

表 2. Behçet 病の重症度 Stage 分類

Stage I	眼症状以外の症状（口腔粘膜のアフタ性潰瘍、皮膚症状、外陰部潰瘍）のみられるもの
Stage II	Stage I の症状に眼症状として虹彩毛様体炎が加わったもの Stage I の症状に関節炎や副睪丸炎が加わったもの
Stage III	網脈絡膜炎がみられるもの
Stage IV	失明の可能性があるか失明に至った網脈絡膜炎及びその他の眼合併症がある 活動性または重度の後遺症を残す特殊病型（腸管 Behçet 病、血管 Behçet 病、神経 Behçet 病）
Stage V	生命予後に危険のある特殊病型、中等度以上の知能低下を有す進行性神経 Behçet 病

蛋白濃度の上昇を示す。MRIでは、病変部位が T2 強調画像あるいは FLAIR 画像の高信号域として描出される。多彩な神経症状が時間的・空間的多発することから、時に多発性硬化症との鑑別が問題となる。また、シクロスポリン投与中の約 10~20% の患者に急性型の神経病変が誘発されるといわれている。一方、一部の患者には、急性型神経 Behçet の発作のおさまった後に、慢性進行性の痴呆様の精神神経症状が見られ、治療抵抗性で徐々に進行し、ついには人格の荒廃をきたしてしまう。同時に歩行障害や構語障害などの小脳・脳幹症状も進行することが多い。こうした例では、髄液の細胞数・蛋白は正常値であるにも拘らず持続的に髄液中の IL-6 が異常高値を示すのが特徴である<sup>1,2)</sup>。こうした慢性進行型の神経 Behçet に移行する例は男性に多く、喫煙率と HLA-B51 の陽性率がいずれも約 90% 以上と極めて高く、タバコの何らかの成分が HLA-B51 によって抗原提示され、免疫反応が持続する可能性が考えられる<sup>3)</sup>。

上記の神経実質病変以外に、Behçet 病においては静脈洞血栓症がみられることがあるが、これはむしろ血管 Behçet と呼ぶべきものである。

#### 4. 治療法の実際

2003 年に Behçet 病の厚生労働省研究班の重症度基準 Stage 分類が策定された(表 2)。この重症度基準の Stage 分類に基づいて大まかな治療方針を決定することができる(図)。以下に具体的な

方針を述べる。

##### 1) 治療の基本方針

日常生活では、本症の増悪因子である気象条件・感染・手術・外傷・月経・ストレスに留意し、避けられる要因はなるべく避けるよう指導する。また、う歯やその他の感染巣（皮膚の膿瘍など）がある場合は必ずその治療を行わせる。さらに、毎食後必ず歯磨きと口腔内の洗浄をかかさなで行うよう指導する。

重篤な視力障害を残しうる眼病変、生命予後に影響を及ぼす特殊病型（神経・血管・腸管 Behçet）に対しては積極的な薬物療法を行うが、口腔内アフタ、陰部潰瘍、皮膚病変に対しては原則としてステロイドの外用を中心とした局所療法で対応する。コルヒチンは好中球機能を抑制することから、Behçet 病の治療薬として頻用されるが、副作用として下痢・乏精子症・月経異常・催奇性・筋症状（こむらがえり）・肝障害などに注意する必要がある。関節痛、結節性紅斑、副睪丸炎に対してはコルヒチンに加えて非ステロイド抗炎症薬も用いられる。非ステロイド抗炎症薬の連用に際しては、特に消化性潰瘍に注意が必要である。また、皮膚粘膜病変には、イコサペント酸エチルの有効な場合があり、副作用も少なく、試みる価値はある。

一般に、ステロイドの全身投与は Behçet 病の急性炎症症状を短期的に軽快させる効果があるが、持続的長期投与には Behçet 病の各症状の発作を抑制する効果は認められない<sup>4)</sup>。ただし、眼病変のある患者においては急速にステロイドを

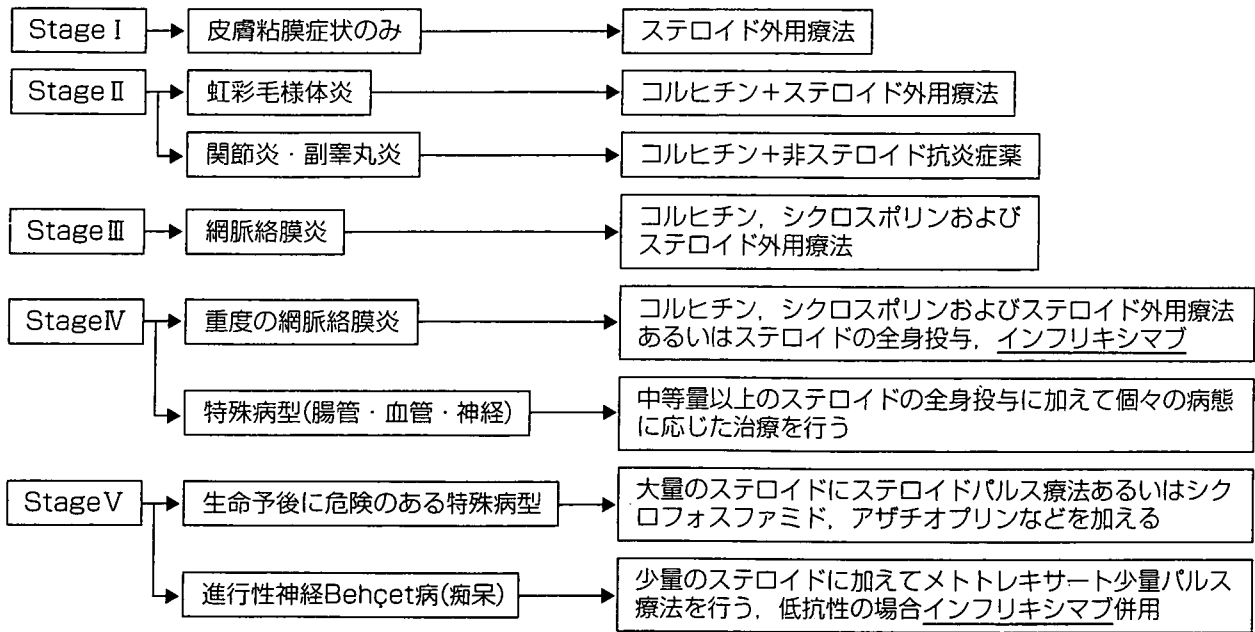


図. Behçet 病の重症度分類とそれに応じた治療方針  
Stage I から V にゆくに従って重症となる

減量することにより眼発作が誘発されることが多いので注意が必要である。

## 2) 病態に応じた治療の実際

眼発作を繰り返す場合, および特殊病型を合併する場合はなるべく早く専門医に紹介する。

治療の実際は以下のように総括される。

### (1) 眼病変

前眼部型(虹彩毛様体炎)に対しては, 散瞳薬の点眼, ステロイドの点眼や結膜下注射などに加えて, 発作の予防を目的としてコルヒチンの全身投与も行う。網膜ぶどう膜炎型に対しては, ステロイドの外用に加えて, 発作予防のための薬物の全身投与を精力的に行う。この際, コルヒチンで効果が不十分な場合は, シクロスポリンに切り換える。シクロスポリンは, 血中濃度(服薬直前の最低値-トラフレベル)を 100~200ng/ml に保つように投与量を調節する。シクロスポリンとコルヒチンとの併用はミオパチーを起こしやすいので注意が必要である。シクロスポリンのその他の副作用として, 腎障害, 神経障害(髄膜脳炎様症状)に特に注意が必要である<sup>1)</sup>。近年, 難治性眼病変に対する抗TNF- $\alpha$

抗体療法(インフリキシマブ)の有用性が証明され<sup>5)</sup>, わが国でも平成19年1月に保険適応が追加された。インフリキシマブ使用に当たっては, 結核等の感染症の発症に注意する必要がある。

### (2) 神経・血管・腸管病変

症状の重篤度に応じて中等量~大量のステロイド全身投与が行われる。症状が軽快し安定したらステロイドを減量するが, 急激な減量により原病のみならず眼病変の増悪を誘発することがあるので注意が必要である。ステロイドでも活動性の炎症が十分なコントロールが得られない場合はアザチオプリン, シクロフォスファミドなどの免疫抑制剤の投与を行う。これらの薬剤は, 長期投与により悪性腫瘍の発生の危険性があるので, 漫然と投与すべきではない。慢性進行型の神経ベーチェットに対しては, ステロイド, アザチオプリン, シクロフォスファミドはいずれも無効である。こうした慢性進行型に対してはメトトレキサートの少量パルス療法が有効である<sup>1)</sup>。メトトレキサートにても十分コントロールできない慢性進行型の神経Behçetに対

してインフリキシマブが有効であることが示唆されている。

これ以外の特殊病型としては、血管病変に対してはワーファリン、低用量アスピリン、チクロピジンなどの投与を併用する。また、腸管Behçetに対してはサラゾスルファピリジンやメサラジンの投与が有効な場合が多い。Crohn病においてはインフリキシマブの有用性が証明されているが、腸管Behçetにおいては症例報告が散見される程度で、今後症例を重ねた検討が必要である。

