慮した上で維持する。

9. 完全静脈栄養は、発熱などの全身症状が強く、狭窄、瘻孔、出血などを伴う例、穿孔の危険が高いと判断される場合などの急性期に短期間用いる。

10. 外科治療は、狭窄、穿孔、大量出血例の他、回盲部に限局した難治例で適応となる。腸管切除を行う場合には、切除範囲が最小限となるようにする。また術後の再発が多いので、5-ASA 製剤や経腸栄養などの治療を併用する。

#### B. オプション治療

1. 経腸栄養を受け付けず、ステロイド依存性で免疫抑制薬投与後も出血などの症状が続く場合にはインフリキシマブを考慮する。
2. 完全・不全型のペーチェット病で、特に眼病変を有する場合にはコルヒチンを投与する。
3. ステロイド無効例や依存例では白血球除去療法も考慮する。
4. その他のオプション治療（サリドマイド、抗菌薬、内視鏡的エタノール撒布など）に関しては推奨に値する一定のコンセンサスが形成されていない。

### ○ 経過観察

1. 不全型腸管ペーチェット病の症例では、確定診断のための臨床症候を長期に観察する必要がある。腸管ペーチェット病と単純性潰瘍の鑑別診断には長期経過観察が有用である。
2. 治療効果の判定には、臨床症状、血液検査による炎症反応、画像検査による腸病変などの改善を指標とする。
3. 治療変更時や緩解確認には内視鏡検査を行う。

分担研究報告書

ベーチェット病に対するステロイド使用症例の検討

分担研究者：川島秀俊	さいたま赤十字病院眼科
共同研究者：吉田淳	東京都老人医療センター眼科
蕪城俊克	東京大学医学部付属病院眼科
沼賀二郎	東京都老人医療センター眼科
藤野雄次郎	東京厚生年金病院眼科

研究要旨

【目的】ベーチェット病（べ病）では、安易なステロイド内服による眼炎症反跳現象や離脱困難が指摘されている。今回、べ病眼炎症に対するステロイド内服療法、多剤併用療法の影響を調査した。【方法】1980年～99年初診べ病患者（計240名）を、経過観察期間中のステロイド内服歴、単独内服歴、多剤併用内服歴等を調べた。また各罹患眼について、眼炎症発作頻度（回/年）及び治療前後の視力を調べ、内服治療前後の眼症状への影響を検討した。【結果】ステロイド単独内服群の発作頻度は増加し視力経過は不良化していた。一方、ステロイドを含む他剤同時併用患者群では、治療前後における有意な発作頻度の減少がみられ有意な視力悪化はなかった。【考察】ステロイド内服歴があっても単独投薬でなければ、予後は比較的良好に保たれるが、ステロイド単独内服では予後が悪化する可能性が示唆された。

A. 背景と目的

近年、日本におけるべ病の疫学調査でしばしば軽症化の傾向が指摘されている。<sup>1)2)3)</sup> また、女性患者での視力予後の改善<sup>3)4)</sup>、新患患者数の減少<sup>5)</sup>なども指摘されている。以前我々が発表した調査でも、過去20年間において1980年代と1990年代の患者群を比較した結果、べ病眼炎症発作頻度、視力予後で統計的に有意な軽症化があることが確認された。<sup>6)</sup>

こうした変化の原因のひとつとして、べ病眼症に対するステロイド内服治療の変化が考えられる。1960年代より、べ病に対するステロイド長期全身投与について、その眼症状への影

響が指摘されるようになった。臨床的経験よりステロイド全身投与の安易な使用により、眼炎症の反跳現象や離脱困難を引き起こすことや、またステロイド単独内服によって逆にその後、眼症状を増悪させるのではないかという指摘、また、ステロイド内服治療患者では非内服患者に比べて、眼炎症発作頻度、視力予後、続発眼症状が増悪することが指摘<sup>7)8)</sup>されるようになった。一方で近年ステロイド内服併用療法の有効性を指摘する報告も散見される。我々は平成15年度の班会議で、低容量ステロイド剤内服併用療法が難治性べ病眼発作を有意に抑制すると報告した。そこで今回、ステロイド長期単

独内服療法が治療の選択肢として良くないのではないかという仮説をたて、その仮説に対し、べ病眼症に対するステロイド単独長期内服症例の臨床経過について調査することとした。