## 5. 実地医家ができることと専門病院に送るタイミング

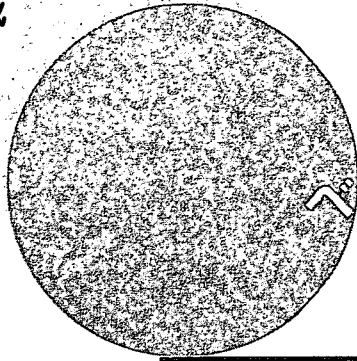
Behçet病の厚生労働省研究班の重症度基準Stage分類でStage2以下の場合実地医家での治療とフォローアップで差し支えない。眼病変は視力障害を残し患者のQOL (quality of life) を著しく阻害する。生命予後に影響をおよぼすのは、神経・血管・腸管の特殊病型である。特に、慢

性進行型の神経Behçetは患者のQOLを著明に阻害し、廃人同様にしてしまうという点から、最も憂慮すべき病態である。従って、Stage3以上の病変を認めた場合や疑われる場合には、速やかに専門病院に紹介することが望ましい。また、Stage2であっても、症状が繰り返す場合は、専門病院での治療が必要と考えられる。

## 文 献

- 1) 広畑俊成 : I. 病態解明の進歩 3. Behçet病. 日内会誌 88 : 1904-1909, 1999.
- 2) Hirohata S, Kikuchi H : Behçet's disease. *Arthritis Res Ther* 5 : 139-146, 2003.
- 3) Aramaki K, et al : HLA-B51 and cigarette smoking as risk factors for chronic progressive neurological manifestations in Behçet's disease. *Mod Rheumatol* 17 : 81-82, 2007.
- 4) Hirohata S : Is the long-term use of systemic corticosteroids beneficial in the management of Behçet's syndrome? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2 : 358-359, 2006.
- 5) Tugal-Tutkun I, et al : Efficacy of infliximab in the treatment of uveitis that is resistant to treatment with the combination of azathioprine, cyclosporine, and corticosteroids in Behçet's disease : an open-label trial *Arthritis Rheum* 52 : 2478-2484, 2005.

連載



## ベーチェット病

廣畑俊成\*

ベーチェット病は再発性口腔内アフタ性潰瘍、皮膚症状、外陰部潰瘍、眼病変を4主症状とする原因不明の炎症疾患である。特殊病型として、腸管ベーチェット病、血管ベーチェット病、神経ベーチェット病があり、これらは患者の生命予後を左右することから、眼病変とともにきわめて重要なウェートを占める。薬物治療としては、眼病変には、コルヒチン、シクロスポリンが用いられる。特殊病型に対しては、ステロイドが一般的に用いられるが、慢性進行型の神経ベーチェットに対しては、メトトレキサートが有効である。近年、難治性眼病変に対する抗TNF- $\alpha$ 抗体療法の有用性が証明され、今後特殊病型にも応用が期待される。

## はじめに

ベーチェット病は、再発性口腔内アフタ性潰瘍、皮膚症状、外陰部潰瘍、眼病変を4大主症状とする原因不明の炎症に基づく症候群である。特殊な場合を除き、一定の部位の炎症が慢性に持続するのではなく、急性の炎症が反復し、増悪と寛解をくり返しつつ遷延した経過をとるのが特徴である。わが国においては、本症を、上記4主症状を示す完全型とそうでない不全型に分類している。また特殊病型として、腸管の潰瘍性病変を示す腸管ベーチェット病、大小の動静脈の病変をきたす血

管ベーチェット病、脳幹・小脳・大脳白質の病変を主体とする神経ベーチェット病の3型を定義している。これら3つの特殊病型は、ベーチェット病の患者の生命予後を左右する場合も少なくないことから、本症の臨床においては眼病変の治療とともにきわめて重要なウェートを占める。

## 1. ベーチェット病の診断と重症度の判定

ベーチェット病の診断は1987年に改定された厚生省(現厚生労働省)特定疾患調査研究班の診断基準によりおこなわれている<sup>1)</sup>。一つ一つの主症状、副症状の有無を確認することと他疾患の除外が診断上重要である。発症当初からすべての症状がそろふことは稀で、種々の症状が経時的に出没することが多い。診断の補助的検査として、皮膚の被刺激性の亢進を反映する針反応(pathergy test)がある。無菌の注射針を前腕部の皮膚に刺入し、24~48時間後に同部の発赤・膿疱の形成を認めれば陽性である。また、活動期には末梢白血

## key words

コルヒチン  
シクロスポリン  
メトトレキサート  
インフリキシマブ

\*HIROHATA Shunsei/北里大学医学部膠原病・感染内科学

表 1. ベーチェット病の重症度 Stage 分類

Stage I	眼症状以外の症状(口腔粘膜のアフタ性潰瘍, 皮膚症状, 外陰部潰瘍)のみられるもの
Stage II	Stage I の症状に眼症状として虹彩毛様体炎が加わったもの Stage I の症状に関節炎や副睾丸炎が加わったもの
Stage III	網脈絡膜炎がみられるもの
Stage IV	失明の可能性があるか失明に至った網脈絡膜炎およびその他の眼合併症, 活動性または重度の後遺症を残す特殊病型(腸管ベーチェット病, 血管ベーチェット病, 神経ベーチェット病)
Stage V	生命予後に危険のある特殊病型, 中等度以上の知能低下を有す進行性神経ベーチェット病

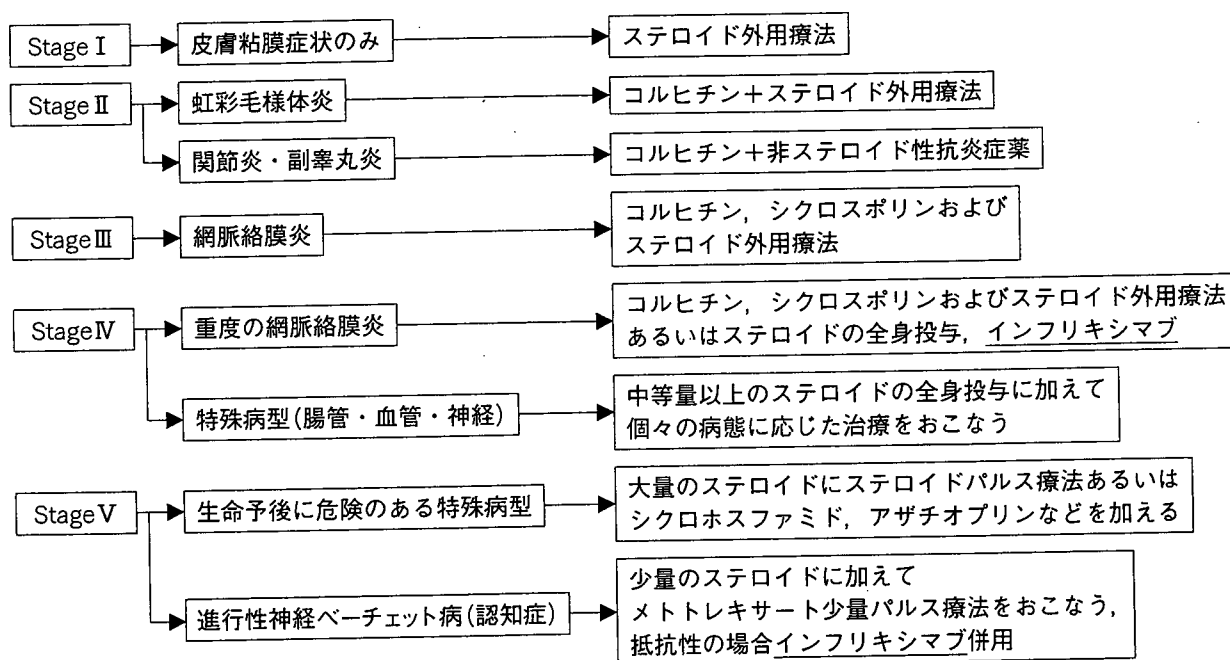


図 1. ベーチェット病の重症度分類とそれに応じた治療方針  
Stage I から V にゆくにしたがって重症となる。

血球数の増多・血沈の促進・血清 CRP 陽性などがみられる。また, HLA-B51 が陽性であれば診断上参考になる。一方, 2003 年にベーチェット病の厚生労働省研究班の重症度基準 Stage 分類が策定された(表 1)。この重症度基準の Stage 分類に基づいて大まかな治療方針を決定することができる(図 1)。

## 2. ベーチェット病の治療

### 1) 治療の基本方針: コルヒチン

重篤な視力障害を残しうる眼病変, 生命予後に影響を及ぼす特殊病型(神経・血管・腸管ベーチェット病)に対しては積極的な薬物療法をおこなうが, 口腔内アフタ, 陰部潰瘍, 皮膚病変に対しては原則としてステロイドの外用を中心とした

局所療法で対応する。コルヒチンは好中球機能を抑制することから、ベーチェット病の基本治療薬として頻用されるが、副作用として下痢・乏精子症・月経異常・催奇形性・筋症状(こむらがえり)・肝障害などに注意する必要がある<sup>1)</sup>。関節痛、結節性紅斑、副睾丸炎に対してはコルヒチンに加えて非ステロイド性抗炎症薬も用いられる。

## 2) 副腎皮質ステロイド

一般に、ステロイドの全身投与はベーチェット病の急性炎症症状を短期的に軽快させる効果があるが、持続的長期投与にはベーチェット病の各症状の発作を抑制する効果は認められない<sup>2)</sup>。ただし、眼病変のある患者においては急速にステロイドを減量することにより眼発作が誘発されることが多いので、注意が必要である。

## 3) 免疫抑制薬

### A. シクロスポリン

シクロスポリンはTリンパ球機能を選択的に抑制する免疫抑制薬であり、とくに臓器移植に際してよく用いられるが、ベーチェット病の眼病変に対しても有効性が証明されている<sup>3)</sup>。一般に5 mg/体重 kg/日より投与を開始するが、血中濃度(服薬直前の最低値:トラフレベル)を50~200 ng/mlに保つようにその投与量を調整する<sup>4)</sup>。最も重要な副作用は腎障害であり、これは腎細小血管に対する作用(腎血流低下)と尿細管の障害に基づくものと考えられている。また、コルヒチンとの併用でミオパチーを起こしやすいことが報告されているので、併用は避ける方が望ましい。その他、発熱、頭痛、髄膜刺激症状を主徴とする神経ベーチェット病様の症状を誘発することが知られている<sup>5)</sup>。こうした神経症状は臓器移植の際にシクロスポリンを投与してもみられないことから、神経ベーチェット病の病態と深く関係するものと考えられる。

### B. シクロホスファミド、アザチオプリン

アルキル化薬であるシクロホスファミドと代謝拮抗薬であるアザチオプリンは、眼症状の再発予防効果を有する(約20%)<sup>4)</sup>。しかし、長期連用により悪性腫瘍発生などの副作用がみられることなどから、最近では眼症状に対してはあまり用いられなくなった。

### C. メトトレキサート

慢性進行型の神経ベーチェット病においては、髄液中のIL-6の持続的高値が病態と深く関与する<sup>6)7)</sup>。慢性進行型の神経ベーチェット病に対しては、ステロイド、アザチオプリン、シクロホスファミドはいずれも無効であるが、メトトレキサートが有効であることが示されている<sup>6)7)</sup>(図2)。1週あたり10~15 mgを投与する。髄液IL-6が20 pg/ml以下に抑えられた状態が2年間維持できた後は、投与量を徐々に減量することができ、中止に至った例もある<sup>7)</sup>。副作用としては、葉酸阻害に基づく骨髄抑制、口内炎、消化管障害、肝障害と、アレルギーに基づくと考えられる間質性肺炎に注意が必要である。前者に対しては、葉酸(フォリアミン<sup>®</sup>)の5~10 mg/週の投与で、ある程度予防可能である。

## 4) インフリキシマブ

近年、難治性眼病変に対する抗TNF- $\alpha$ 抗体療法(インフリキシマブ)の有用性が証明され<sup>8)</sup>、わが国でも2007(平成19)年1月に保険適用が追加された。インフリキシマブは体重1 kgあたり5 mgを0週、2週、6週、14週、以後8週毎に点滴静注をおこなう。インフリキシマブ使用にあたっては、アナフィラキシーなどの投与時的反応と結核などの感染症の発症に注意する必要がある。インフリキシマブは、腸管ベーチェット病や神経ベーチェット病に対しても有効であることが示唆されている。

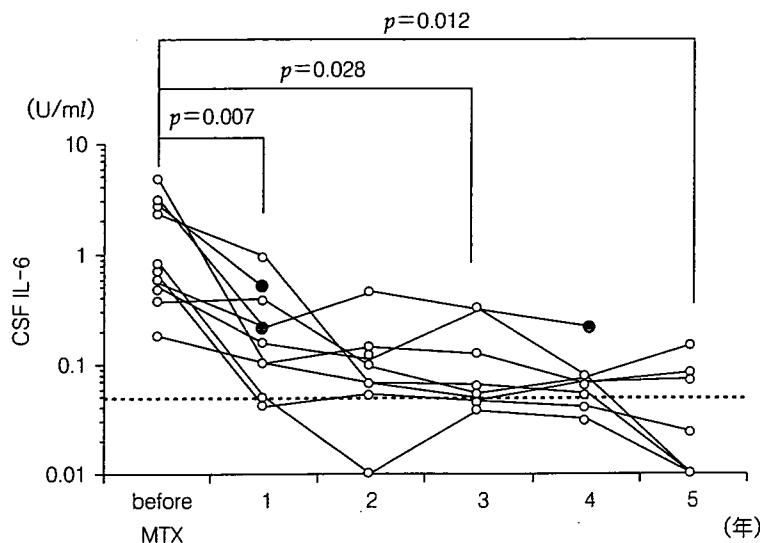


図 2. 進行性神経ベーチェット病に対するメトトレキサートの効果 (Kikuchi H *et al*, 2003<sup>7)</sup>より引用)  
 髄液 IL-6 の有意な低下がみられる。●は脱落したポイントを示す。

## おわりに

以上、ベーチェット病におけるステロイド、免疫抑制薬などの薬物治療の現状について概説した。今後、インフリキシマブをはじめとする生物学的製剤が、眼病変のみならず、特殊病型に対しても、幅広く用いられるようになるものと考えられる。

## 文献

- 1) 広畑俊成：I. 病態解明の進歩 3. ベーチェット病. 日内会誌 88 : 1904-1909, 1999
- 2) Hirohata S : Is the long-term use of systemic corticosteroids beneficial in the management of Behcet's syndrome? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2 : 358-359, 2006
- 3) Masuda K *et al* : Double-masked trial of cyclosporin versus colchicine and long-term open study of cyclosporin in Behcet's disease. *Lancet*

i : 1093-1096, 1989

- 4) 小暮美津子 : Behçet 病の眼科的治療. 医学のあゆみ 164 : 77-80, 1993
- 5) Kotake S *et al* : Central nervous system symptoms in patients with Behcet disease receiving cyclosporine therapy. *Ophthalmology* 106 : 586-589, 1999
- 6) Hirohata S *et al* : Behcet's disease. *Arthritis Res Ther* 5 : 139-146, 2003
- 7) Kikuchi H *et al* : Low dose MTX for progressive neuro-Behcet's disease : A follow-up study for 4 years. *Adv Exp Med Biol* 528 : 575-578, 2003
- 8) Tugal-Tutkun I *et al* : Efficacy of infliximab in the treatment of uveitis that is resistant to treatment with the combination of azathioprine, cyclosporine, and corticosteroids in Behcet's disease : an open-label trial. *Arthritis Rheum* 52 : 2478-2484, 2005

# ベーチェット病

廣畑俊成

北里大学医学部膠原病・感染内科学教授



## ベーチェット病とは

ベーチェット病は、再発性口腔内アフタ性潰瘍、皮膚症状、外陰部潰瘍、眼病変を四大主症状とする原因不明の炎症性疾患で、膠原病類縁疾患に位置づけられます。本症はトルコ、中東、中国、日本を結ぶ帯状のシルクロードに沿った地域に多く、欧米では少ないとされています。本邦における患者数は約2万人であり、発症率は最近横ばいとなっています。男女比は0.96であり、発病年齢は30歳台にピークがあります。ヒト白血球の型のうちHLA-B51との相関が認められるのが特徴です（患者さんの陽性率は約53.8%）。特殊な場合を除いて、本症では一定の部位の炎症が慢性に持続するのではなく、急性の炎症が反復し、増悪と寛解を繰り返しつつ遷延した経過をとるのが特徴です<sup>1)2)</sup>。

ベーチェット病では、HLA-B51などと関連した遺伝的素因となんらかの外因が発症に関与すると考えられています。本症の患者さんには扁桃炎・う歯の既往が多く、また手術・外傷・抜歯などの後に増悪することが多いので、細菌感染や機械的刺激などに対する過剰な反応が病気の本態ではないかと考えられています。

## どういうときに疑うか

ベーチェット病でよくみられる症状は、厚生省の診断基準のなかに取り上げられている四つの主症状と五つの副症状です（表1）。とくにこのなかで、繰り返す口腔内アフタ性潰瘍はほとんどの患者さんで見られます。こうした口腔内アフタ性潰瘍にいくつかの症状が重なってみられた場合は、ベーチェット病の可能性が高くなります。ベーチェット病の診断は、こうした症状の組み合わせによって行なわれています。わが国では、四大主症状をすべて示す完全型とそうでない不全型に分類されています。一方、特殊病型として、腸管ベーチェット、血管ベーチェット、神経ベーチェットの3型があり、これらは生命を脅かすほど重篤になる場合もあり注意が必要です。