## B. 方法

1980年～1999年に初診したべ病患者合計240例のうち、4ヶ月以上24ヶ月以内の連続した特定の内服治療をしてなおかつ、治療前後に4ヶ月以上の経過観察期間のある患者108例208眼、内訳は男性81例158眼 女性27例50眼を対象とした。それらをさらにステロイド、コルヒチン、シクロスポリンそれぞれの単剤療法群とステロイドを含むものと含まない多剤併用療法群に分けた。各群の症例数眼数を表1に示す。

検討項目は、治療開始前および治療後の4ヶ月～12ヶ月について、眼炎症発作頻度、非発作時矯正視力を比較検討した。(単剤療法では、単剤治療期間前後の内服治療がない期間を治療前期間、治療後期間として、4カ月から12ヶ月それらの期間を有する症例を統計に用いた。また、ステロイドを含まない多剤併用療法とは、コルヒチンとシクロスポリン併用内服療法であり、単剤以下の治療期間を前後に4カ月から12ヶ月有する症例を統計に用いた。ステロイドを含む多剤併用療法とは、ステロイドとコルヒチンあるいはシクロスポリンあるいはその両方との併用療法であり、ステロイドを内服しない前後の期間を治療前期間および治療後期間とした。)

## C. 結果

単独内服治療した群について図1～3に結果を示す。ステロイド単独長期内服群では、治療前後で有意に発作回数が有意に増加し( $p=0.042$ )、かつ矯正視力は有意に低下してい

た( $p=0.036$ )。コルヒチン単独長期内服群では、治療前後で有意に発作回数が減少し( $p=0.0044$ )、かつ矯正視力に有意な変化はなかった( $p=0.25$ )。シクロスポリン単独長期内服群においても、治療前後で有意に発作回数が減少し( $p=0.027$ )、かつ矯正視力に有意な変化はなかった( $p=0.16$ )。内服併用療法した群について図4と5に結果を示す。ステロイドを含まない多剤併用療法では、治療前後で有意に発作回数が減少していた( $p=0.028$ )が、矯正視力は有意に低下していた( $p=0.001$ )。ステロイドを含む多剤併用療法では、治療前後で有意に発作回数が減少し( $p=0.0005$ )、かつ矯正視力に有意な変化はなかった( $p=0.16$ )。

## D. 考察

単独内服治療した群間で比較すると、ステロイド単独長期内服群でのみ治療前後で発作頻度が増加し矯正視力は有意に低下していた。一方、内服併用療法した群間で比較すると、ステロイドを含む多剤併用療法の方が含まない併用療法より望ましい結果が得られた。すなわちステロイド内服歴があっても単独投薬でなければ、予後は比較的良好に保たれるが、ステロイド単独内服群では予後が悪化する可能性が示唆された。このことから、ステロイド単独療法は望ましくなく、使用するのであれば併用療法が望ましいと推察される。しかし今回の調査はレトロスペクティブな調査であるため、バイアスの可能性を完全に排除することはできていない。対象とする患者群の眼症について重症度を統一するなどの必要があったが、症例数の制約などのためそれはできなかった。ステロイド内服療法の使用可否・方法については、今後プロスペクティブな調査が課題となると思われる。

## E. 結論

べ病眼症に対するステロイド内服治療において、ステロイド単独長期内服療法は望ましくなく、使用するのであれば他の免疫抑制剤との併用療法が望ましいのではないかと推察された。