## ベーチェット病の症状

ベーチェット病の臨床症状は、診断の決め手として重要な主症状と、重篤な臓器障害をきたしうる特殊病型を含む副症状に集約されます。発症当初からすべての症状がそろふことはまれであり、種々の症状が経時的に出没することが多いのが特徴です。

主症状としては、まず口腔粘膜のアフタ性



表1 ベーチェット病診断基準（厚生省ベーチェット病調査研究班，1987）

- 
1. 主症状
    - (1) 口腔粘膜の再発性アフタ性潰瘍
    - (2) 皮膚症状
      - a) 結節性紅斑
      - b) 皮下の血栓性静脈炎
      - c) 毛囊炎様皮疹，座瘡様皮疹
    - (3) 眼症状
      - a) 虹彩毛様体炎
      - b) 網膜ぶどう膜炎（網脈絡膜炎）
      - c) a)，b) を経過したと思われる虹彩後癒着，水晶体上色素沈着，網脈絡膜萎縮，視神経萎縮，併発白内障，続発緑内障，眼球瘻
    - (4) 外陰部潰瘍
  2. 副症状
    - (1) 変形や強直をともしない関節炎
    - (2) 副睾丸炎
    - (3) 回盲部潰瘍で代表される消化器病変
    - (4) 血管病変
    - (5) 中等度以上の中樞神経病変
  3. 病型診断の基準
    - (1) 完全型：主症状四つ
    - (2) 不全型
      - a) 主症状三つ（あるいは主症状二つと副症状二つ）
      - b) 眼症状+主症状一つ（あるいは副症状二つ）
    - (3) 疑い：主症状の一部が出没
    - (4) 特殊病型
      - a) 腸管（型）ベーチェット病
      - b) 血管（型）ベーチェット病
      - c) 神経（型）ベーチェット病
  4. 参考となる検査所見
    - (1) 皮膚の針反応
    - (2) 炎症反応
 

赤血球沈降速度の亢進，血清 CRP の陽性化，末梢白血球数の増加
    - (3) HLA-B51 (B5) の陽性
- 

潰瘍はほぼ必発で，初発症状である場合が多いようです。

皮膚症状としては，下腿に多くみられる痛みをともし赤い盛り上がった皮疹（結節性紅斑）やにきびの化膿したような皮疹（毛囊炎様皮疹）がみられます。さらに，皮下の静脈に有痛性の硬結をきたす血栓性静脈炎もよくみられます。また，ベーチェット病では皮膚の被刺激性が亢進しており，虫刺され・外傷などにより容易に化膿する傾向があります。皮膚に針を刺した後に発赤・膿疱を認める“針反応”も同じ機序でおこると考えられ，約50%の患者さんで陽性になります。

眼症状は重要な主症状の一つで，炎症が前眼部のみにおこる虹彩毛様体炎型と，眼底の病変をともし網膜ぶどう膜炎型に大別されます。前者では，白目の部分が充血し，ときには黒目の部分に白血球が多数たまり前房蓄膿という状態になりますが，視力の低下は軽度です。一方，後者では，自覚的には目の前に霧がかかったようになり，急激な視力低下をきたします。

外陰部潰瘍は，陰茎，陰囊，小陰唇，陰壁などにできる口腔内アフタに似た境界鮮明の有痛性の潰瘍で，ひどい場合には，鼠径部の皮膚にも潰瘍を生じることがあります。外陰

部潰瘍は、一般に発病初期に多くみられますが、口腔内アフタに比べて再発は少ないようです。

そのほか副症状としては、関節炎、副鼻腔炎、消化器病変（腸管ベーチェット）、血管病変（血管ベーチェット）、神経病変（神経ベーチェット）が認められますが、いずれの症状も頻度は主症状ほど多くはありません。

## どう治療するか

……………

### 1) 治療の基本的な考え方

重篤な視力障害を残しうる眼病変、生命予後に影響を及ぼす特殊病型（神経・血管・腸管ベーチェット）に対しては積極的な薬物療法を行なう必要がありますが、口腔内アフタ、外陰部潰瘍、皮膚病変に対しては副腎皮質ステロイドの外用を中心とした局所療法での対応でも十分です。しかし、疼痛の強い場合や発作の頻度が多い場合には全身的薬剤投与を行ないます。この場合はコルヒチン、非ステロイド抗炎症薬（NSAID）が中心となります。

ベーチェット病では白血球（好中球）の機能が亢進していることが知られており、コルヒチンはこの好中球機能を抑制することから、ベーチェット病の治療薬として頻用されますが、副作用として下痢、乏精子症、月経異常、催奇性、筋症状（こむらがえり）に注意する必要があります。NSAIDの連用にあたっては、副作用としてとくに消化性潰瘍に対する注意が必要です。また、皮膚・粘膜病変に対しては、イコサペント酸エチルが有効な場合がありますが、副作用も少なく、試みる価値があります。

副腎皮質ステロイドの全身投与は、ベーチェット病の急性炎症を短期的に軽快させる効果がありますが、持続的に長期使用してもベーチェット病の各症状の新たな発作を抑制する効果はありません<sup>3)</sup>。また、逆に眼病変のある場合に急に副腎皮質ステロイドを減らす

と新しい眼発作が誘発されるので、注意が必要です。

### 2) 日常生活の管理

ベーチェット病においては、気象条件、感染、手術、外傷、月経、ストレスが増悪因子となることが多いので、避けることのできるものは避けるようにすることが大事です。とくに、う歯やそのほかの感染巣（皮膚の膿瘍など）がある場合はかならずその治療を行なっておく必要があります。さらに、毎食後かならず歯磨きと口腔内の洗浄を欠かさないようにすることが、口腔内アフタの予防にもつながります。喫煙は慢性進行型の神経ベーチェットの危険因子であり、そのほかの病変にも悪影響を及ぼすと考えられるので、中止することが大切です<sup>4)</sup>。

### 3) 治療の実際

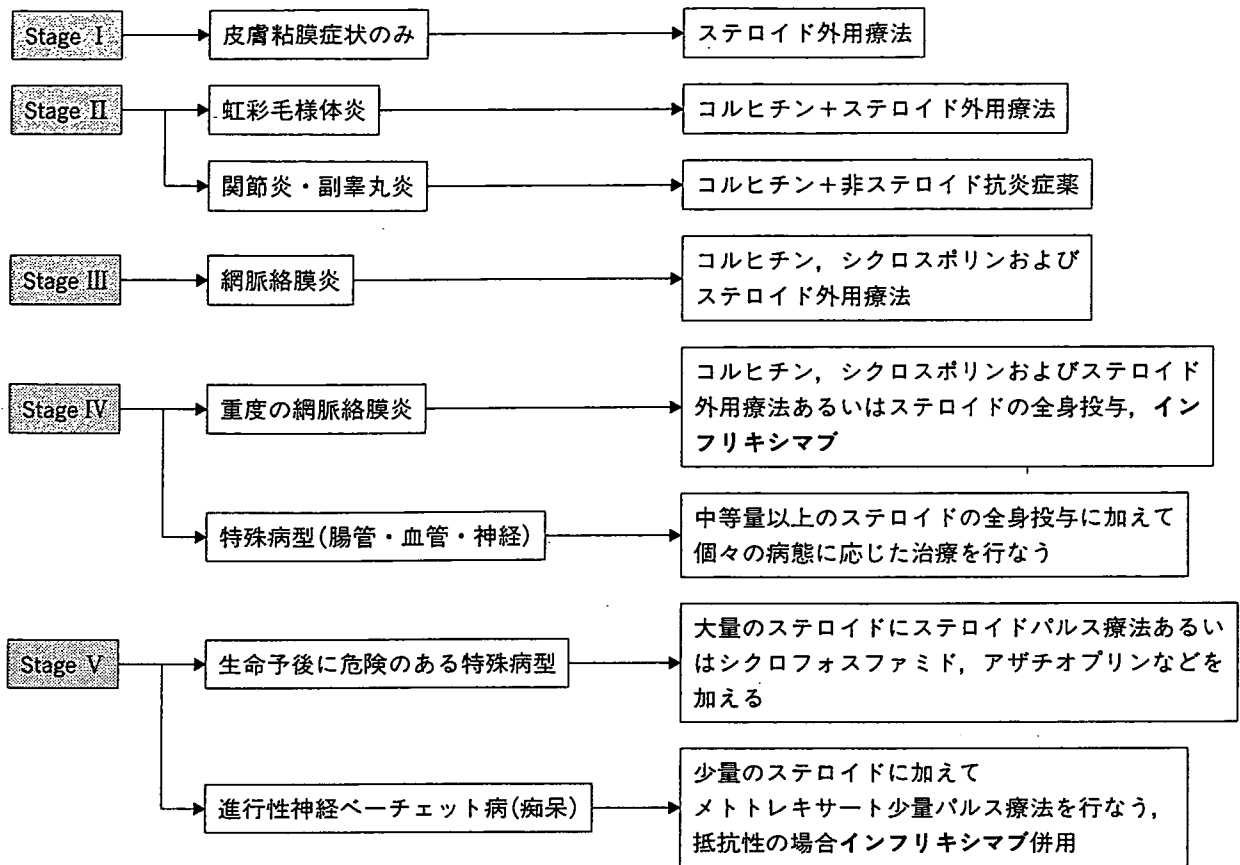
2003年にベーチェット病の重症度分類基準が厚生労働省の研究班により示され、これによって大まかな治療方針を決定することができます（図1）。