## 参考文献

- 1) Ando K, Fujino Y, Hijikata K et al:  
Epidemiological features and visual prognosis of Behçet's disease. *Jpn J Ophthalmol* 43:312-317.1999
  - 2) 助川祥一, 氏原弘, 宮永嘉隆: ベーチェット病長期観察例の視力経過 特に免疫抑制剤及び白内障との関係 臨眼 51:1157-1160. 1997
  - 3) Sakamoto M, Akazawa K, Nishioka Y et al:  
Prognostic factors of vision in patients with Behçet's disease. *Ophthalmology* 102:317-321.1995
  - 4) 東田みち代, 中川やよい, 多田玲, 笹部哲生, 藤井節子, 春田恭照, 湯浅武之助: 1990 年におけるベーチェット病の現況 眼紀 42:1014-1018. 1991
  - 5) 寺山亜希子, 小竹聡, 笹本洋一, 合田千穂, 高橋光生: 北海道大学眼科における最近のベーチェット病について 眼紀 51:389-392. 2000
  - 6) Yoshida A, Kawashima H, Motoyama Y et al:  
Comparison of patients with Behçet's disease in the 1980s and 1990s. *Ophthalmology* 111:810-815.2004
  - 7) 小暮美津子, 大野弓子, 島川真知子: ベーチェット病の治療 臨眼 34:1017-24. 1980
  - 8) 小暮美津子, 島川真知子, 大野弓子: ベーチェット病に対するステロイド剤濫用の弊害 眼臨 74:1162-6. 1983
- ## F. 健康危険情報
- なし
- ## G. 研究発表
1. Atsushi Yoshida, M.D., Hidetoshi Kawashima, M.D., Yuta Motoyama, M.D., Hirobumi Shibui, M.D., Atsushi Taniai, M.D., Mayumi Kitagawa, M.D., Toshikatsu Kaburaki, M.D., Kazuyuki Shimizu, M.D., Yasuho Izawa, M.D., Kiyofumi Hayashi, M.D., Jiro Numaga, M.D., Yujiro Fujino, M.D., and Kannjiro Masuda: The statistical comparison of patients with Behçet's disease between the 1980's and the 1990's. *Ophthalmology*. 111:810-815. 2004.
  2. Kazuhide Akiyama, Jiro Numaga, Fumie Kagaya, Yutaka Takazawa, Shigenobu Suzuki, Nobuyuki Koseki, Satoshi Kato, Toshikatsu Kaburaki, and Hidetoshi Kawashima. A case of Optic Nerve Involvement in Metastasis of Gastrointestinal Stromal Tumor. *Jpn J Ophthalmol*. 48:166-168. 2004.
  3. Ohno S, Nakamura S, Hori S, Shimakawa M, Kawashima H, Mochizuki M, Sugita S, Ueno S, Yoshizaki K, and Inaba G.: Efficacy, safety, and pharmacokinetics of multiple administration of infliximab in Behçet's disease with refractory uveoretinitis. *J Rheumatol*. 31:1362-1368. 2004.
  4. Dale S Gregerson and H Kawashima. APC derived from donor splenocytes support retinal autoimmune disease in allogeneic recipients. *J Leukocyte Biology*. 76:383-387. 2004.
  5. 蕪城俊克、沼賀二郎、藤野雄次郎、川島秀俊(東京大). ベーチェット病に対する長期低

容量ステロイド併用療法. 平成 15 年度厚生  
省特定疾患ベークェット病調査研究班班. 平  
成 15 年度研究業績. pp65-70. 2004.

6. 藤村茂人、蕪城俊克、沼賀二郎、藤野雄次  
郎、川島秀俊(東京大). ベークェット病など  
のぶどう膜炎に続発する緑内障の臨床統計.  
平成 15 年度厚生省特定疾患ベークェット病  
調査研究班班. 平成 15 年度研究業績. p  
p60-64. 2004.
7. 蕪城俊克、川島秀俊:ぶどう膜炎併発緑内  
障における手術の適応・術式の選択・術後処  
置. あたらしい眼科. 21:13-19. 2004.
8. 川島秀俊:赤ちゃんの病気&ホームケア事  
典. 第?章.体の部位の異常ー目. ひよこクラ  
ブ 6 月号. ベネッセコーポレーション. p  
179-p182. 2004.
9. 川島秀俊:免疫抑制薬. 眼薬理. 18:44  
-46. 2004.
10. 川島秀俊:59.急性出血性結膜炎. 感染症.  
竹田美文、木村哲編集. 朝倉書店.  
280-281. 2004
11. 川島秀俊:60.流行性角結膜炎. 感染症. 竹  
田美文、木村哲編集. 朝倉書店. 356-358.  
2004
12. 川島秀俊:複視. BRAIN. 77:6-7.日本脳  
神経財団. 2004

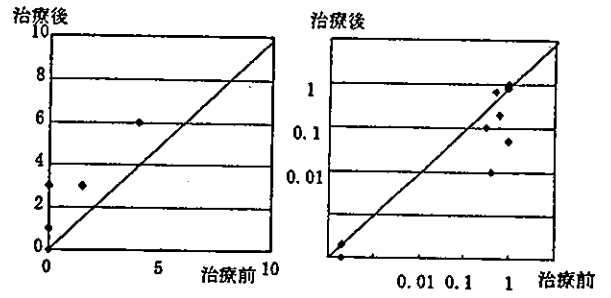
H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

図表

表1 対象内訳

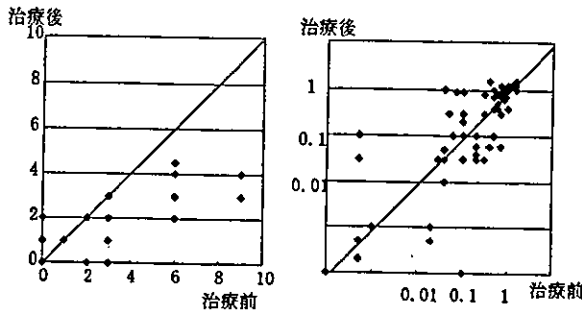
108例 208眼 (男性 81例 158眼 女性 27例 50眼)

I) 単剤療法 (58例 112眼)	
A. ステロイド単独群	6例 11眼
B. コルヒチン単独群	36例 70眼
C. シクロスポリン単独群	16例 31眼
II) 多剤併用療法 (50例 96眼)	
A. ステロイド無し群	20例 38眼
B. ステロイド有り群	30例 58眼



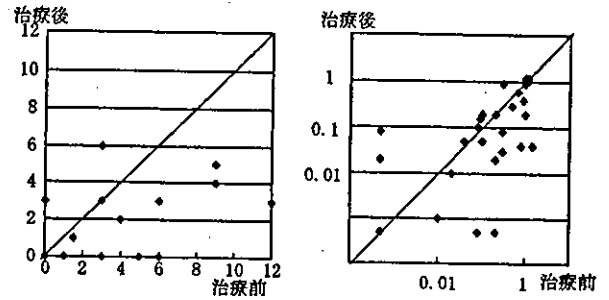
発作頻度：治療前 $1.20 \pm 1.84$  治療後 $2.37 \pm 2.6$  (回/年)  $p=0.042$   
 矯正視力：治療前 0.15 治療後 0.065  $p=0.036$

図1 ステロイド単独群 (6例11眼) 発作頻度視力経過



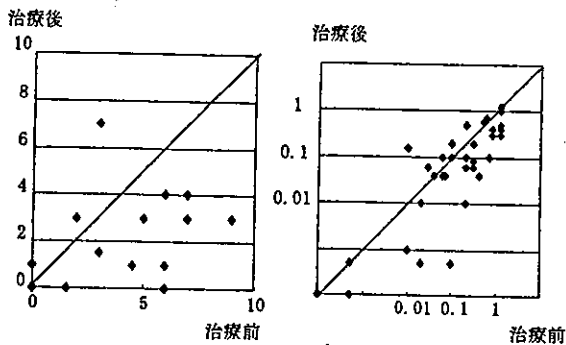
発作頻度：治療前 $2.2 \pm 2.7$  治療後 $1.3 \pm 1.4$  (回/年)  $p=0.0044$   
 矯正視力：治療前 0.14 治療後 0.12  $p=0.25$

図2 コルヒチン単独群 (36例70眼) 発作頻度視力経過



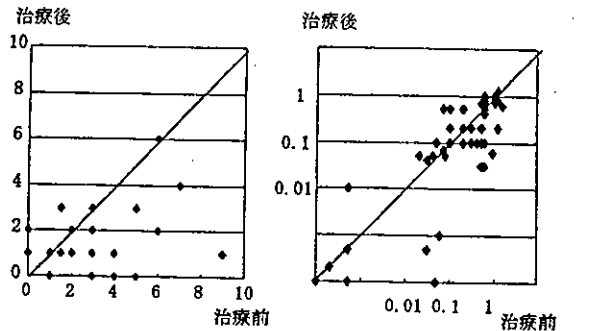
発作頻度：治療前 $3.2 \pm 2.1$  治療後 $1.5 \pm 1.5$  (回/年)  $p=0.027$   
 矯正視力：治療前 0.13 治療後 0.080  $p=0.16$

図3 シクロスポリン単独群 (16例31眼) 発作頻度視力経過



発作頻度：治療前 $3.9 \pm 2.8$  治療後 $2.2 \pm 1.9$  (回/年)  $p=0.028$   
 視力経過：治療前 0.089 治療後 0.036  $p=0.001$