#### ①眼病変

発作が生じた場合にはステロイド薬の点眼・局所（結膜下）注射を行ないます。しかし、眼病変を繰り返すことにより、視力低下ひいては失明の危険がありますので、発作を繰り返さないようにすることが大切です。

発作の予防を目的としては、まずコルヒチンの全身投与が一般的に行なわれます。この際、コルヒチンで効果が不十分な場合は、シクロスポリン（ネオーラル）と呼ばれる免疫抑制剤の治療が行なわれます。シクロスポリンは、副作用を予防するという目的で、血中濃度（トラフ値と呼ばれる服薬直前の最低値）を100～200 ng/mlに保つように投与量が調節されます。シクロスポリンの副作用としては腎障害がもっとも多くみられますが、

図1 ベーチェット病の重症度分類とそれに応じた治療方針



Stage I から V にいくにしたがって重症となる

ベーチェット病の患者さんに特有な副作用として、神経障害（髄膜脳炎様症状）に注意する必要があります。シクロスポリン内服中に、頭痛・発熱をきたした場合には、まずこの副作用を疑ってみる必要があります。

難治性の眼病変に対しては、抗 TNF- $\alpha$  抗体（インフリキシマブ）が有用であることが証明され<sup>9)</sup>、2007年1月に保険適応になっています。

## ②神経・血管・腸管病変

これらの特殊病型と呼ばれるものは、生命にかかわることが多く、積極的な治療が必要です。基本治療薬であるコルヒチンに加えて、中等量～大量の副腎皮質ステロイドの全身投与（プレドニゾロン 30～60mg/日相当）が行なわれます。症状が軽快し安定したら副腎皮質ステロイドを減量していきませんが、急激な減量により、原病のみならず眼病変の増悪

を誘発することもあるので、注意が必要です。一部の患者さんにみられる慢性進行型の痴呆・小脳症状を主体とした難治性の神経ベーチェットに対しては、メトトレキサートの少量パルス療法が有効であることが示されています<sup>2)</sup>。

血管病変に対してはワーファリン、アスピリン（小児用パファリン）など血液凝固を抑制する薬剤の投与を併用することもあります。腸管病変に対しては、副腎皮質ステロイドに加えてサラゾスルファピリジン（サラゾピリン）やメサラジン（ペンタサ）の投与が併用されることがあります。また、血管病変や腸管病変においては外科的治療が必要となる場合もあります。

## 今後の展望

ベアチェット病の眼病変に対する治療は、インフリキシマブの登場で画期的に改善されていくものと期待されます。しかし、特殊病型、なかでも慢性進行型の神経ベアチェットは今なお難治性であり、患者さんを廃人同様にしてしまう点で憂慮すべき病態です。こうした難治性病態に対してもインフリキシマブの効果が期待されています。

### 〈文献〉

- 1) 広畑俊成：I. 病態解明の進歩 3. Behçet 病. 日内会誌 88：1904-1909, 1999
- 2) Hirohata S, Kikuchi H : Behcet's disease.

Arthritis Res Ther 5 : 139-146, 2003

- 3) Hirohata S : Is the long-term use of systemic corticosteroids beneficial in the management of Behcet's syndrome? Nat Clin Pract Rheumatol 2 : 358-359, 2006
- 4) Aramaki K et al : HLA-B51 and cigarette smoking as risk factors for chronic progressive neurological manifestations in Behcet's disease. Mod Rheumatol 17 : 81-82, 2007
- 5) Tugal-Tutkun I et al : Efficacy of infliximab in the treatment of uveitis that is resistant to treatment with the combination of azathioprine, cyclosporine, and corticosteroids in Behcet's disease: An open-label trial. Arthritis Rheum 52 : 2478-2484, 2005

[ひろはた・しゅんせい/膠原病・感染内科]

【整形外科医のための標準薬物治療の基礎知識】

ブシラミン—まだまだ存在価値がある traditional DMARD—  
*Bucillamine; A valuable traditional DMARD*

廣畑 俊成\*  
*Shunsei Hirohata*

はじめに

ブシラミン(bucillamine; BUC)は本邦で開発されたSH化合物であり、メトトレキサート(methotrexate; MTX)とともに関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)に対する有効な疾患修飾性抗リウマチ薬(disease modifying antirheumatic drug; DMARD)としての地位を確立したといっても過言ではない。本稿においては、BUCの薬理作用、有効性、副作用、使い方などについて概説するとともに、MTXとBUCの併用効果についても触れてみたい。

I. 薬理作用

1. BUCの構造上の特徴

D-ペニシラミン(D-penicillamine; DPC)とBUCはいずれも分子内にSH基を有するいわ

ゆるSH化合物である(図1)<sup>1)</sup>。事実、この両薬剤の効果発現までの期間・臨床効果・副作用などについては類似している点も多い。しかし、この両薬剤は構造上決定的な違いを有している。すなわち、DPCは分子内にSH基を1つしかもたないのに対し、BUCは同一分子内にSH基を2つ有しているという点である。このために、BUCを投与された患者においては生体内でいくつかのユニークな代謝産物が形成されることが明らかになっている。その中には、2つのSH基が分子内SS結合を形成したSA981、2つのSH基のうちの1つがメチル化されたSA679、SH基が2つともメチル化されたSA672が含まれる<sup>1)</sup>。このような代謝経路以外にも、DPC・BUCは分子間でSS結合を形成することが知られている。

2. BUCの薬理作用

1) リンパ球に対する作用

関節リウマチにおいては、リウマトイド因子(以下RF)や抗CCP抗体などの自己抗体が出現し、その病態形成にあたりBリンパ球が重要な役割を果たすことが推察される。

図2に*in vitro*におけるBUCの各種代謝体とDPC(すべて50 μg/ml)のヒトBリンパ球に対する作用を示した<sup>1)</sup>。BUCは銅イオン

Key words▶

SH化合物 (Sulfhydryl compounds)  
D-ペニシラミン (D-penicillamine)  
メトトレキサート (methotrexate)  
併用療法 (combination therapy)

\*北里大学医学部膠原病・感染内科学  
(〒228-8555相模原市北里1-15-1)

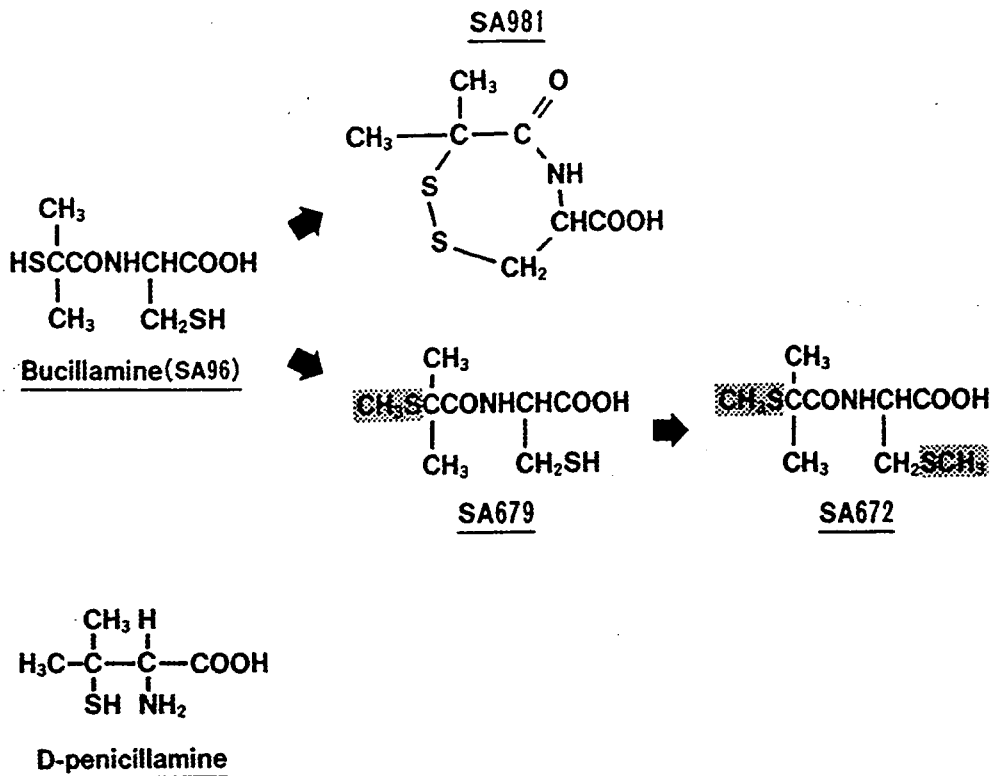


図1 DPC, BUCおよびその代謝体の化学構造式

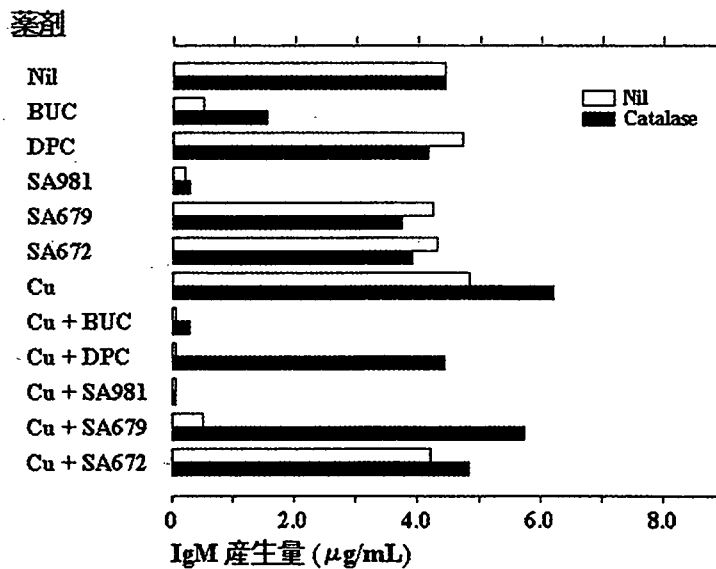


図2 DPC, BUCおよびその代謝体のBリンパ球によるIgM産生の抑制効果の比較  
SA+IL-2によりBリンパ球を刺激し, IgM産生を誘導, 薬剤はすべて50 μg/mlで添加. CuSO<sub>4</sub> (5 μg/ml), カタラーゼ(10 μg/ml)を適宜添加. (文献1より引用)

の非存在下においても *Staphylococcus aureus* (SA) + インターロイキン(IL)-2により刺激されたBリンパ球のIgM産生を抑制したが, 銅イオンの添加によりその抑制作用はさらに

増強した. カタラーゼはBUCのIgM産生抑制作用を部分的に解除した. これに対して, DPCは銅イオンの存在下においてのみBリンパ球のIgM産生を抑制し, この抑制効果

はカタラーゼの添加により完全に消失した。SA679はDPCと全く同様の抑制効果を示したが、SA672には全くBリンパ球の抑制効果が認められなかった。注目すべき点は、分子内S-S結合を有するSA981は銅イオンの存在・非存在にかかわらず強いIgM産生抑制作用を示し、しかもこの抑制効果がカタラーゼにより全く影響を受けなかった。

BUCとDPCの免疫調節作用についての重要なポイントは以上に示したデータに集約されている。すなわち、①BUCにおいてもDPCにおいてもフリーのSH基の存在がその作用上必須であり、これは主として銅イオンとの相互作用により生じた過酸化水素などの活性物質を介して働く、②BUCの代謝体であるSA679の作用はDPCの作用とほぼ同一である、③分子内S-S結合を有するSA981は独特の強力なBリンパ球の抑制作用を有し、この代謝体の形成がBUCのユニークな作用を支えている。さらに、*in vivo*でもBUCからSA981への転換が起こっていることは確認されており、これがBUCの銅イオン非依存性の抑制作用を支えているものと考えられる。

## 2) 骨髄細胞に対する作用

近年、RAの病態形成において骨髄の異常が関与することが報告されている<sup>2)</sup>。RA関節滑膜には、マクロファージ様のA型滑膜細胞と線維芽細胞様のB型滑膜細胞が存在し、このいずれもが骨髄CD34<sup>+</sup>細胞より分化していることがわかっている<sup>2)</sup>。MTXは骨髄CD34<sup>+</sup>細胞からのA型滑膜細胞様細胞の分化を阻害すると考えられるが、BUCにはこうした作用は認められない<sup>2)</sup>。逆に、SA-981は骨髄CD34<sup>+</sup>細胞からのB型滑膜細胞様細胞の分化を阻害すると考えられるが、MTXにはそう

した抑制作用はないようである<sup>2)</sup>。したがって、これらの*in vitro*のデータよりMTXとBUCの併用による相乗的治療効果が十分期待されることである。

## II. 有効性

BUCのRAに対する有効性は臨床治験により実証されているが、プラセボとの二重盲検試験では投与8週間目より有意差がみられている<sup>3)</sup>。一方で、自験例の中には投与後6カ月より効果が著明に出現し始めたものもあることから、副作用のない限り少なくとも6カ月間は投薬を継続するべきであろう。

RA患者を対象とした5年間にわたる長期投与試験ではBUCは20.6%の患者で5年間にわたり有効性を示し、投与継続率は他のDMARDとほぼ同等であることが報告されている<sup>4)</sup>。しかし、この報告でのBUCの初期投与量が300 mg/日であり、かつ副作用による中止例が23.5%であったことから、初期投与量を100mg/日としていた場合は5年間の継続率が上昇していた可能性が示唆され<sup>4)</sup>。事実、三橋らの報告ではBUCの5年間の投与継続率は37.1%であり、すべての例は200 mg/日以下であったという<sup>5)</sup>。したがって、副作用による投与中止を避けるためにも、BUCは50～100 mg/日より始めて、最大200 mg/日まで増量するという方法が推奨されている。

BUCは注射金剤・経口金剤の無効例や効果減弱例に対しても有効であることが数多く報告されている。また、DPC無効例に対してもBUCが有効であることが多いが、これは前述したように同じSH基剤であるDPCともBUCの作用機序は異なることより理解できる<sup>6)</sup>。

表1 ブシラミン(BUC)による顆粒球減少

1. 投与開始後1カ月前後での発症が多い
2. 感冒様症状(発熱・咽頭痛)が前駆症状としてみられることが多い
3. 進行が急激である
4. 投与中止で徐々に回復する
5. G-CSF使用時は顆粒球が増え過ぎないように十分注意する

表2 ブシラミン(BUC)による腎障害

1. 投与開始後6カ月以内での発症が多い
2. 用量依存性の傾向がある(DPCでは用量依存性が証明されている)
3. 膜性腎症の組織像をとることが多い
4. 休薬で陰性化しない場合、プレドニゾン30 mg/日程度の投与により完全に陰性化する

表3 ブシラミン(BUC)による肺障害

1. 高齢者に多い
2. リウマトイド因子(RF)高値陽性例が多い
3. 投与開始後3カ月前後での発症例が多い
4. RAに対するブシラミン有効例に多い
5. 初発症状では乾性咳嗽がみられる
6. 胸部X線上ではmottled型(まだらな浸潤影, 索状影)を示すことが多い
7. 投与中止のみで軽快することもあり, 必ずしも直ちにステロイドの投与が必要なわけではない

### Ⅲ. 副作用

BUCはDPC同様SH基をもっていることから、DPC類似の副作用がみられる。主な副作用として、過敏症(皮膚症状)、ネフローゼ症候群(蛋白尿)、肝障害、白血球減少(特に顆粒球減少)、間質性肺炎ならびに胃腸障害などがある。

#### 1. 白血球減少(顆粒球減少) (表1)

BUCによる顆粒球減少はDPCと同様、投与開始後1カ月前後で発症する例が多い。また発症した場合進行が急激であるため、この期間に必ず血液検査を行い顆粒球の変動を確認することが大切である。特に、顆粒球減少の前駆症状としてみられる発熱や咽頭痛の発

現には注意を要する。白血球の減少は、本剤の投与中止により徐々に回復するが、 $1,000/\text{mm}^3$ 台に低下したり感染症がある場合にはG-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)を使用することになる。血小板減少をきたすこともある。

#### 2. 腎障害(ネフローゼ症候群)

BUCによる腎障害の特徴を表2に示す。蛋白尿はBUCの用量が多くなるほど出現しやすい。したがって後述するように、BUCの投与量は200 mg/日までにとどめておく方が無難であると考えられる。DPCによる腎障害と同様に、組織学的には膜性腎症の病理像を示す。BUCの投与を中止するだけでは改善しないことが多い。このような場合には、



ステロイドの投与もしくは増量(プレドニゾン30 mg/日程度)によりすみやかに改善することが多い。

### 3. 肺障害(表3)

BUCによる肺障害は、高齢者あるいはRF高値の症例に発現することが多く、投与後3カ月前後の発症例が多いとされる<sup>7)</sup>。また、RAに対する有効例に多い<sup>7)</sup>。初発症状では乾性咳嗽がみられる。胸部X線上ではまだらな浸潤影・索状影を示すことが多い。投与中止だけで肺炎が消失することもあり、必ずしも直ちにステロイドの投与が必要なわけではない。発症様式は潜行性で徐々に進行していき、投与を中止すると改善がみられる。致命的な症例は報告されておらず、その意味ではMTX肺炎と対照的である。