図4 多剤併用療法群 (ステロイド無し) (20例38眼) 発作頻度視力経過



発作頻度：治療前 $3.2 \pm 2.1$  治療後 $1.5 \pm 1.5$  (回/年)  $p=0.0005$   
 視力経過：治療前 0.057 治療後 0.040  $p=0.16$

図5 多剤併用療法群 (ステロイド有り) (30例58眼) 発作頻度視力経過

図1～5において

平均 (±標準偏差) p: ウィルコクソン符号付順位和検定

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

ベーチェット病患者のシクロスポリン感受性に関する研究

分担研究者 水木 信久 横浜市立大学大学院視覚器病態学 教授  
共同研究者 横浜市立大学大学院視覚器病態学： 伊藤亜紀子 山根敬浩 笠井健一郎  
木村綾子 伊藤良樹 目黒明 西田朋美  
伊藤典彦  
信州大学医学部法医学： 太田正穂  
信州大学医学部臨床検査部： 勝山善彦  
北海道大学眼科： 南場研一 大野重昭  
東海大学医学部分子生命科学： 猪子英俊

研究要旨 ベーチェット病は再発性難治性の炎症性眼疾患であり、未だ治療法は確立されておらず、時には失明に至ることがある。近年、本疾患に対しシクロスポリン(CYA：ネオーラル<sup>®</sup>)が使用される機会が増加しているが、本薬剤の感受性は個人差が大きいことが知られている。そこで我々はCYA内服中の本病患者をCYA有効群と無効群に分類し、AUC (area under the curve) 0-4 およびCYA最大血中濃度を比較検討することにより、CYA感受性の個人差を検索してみた。体重当たりのCYA投与量が同等であっても、AUC0-4が低値を示し、眼発作が抑えられない症例があったことより、CYA無効例においてはAUC0-4を測定する意義があると考えられた。また、AUC0-4のみでは効果を判定できない症例が存在したことから、CYAの血中動態以外にも個人の薬剤感受性を規定する因子があることが示唆された。

A. 研究目的

CYAは体重当たりの投与量が同じであっても個人間でCYA血中濃度が異なることがあり、投与後のモニタリングが必要であるといわれている。現在までCYAの血中濃度のモニタリングの指標として、トラフ値が広く利用されてきた。トラフ値は再現性の高いパラメーターであり、効果、安全性のよい指標であるが、一部の症例においてはトラフ値と効果との相関性が低く、また、トラフ値が目標範囲内であっても十分な免疫抑制効果が得られない症例が散見される。薬物動態学的に最も信頼されるモニタリング法はAUC (area under the curve) 0-12モニタリングであるが、この方法は頻回の採血が必要であり、患者の負担も大きく、コストも高い。AUC0-4モニタリングはAUC0-12モニタリングに比し採血回数、コストが減少するうえ、トラフ値より効果と安全性の指標として高い精度が得られることが期待される。私たちは今回、

ベーチェット病患者を臨床経過からCYA治療有効群と無効群に分類し、AUC0-4をモニタリングして比較検討することにより、患者間のCYA感受性の個人差を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

横浜市立大学附属病院眼科外来または北海道大学付属病院眼科外来においてCYA内服前、内服後1、2、3、4時間後の計5回、CYA血中濃度を測定し、AUC0-4を算出した。CYA内服後の発作回数がCYA内服前の発作回数を下回るものを有効とし、CYAの有効、無効両群間でAUC0-4を比較検討した。同時に肝機能、腎機能、CKなどの血液検査データの変動および歯肉肥厚、高血圧、神経症状などの副作用とAUC0-4の関係も検討した。また、AUC0-4が同程度の患者間において、眼発作の回数を比較し、患者間のCYA感受性の個人差についてもあわせて検討した。



#### (倫理面への配慮)

本研究は横浜市立大学倫理委員会にて審査され、承認されたものである。対象患者には研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加していただく。得られた個人情報には連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者により厳重に管理されている。

#### C. 研究結果

現在までに15症例でAUC0-4の測定を行った。内訳は男性12例、女性3例、発症時の平均年齢は $34.5 \pm 7.2$ 歳であった。病型は完全型が4例、不全型が11例であった。HLA-B51陽性は8例、陰性は3例、不明は4例であった。

用法、用量が同一な症例間で効果の差とAUC0-4値の差が見られた。CYAが有効であった症例では無効であった症例よりAUC0-4値が高い傾向がみられた。しかしながら、AUC0-4値が同等の症例においてもCYAの効果に違いがみられた。副作用の比較は、現在のところ、副作用を発現した症例も少なく、AUC0-4との比較検討は困難であった。

#### D. 考察

体重当たりのCYA投与量が同等であっても、AUC0-4が低値を示し、眼発作が抑えられない症例があった。体重当たり同等のCYAを投与されていても、患者個々人でCYAの吸収・代謝などに個人差があり、AUC0-4が低地を示した可能性が考えられた。このように、CYA無効例においては、十分なCYA血中濃度が得られないために、眼発作が抑えられない可能性が考えられる。このような症例では、トラフ値を測定しているのみでは、CYA血中濃度の正確な判定ができず、AUC0-4を測定する意義があると考えられた。

また一方で、十分なAUC0-4値が得られているにも関わらず、眼発作が抑えられていない症例もみられた。したがって、CYAの血中動態以外にも個人の薬剤感受性を規定する因子があることが示唆された。CYAの標的分子

の感受性の個人差やCYA代謝に関わる酵素の個人差など色々な局面で、患者個々人の遺伝的背景に起因する個人差が影響していると考えられた。

現在の問題点としては、以下の点があげられた。①多くの症例でCYA導入後の観察期間が短く、発作回数や視力の評価が困難であった。②サンディミューン<sup>®</sup>からネオーラル<sup>®</sup>に移行した症例や、コルヒチン<sup>®</sup>やプレドニゾン<sup>®</sup>の内服、アダカラムを併用している症例など、症例ごとに経過が異なっていた。今後これらの点を考慮しながら、さらに症例数を増やして検討していきたい。

#### E. 結論

臨床的にCYAが無効の症例ではAUC0-4を測定する意義があると考えられた。しかしながら、CYAにはAUC0-4でも推定できない薬剤感受性の個人差が存在することも示唆された。今後さらに症例数を増やして検討していきたい。

#### F. 健康危険情報 特記事項なし

#### G. 研究発表 特記事項なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 特記事項なし

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

ベーチェット病におけるシクロスポリンの治療効果と遺伝子多型性

研究協力者 太田正徳 信州大学医学部法医学教室講師

勝山善彦：信州大学付属病院薬剤部、

西田朋美、伊藤亜紀子、水木信久：横浜市大視覚器病態学

研究要旨

ベーチェット病では臨床治療薬として強力な免疫抑制作用を示すシクロスポリン (CYA) が使用されているが、その治療効果には個人差が見られることが確認されている。薬物反応性の個人差は薬物動態や薬物感受性に関与する遺伝子多型が関与すると考えられ、一昨年来より薬物動態に関与する薬物代謝酵素チトクロム P450 の遺伝子多型と、薬物排出に関与する ABC(ATP binding cassette; ATP 結合カセット) トランスポーター *MDR1*(Multidrug resistance)、*MRP1*(Multidrug resistance protein)、*MRP2/cMOAT* 遺伝子の遺伝子多型について検討してきた。本年はさらにシクロスポリン感受性に相違が見られた検体 7 例について検査した。遺伝子多型検査は、*MDR1*、*MRP1*、*MRP2/cMOAT* 遺伝子のエクソン内における非同義置換を示す SNPs を調べ、*MDR1* についてはエクソン 1 内における 2 箇所、*MRP1* についてはエクソン 2, 8, 9, 13, 16, 20, 23, 28, 31 内における各 1 箇所、*MRP2/cMOAT* については、エクソン 1, 10, 18, 28, 31 内における各 1 箇所、*CYP3A4* 多型はエクソン 1~13 内にある SNPs (single nucleotide polymorphism) を direct sequencing により検査した。また *CYP3A5* 遺伝子多型はイントロ 3 にある SNP (A to G: *CYP3A5\*3*) とエクソン 7 にある SNP (G to A: *CYP3A5\*6*) を PCR-RFLP 法にて検査した。本年度の解析とこれまでの解析結果から、*MDR1*、*MRP1*、*MRP2/cMOAT* トランスポーターや薬剤代謝酵素 *CYP3A4*、*CYP3A5* の遺伝子多型とベーチェット病患者さんにおけるシクロスポリン薬剤効果については有意な相違は認められなかった。これは解析を行ったサンプルが明確なガイドラインのもとで選出されなかったのが原因の一つと考えられ、ベーチェット病患者さんにおけるシクロスポリンの薬剤有効性解析では、シクロスポリンの血中モニタリングが充分なされたサンプルを用いて薬物動態と感受性についてそれぞれ解析することが重要であることが示唆された。