## IV. 使い方

BUCが一般臨床に使用され始めた当時、BUCによる治療は添付文書どおり300 mg/日(100 mg錠を1日3回、毎食後に経口投与)で開始されていた。しかし、300 mg/日では副作用の発現頻度が上昇することが明らかになり<sup>8)</sup>、現在では1日100 mgより投与を開始し、増量していく方法が推奨されている。しかし、1日300 mgまで増量されることは少ない。これは、BUCの効果と副作用の発現とのバランスに基づいている。逆に、最近では1日50mgでも良好な効果が得られることが明らかになってきており、50 mg錠も用いられている。

現在、BUCの1日平均処方量は約200 mgである。投与中に副作用の発現がみられた場合には、減量または休薬して経過観察する。

動物実験でBUCによる催奇性は認められていないが、妊婦の安全性に対する報告はな

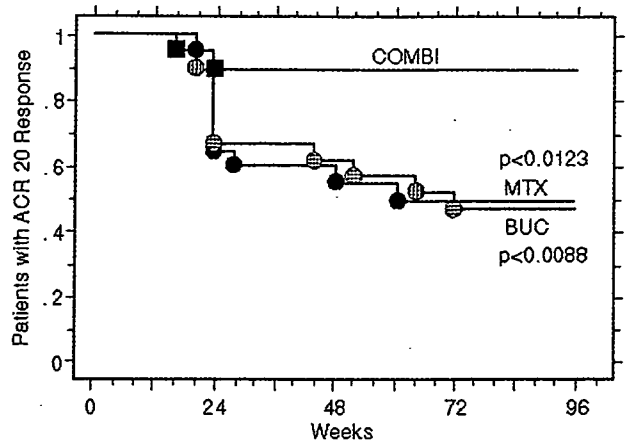


図3 BUCとMTXの併用効果

BUCとMTXの併用群ではおのこの単剤群よりもACR20の維持率が有意に高い(文献9より引用)

いため、投与は避ける。なお、血液障害、骨髓機能低下、腎障害のある患者に対しては投与禁忌である。

## V. MTXとの併用療法

市川らによりRAに対するBUCとMTXの併用効果が検討された結果、BUC+MTXの併用はおのこの単剤投与に比較して、24カ月後のACR20の改善率が79%と有意に高かったことが報告されている<sup>9)</sup>。さらに、いったん達成したACR20の継続率もBUC+MTX併用群で有意に高いことが示された(図3)<sup>9)</sup>。前述したように、BUCとMTXはRA骨髓CD34+細胞に対する作用が異なり、両者の併用によりA型滑膜細胞とB型滑膜細胞の両者の分化を阻害し得る可能性が示唆されている。このように、BUC+MTXの併用効果については*in vitro*のデータからも裏づけられている<sup>2)</sup>。しかし、実際的に使用する場合には、BUCとMTXの両者を同時に開始すると、副作用の出現した際にいずれの薬剤に起因したもののかの同定に苦慮する可能性がある。したがって、まず片方の薬剤より開始して、副作用のないことを確認したうえで併用を行う方

が無難であろう。

## おわりに

以上、本邦で開発されたBUCの作用機序・効果・副作用・使用法を中心に概説した。特に、MTXとの併用療法のおおのこの単剤による治療に対する優位性が証明されたことより、生物学的製剤に次ぐ有力な治療法であると期待される。BUCの至適用量は100～200 mg/日であるが、本邦でのMTXの保険上の使用量の上限は8 mg/週と欧米の50%であり、至適とはいえない。今後、MTXのより高用量との併用についても検討していく必要があると考えられる。

## 文 献

- 1) Hirohata S, Lipsky PE : Regulation of B cell function by bucillamine, a novel disease-modifying antirheumatic drug. Clin Immunol Immunopathol 66 : 43-51, 1993
- 2) 広畑俊成 : シンポジウム5 関節リウマチにおける抗リウマチ薬併用療法の現況と今後の展望—関節リウマチ患者骨髄由来細胞に対するメトトレキサートとブシラミンの作用 第19回日本臨床リウマチ学会総会抄録集, p53, 2004
- 3) 塩川優一, 小川暢也, 安倍千之, 他 : SA96の慢性関節リウマチに対する薬効検定—多施設協同二重盲検群間比較試験—。医学のあゆみ 135 : 1116-1133, 1985
- 4) 西村慶太, 内田詔爾, 渡辺房雄, 他 : 慢性関節リウマチに対するブシラミンの長期投与成績—5年間投与成績および投与初期における効果の予測—。炎症 13 : 293-299, 1993
- 5) 三橋尚志, 万波健二 : 慢性関節リウマチに対するブシラミンの長期使用成績。臨床リウマチ 13 : 268-274, 2001
- 6) 西村慶太, 内田詔爾, 渡辺房雄, 他 : 慢性関節リウマチに対するブシラミンからD-ペニシラミンへのスイッチング(第二報)—スイッチングの効果およびD-ペニシラミンからブシラミンへのスイッチングとの比較。リウマチ科 8 : 344-350, 1992
- 7) 根岸雅夫, 利 修治, 笠間 毅, 他 : Bucillamineによる肺障害—全国アンケート調査を基にして—。リウマチ 32 : 135-139, 1992
- 8) 西谷皓次, 太田善介 : SH剤の最近の使い方—効果と副作用。リウマチ科 5 : 42-47, 1991
- 9) Ichikawa Y, Saito T, Yamanaka H et al : Therapeutic effects of the combination of methotrexate and bucillamine in early rheumatoid arthritis: a multicenter, double-blind, randomized controlled study. Mod Rheumatol 15 : 323-328, 2005

\*

\*

\*

# Gene trap mutagenesis in mice: New perspectives and tools in cancer research

Ken-ichi Yamamura<sup>1</sup> and Kimi Araki

Division of Developmental Genetics, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, 2-2-1 Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan

(Received July 30, 2007/Accepted August 7, 2007/Online publication September 17, 2007)

The complete human DNA sequence of the human genome was published in 2004 and we entered the postgenomic era. However, many studies showed that gene function is much more complex than we expected, and that mutation of disease genes does not give any clue for molecular mechanisms for disease development. Since the first report on gene knockout mice in 1989, knockout mice have been shown to be a powerful tool for functional genomics and for the dissection of developmental processes in human diseases. In accordance with this successful application of knockout mice, three major mouse knockout programs are now underway worldwide, to mutate all protein-encoding genes in mouse embryonic stem cells using a combination of gene trapping and gene targeting. We developed the exchangeable gene trap method suitable for large scale mutagenesis in mice. In this method we can produce null mutation and post-insertional modification, enabling replacement of the marker gene with a gene of interest and conditional knockout. We herein discuss the effect of this gene-driven type approach for cancer research, especially for finding the genes that are related to cancer, but are paid little attention in hypothesis-driven cancer research. (*Cancer Sci* 2008; 99: 1–6)

It is a well known fact that a gene, for example the  $\alpha$ -fetoprotein gene, expressed during development is often reactivated in cancer cells. In addition, there are some similarities between carcinogenesis and embryonic development. One important function of development involves the production and organization of all of the diverse types of cells in the body. This generation of cellular diversity is accomplished by cell proliferation, followed by cell differentiation. The processes that organize the different cells into tissues and organs are called morphogenesis and growth. Although cancer tissues seem to be disorganized, we thought that they require cell differentiation and harmonization of these differentiated cells. For example, they need new blood vessels to obtain nutrition and energy for themselves. From this point of view, we hypothesize that many of the genes involved in embryogenesis may have functions in cancer cells, not just as markers, and that we can find genes that have unexpected functions in cancer cells. Thus, we decided to use the gene trap approach to find such genes.

## Enhancer trap as a tool for gene identification

A strategy to monitor transcriptionally active regions of the genome was first described in bacteria.<sup>(1)</sup> It involved the introduction of reporter constructs that require the acquisition of *cis*-acting DNA sequences in the genome to activate reporter gene expression. In this way, genes are identified based on expression information and subsequently cloned from DNA sequences flanking the site of insertion. This approach was then applied for higher organisms using modified vectors suitable for eukaryotic transcription units. Initially, the enhancer trap vector was developed based on

the observation that cellular enhancers are capable of acting on heterologous promoters using cultured cell lines.<sup>(2)</sup> In drosophila, the enhancer trap approach was used successfully in a large-scale screening for genes expressed at particular developmental stages or in particular lineages.<sup>(3)</sup> The *lacZ* reporter was used to provide a sensitive way to detect expression in whole embryos. Similarly, enhancer trap vectors were found to exhibit unique temporal and spatial patterns of *lacZ* expression in transgenic mice.<sup>(4,5)</sup> Thus, this method was initially used for finding unknown genes in the genome, but not for the production of a mutation. However, an enhancer is sometimes located far from a coding region in the eukaryotic genome. Thus, it is difficult to search for the gene, because isolation of probes and screening of the cDNA library are required to identify the gene.