A. 研究目的

カルシニューリンを介した T 細胞内 IL-2 転写因子の活性化抑制作用を示すシクロスポリンは特異的かつ強力な免疫抑制作用を持つことから、臓器移植時、乾癬、ネフローゼ症候群、再生不良性貧血、ベーチェット病の臨床治療薬として利用されている。しかし、シクロスポリンによる治療効果には個人差が見られ、薬剤治療の有効性が一様でないことが問われている。ベーチェット病患者さんにおいても、シクロスポリン治療を行っても、眼発作回数の改善は見られず、視力低下を伴うことがしばしば認められている。

これらの原因としては、ベーチェット病患者間におけるシクロスポリンの薬物効果に対する薬物応答性の個人差が考えられる。この個人差をもたらす重要な原因の一つとしてシクロスポリンの薬物動態と薬物感受性に関係する遺伝子の遺伝子多型が示唆される。そこでこれまでに、我々は薬物動態に関与する個人差の原因として薬物代謝酵素であるチトクロム P450 の遺伝子多型と、薬物排出に関与する ABC(ATP binding cassette; ATP 結合カセット) トランスポーター *MDR1*、*MRP1*、*MRP2/cMOAT* の遺伝子多型との相関を調べ

てきた。今回、さらにサンプル数を増やし解析を行うとともに、より明確な解析結果を得るためのサンプリングに関するガイドラインを考察した。

## B. 研究方法

試料として、シクロスポリンによる治療効果が認められたベーチェット病患者5名と、治療効果が見られなかった患者2名から供与されたDNAを用いた。これらの患者さんの血中CYA濃度はAUC<sub>0-4</sub> (area under the curve) 値を指標にした。ABCトランスポーターMDR1、MRP1、MRP2/cMOAT遺伝子の遺伝子多型、薬物代謝酵素CYP3A4、CYP3A5遺伝子多型は前回報告した方法により検査した。

## C. 研究結果と考察

今回調べた患者さんのトランスポーターMDR1、MRP1、MRP2/cMOAT遺伝子の遺伝子多型と薬物代謝酵素CYP3A4、CYP3A5遺伝子多型検査結果(表1)では、前回報告したと同様明らかにシクロスポリンの治療効果と関連するものは認められなかった。しかし、眼発作回数の改善を含めた臨床所見からシクロスポリン治療効果が有効でないと思われる患者B513とB565においては、トランスポーターMDR1遺伝子のpromoter領域内塩基-41の位置でA/Gのヘテロ接合体を示していた。この患者さんらのAUC<sub>0-4</sub>値は他の5人の患者さんに比べ低い値を示していた(B513:1107.8, B565:1539.6)。投与量が5mg/kgと規定量に達しており、シクロスポリンの血中濃度が低く薬剤効果が見られない要因として、シクロスポリンの吸収率が悪いのとシクロスポリンの代謝が早いことが考えられる。前者ではMDR1遺伝子の発現量が多いことと活性が高いのが原因として考えられ、また後者ではCYP3Aの発現量と活性が高いのが要因として考えられる。今回シクロスポリンの血中濃度AUC値が低く、薬剤効果が認められなかった2人の患者さんにおいてMDR1遺伝子のプロモーター領域に変異が認められたのは、この遺伝子の機能に関連がある可能性を示

唆していると思われるが、更に多くのサンプルを検討する必要がある。

これまでの解析結果から薬剤動態・作用の個人差(遺伝子多型)を見るのに厳格に選定された症例について解析をおこなうことで信頼する結果が得られると考えられた。乾癬や糸球体腎炎ではシクロスポリン治療における効果値(AUC<sub>0-4</sub>;糸球体腎炎1,500-2,000, 乾癬;導入期2,000-2,500;寛解期1,200-1,800, C<sub>2</sub>値:糸球体腎炎700-800, 乾癬;導入期800-1,000;寛解期400-700)が定められているが、ベーチェット病ではまだその値が定められていない。そこでベーチェット病においてもこのような有効値を定める必要がある。そのために、表2に示したテーマに基づき、ベーチェット病患者さんにおけるシクロスポリン治療効果の有効値を示すAUC<sub>0-4</sub>値、C<sub>2</sub>を定め、この値を指標としてシクロスポリンの薬剤動態と薬物感受性について各個人の遺伝学的背景について検討することが重要であると考えられた。