## Exon trap and promoter trap as tools for mutagenesis

To overcome problems in the enhancer trap approach, Gossler *et al.*<sup>(6)</sup> developed a new strategy in which mouse embryonic stem (ES) cells and an exon trap vector were used to screen many integration events and rapidly clone the associated genes. Although in the published reports, the term 'gene trap' is used, the more accurate term 'exon trap' is used in this manuscript. Exon trap vectors are designed to generate spliced fusion transcripts between the reporter and the endogenous gene present at the site of integration.<sup>(7,8)</sup> The essential feature of the exon trap design is the placement of a splice acceptor in front of a promoterless *lacZ* gene. Integrations of the vector into the intron of a gene in the correct orientation were predicted to create *lacZ* fusion transcripts; and if the reading frames of the endogenous genes and *lacZ* are the same, an active  $\beta$ -galactosidase fusion protein should be produced. An alternative method, the promoter trap, was also developed to isolate the transcriptional control element, promoter, using cultured cells.<sup>(9)</sup> Because this vector contains only the coding sequences of the reporter gene, it is expected to require insertions into exons or the 5' untranslated region to activate reporter gene expression. These vectors can create *lacZ* fusion products with endogenous genes and, as a result, may interfere with the normal coding capacity of the endogenous gene and thereby create a mutation. Moreover, cloning a portion of the endogenous gene directly from the *lacZ* fusion transcript eliminates the time-consuming task of searching for exons in flanking genomic DNA. Eventually, the exon trap and promoter trap approaches are applied to disrupt genes expressed in ES cells.<sup>(10,11)</sup> The use of ES cells brings several advantages. First, the exon or promoter trap technology in ES cells made it possible to carry out a large scale disruption of genes in mice.<sup>(12–15)</sup> Although the ability to carry out large scale screens has proven essential in unraveling the genetic

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: yamamura@gpo.kumamoto-u.ac.jp

program underlying embryogenesis in organisms such as *Drosophila melanogaster*, these types of screens in mammals were made difficult by the large genomic size. Furthermore, the cost and space required to house large numbers of animals and the relatively long breeding period have limited the undertaking of large scale screens. These disadvantages can be overcome by the use of ES cells. Second, it is possible to prescreen ES cells for desired insertion events and for desired expression patterns. ES cells can be induced to differentiate to many types of cells. Thus, *in vitro* preselection of gene-trapped ES clones is possible by examining the *lacZ* expression during differentiation.<sup>(16-19)</sup> Third, monitoring the *lacZ* fusion gene activity in embryos should enable one to readily visualize the pattern of endogenous gene expression during development. Thus, this method was used for a large scale screening for insertional mutation in developmentally regulated genes in mice.<sup>(12,20,21)</sup>

### Development of new trap methods

We first developed a poly A trap vector.<sup>(22)</sup> As expected, the exon or promoter trap can be used for those genes expressed in ES cells. Thus, these methods can not be used for genes that are not expressed in ES cells. The constructs used in our poly A trap experiments consist of promoter-less *lacZ* and neomycin phosphotransferase (*neo*) expression unit without its own poly A addition signal sequence. We removed the poly A addition signal sequence because the *neo* gene was expected to be expressed only when the trap vector could use the poly A addition signal of the endogenous gene. Although we isolated six ES clones and sequenced 3'RACE (rapid amplification of cDNA end) products, there were no sequences that completely matched with the consensus sequence of the mammalian poly A addition signal. Other groups also constructed poly A trap vectors and were used to capture a broader spectrum of genes including those not expressed in ES cells.<sup>(15,23,24)</sup> However, it turned out that poly A trapping inevitably selects for the vector integration into the last introns of the trapped genes, resulting in the deletion of only a limited C-terminal portion of the protein encoded by the last exon of the trapped gene. Shigeoka *et al.*<sup>(25)</sup> demonstrated that this remarkable skewing is caused by the degradation of a selectable-marker used for poly A trapping via an mRNA-surveillance mechanism, nonsense-mediated mRNA decay (NMD). The NMD pathway is universally conserved among eukaryotes and is responsible for the degradation of mRNAs with potentially harmful nonsense mutations.<sup>(26)</sup> They also show that an internal ribosome entry site (IRES) sequence inserted downstream of the authentic termination codon (TC) of the selectable-marker mRNA prevents the molecule from undergoing NMD, and makes it possible to trap transcriptionally silent genes without a bias in the vector-integration site. Thus, this novel anti-NMD technology, termed UPATrap, could be used as one of the powerful and straightforward strategies for the unbiased inactivation of all mouse genes in the genome of ES cells.

On the other hand, there was a growing demand for production of a multipurpose allele.<sup>(27,28)</sup> As a gene has many functions, it is not enough to make one strain of null mutant mouse to examine gene function or to produce a mouse model for human disease. Actually, the gene trap vectors that have been used to generate the currently available resources induce only one type of mutation, such as the null mutation: mouse mutants generated from these libraries can show only the earliest and non-redundant developmental function of the trapped gene. Therefore, for most of the mutant strains, the significance of the trapped gene for human disease remains uncertain, because most human disorders result from late-onset gene dysfunction. In addition, between 20% and 30% of the genes targeted in ES cells are required for development and cause embryonic lethal phenotypes when transferred to the germ line, precluding functional analysis in adults.<sup>(29)</sup>

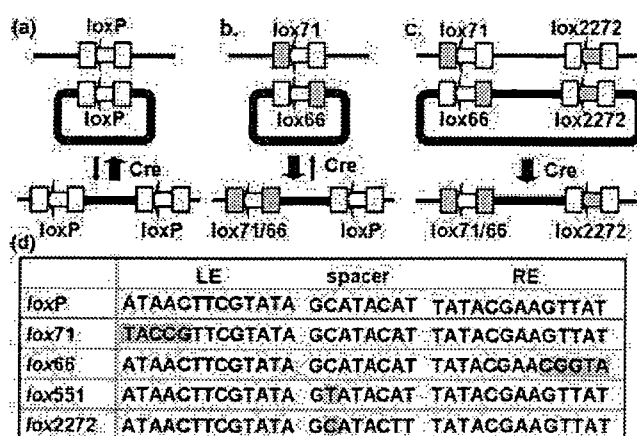


Fig. 1. Cre-loxP recombination system. (a) The integration reaction is inefficient with wild-type loxP sites due to the re-excision of the recombined product. (b) Integration reaction through left element/right element (LE/RE) mutant lox. (c) Integration reaction through double mutant lox. (d) Nucleotide sequences of various lox.

To solve these problems, we have developed an exchangeable gene trap vector based on a strategy for directional site-specific recombination by the Cre-loxP system. The Cre-loxP recombination system of bacteriophage P1 is currently the most powerful tool for genetic manipulation both *in vitro*<sup>(30,31)</sup> and *in vivo*.<sup>(32-36)</sup> Cre recombinase catalyzes reciprocal site-specific recombination between two loxP sites (Fig. 1). Consequently, Cre mediates both excisive and integrative recombination (Fig. 1a). In integrative recombination, a circular DNA carrying a loxP site is inserted into a loxP site on a chromosome. However, this integration reaction is quite inefficient, because the integrated DNA, which has loxP sites at both ends, is easily removed again through excisive recombination if the Cre recombinase is still present (Fig. 1a). Therefore, a special selection system in which only targeted integrants can survive is indispensable for targeted integration into loxP sites. Albert *et al.*<sup>(36)</sup> devised a new strategy. They identified three sets of mutant lox sites that favor integrative recombination over the excisive reaction. The loxP site is composed of an asymmetric 8 bp spacer flanked by 13 bp inverted repeats (Fig. 1d). They introduced nucleotide changes into the 13 bp left element (LE mutant lox site, *lox71*) or the 13 bp right element (RE mutant lox site, *lox66*) (Fig. 1d). Recombination between the LE mutant lox site and the RE mutant lox site produces the wild-type loxP site on the right and an LE + RE mutant site on the left that is poorly recognized by Cre, resulting in stable integration (Fig. 1b). Using a pair of mutant lox sites, *lox71* and a *lox66*, we achieved site-directed DNA integration in mouse ES cells.<sup>(27)</sup> We showed that the frequency of site-specific integration via the mutant lox sites reached a maximum of 16%. In contrast, the wild-type loxP sites yielded very low frequencies (<0.5%) of site-specific integration events.

By applying a pair of mutant lox sites to gene trapping, we have developed the new gene trap vector, termed pU-Hachi.<sup>(37)</sup> The pU-Hachi consists of the SA-*lox71*-IRES- $\beta$ geo-polyadenylation signal (pA)-loxP-pA-pUC. We used an IRES- $\beta$ geo unit as a selection-reporter marker, because it can trap genes whose expression levels in ES cells are very low.<sup>(13)</sup> Since the long IRES- $\beta$ geo unit interposed between the *lox71* site and the loxP site can be easily removed by Cre recombinase<sup>(27)</sup>, we can carry out plasmid rescue to recover the 5'-flanking genomic region as well as the 3'-flanking region. Thus, we can isolate and identify the flanking DNA sequences easily. As the *lox71* site serves as a target for Cre-mediated insertion, we can insert a cDNA sequence joined to IRES to express it under the control of a