最後に、AUC<sub>0-4</sub>値、C<sub>2</sub>値が有効値に達しているのにシクロスポリンの薬剤効果が認められる例と、認められない例の2群が選出されれば、シクロスポリンに対する高感受性有無について遺伝学的個人差が検討可能である。例えば細胞内におけるシクロスポリンとシクロフィリンの結合性に関する個人差、シクロスポリン・シクロフィリン複合体とカルシニューリンとの結合性の個人差等について調べることが必要である。

## D. 結論

これまでの検査では、薬物代謝酵素チトクロームP450の遺伝子CYP3A4、CYP3A5の遺伝的多型性、薬物排出に関与するABCトランスポーターのMDR1、MRP1、MRP2/cMOATの遺伝子多型性とベーチェット病患者におけるシクロスポリンの治療効果については有意な相関は認められなかったが、ここで示したプロトコールに基づいたサンプル抽出を行い、解析することにより薬剤の有効性と個人差との関係が明らか

にされると思われる。さらに、シクロスポリンに対する薬剤効果は細胞内におけるシクロスポリンの作用（シクロフィリン、カルシニューリンとの結合性等）に

ついて個人差の有無を検討することが重要であると考えられた。

表1 ベーチェット病患者における AUC<sub>0-4</sub> 値と MDR1, CYP3A5, CYP3A4 の遺伝子多型

患者	投与量	AUC	HLA	眼発作		MDR1		CYP3A5
	(mg/kg)	AUC <sub>0-4</sub>	B51	前	後	1a/1	1g/2	*3
B38	3	2190.0	-	不		A	C	*3/*3
B252	4	2520.2		完		A	C	*3/*3
B303	3	2205.5				A	C	*3/*3
B513	5	1107.8	+	不	3.5 4.5	A/G	C	*3/*3
B528	5	2457.8	+	不	6.5	A	C	*3/*3
B530	5	3578.7	+	不	1 0.5	A	C	*3/*3
B565	5	1539.6	+	不	3.5 3.5	A/G	C	*3/*3

患者	AUC	CYP3A4														
	AUC <sub>0-4</sub>	P1	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	Int10:12
B38	2190.0	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	G/G
B252	2520.2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	G/A
B303	2205.5	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	G/G
B513	1107.8	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	G/A
B528	2457.8	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	G/A
B530	3578.7	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	G/A
B565	1539.6	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	G/A

表2 ベーチェット病患者におけるシクロスポリンの有効性検証のためのプロトコールとその方法

1. 現状において副作用例、有効例、無効例についてトラフ値、AUC<sub>0-4</sub>、C<sub>2</sub>の関係を明確にする
2. ベーチェット病患者のアブソープションプロファイルの特性を見いだす
3. ベーチェット病患者の有効 AUC<sub>0-4</sub>、C<sub>2</sub>値を見いだす
4. 簡易採血点(2点位)で、AUC<sub>0-4</sub>の関係式を導く
5. トラフモニタリングよりも AUC<sub>0-4</sub>、C<sub>2</sub>のモニタリングがより有効であることを示す
6. 同一域内の AUC<sub>0-4</sub> で有効例、無効例、少量有効例、副作用例の患者を選択し、シクロスポリン高感受性例、通常有効例、無効例、副作用例について遺伝的検討を行う。

方法

1. 対象患者について AUC<sub>0-4</sub> モニタリングを行う  
AUC<sub>0-4</sub>:投与直前、投与後 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間の 5 点の採血で計算し、有効患者と無効患者の AUC<sub>0-4</sub> の違いを見いだす
2. 無効例で AUC<sub>0-4</sub> が低い場合は増量して、効果を検討する
3. 有効例で AUC<sub>0-4</sub> が高い場合、減量も検討し、効果の推移をみる
4. 以上の結果から患者群を分類して遺伝的要因を検討する。