

「ベーチェット病動物モデルを用いた免疫制御療法の標的分子探索」

①オステオポンチンを標的としたベーチェット病動物モデルの実験治療

分担研究者 小野江和則（北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野）
研究協力者 岩淵 和也（北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野）
柳川 芳毅（北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野）
北村 瑞（同上・北大大学院医学研究科視覚器病学分野）
岩田 大樹（同上・北大大学院医学研究科視覚器病学分野）
北市 伸義（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）
南場 研一（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）
今 重之（北大遺制研マトリックスメディスン研究部門）
上出 利光（北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野）
大野 重昭（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）

研究要旨

オステオポンチン（osteopontin; OPN）は、免疫応答を Th1 方向に免疫偏倚させる機能を有する。OPN 遺伝子破壊マウス（OPN KO）では、実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎（EAU）が軽症化する。そこで、野生型（C57BL/6; B6）マウスに EAU を誘導する際、特異抗体投与による OPN の機能阻止・RNA 干渉法を用いた OPN 発現阻止を行った場合、ぶどう膜炎の発症・進展過程がどのように修飾されるか、治療効果があるか否かについて解析した。その結果、抗体投与・RNA 干渉いずれの方法によっても、発症日が有意に遅延し、臨床・病理組織スコアともに有意な低下を認めた。また、EAU 誘導抗原特異的 T 細胞増殖反応の培養上清中サイトカイン産生について解析した結果、抗体・RNA 干渉いずれの方法によっても IFN- γ 、TNF- α 産生は有意に低下していた。以上より、OPN を標的としてその機能阻止を行なうことは、Th1 免疫偏倚の是正を介した、新しいぶどう膜炎治療法として有効であることが示唆された。

A. 研究目的

OPN は、分子内に Arg-Gly-Asp 配列、カルシウム結合ドメイン、アスパラギン酸リピートなどの機能ドメインを有し、細胞外マトリックス蛋白等として機能するのみならず、サイトカイン様活性も有する多面的な生理活性物質である。また OPN は、様々な経路で T helper type 1 (Th1) タイプの免疫応答に重要な機能を担っていることが明らかにされている。一方、ベーチェット病のマウスモデルである EAU は、Th1 タイプの免疫応答によって発症すると考えられて来た。本研究は、OPN を標的分子とした EAU の治療可能性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

1. EAU の誘導と抗体・siRNA 投与

6 週齢 C57BL/6 (B6), OPN KO ♀マウスに、ヒト視細胞間レチノイド結合蛋白質ペプチド (hIRBP₁₋₂₀: GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD) 200 μ g をフロインドの完全アジュバントとともに側腹部皮下に免疫し、同日に百日咳毒素 0.1 μ g を腹腔内投与することによって誘導した。翌日より、マウスを散瞳後、眼底を Bonnoscope と Super Field NC Lens (Volk Optical) にて観察し、Thurau らの基準に従って、臨床経過をスコア化 (0~4) した。また、眼球についてはグルタルアルデヒド前固定/フォルマリン後固定後、パラフィン切片を HE 染色し、病理組織学的評価 (0~4) を行っ

た。ウサギ抗 OPN 中和抗体 M5 は感作前に 400 μ g/マウスで、1 回投与した。対照群には同量のウサギ IgG を投与した。RNA 干渉は、実験群にマウス OPN 特異的 siRNA(OPN-siRNA)、対照群にコントロール配列の siRNA(control-siRNA) 50 μ g/マウス (1 ml リン酸緩衝生理食塩水) を、感作 1 日前と感作時に hydrodynamic 法で投与した。

2. T細胞増殖反応と上清中のサイトカイン測定

hIRBP¹⁻²⁰ペプチド感作10日後、所属リンパ節を採取した。T細胞エンリッチメントカラム (R & D システム) にかけて得たリンパ節由来 T 細胞分画を、30Gy X線照射した同系脾細胞 (抗原提示細胞)、抗原ペプチドと48時間培養した。T細胞増殖は³H-thymidine (Perkin-Elmer ジャパン) 取り込みで、上清中に産生されたサイトカインは ELISA/CBA (BD バイオサイエンス) にて、それぞれ測定した。

3. 血漿 OPN の測定

EAU マウスより感作前も含め、経時的に EDTA 採血して得た血漿をサンプルとして、サンドイッチ ELISA を用いて OPN 血中濃度を測定した。

4. 倫理面への配慮

動物実験は、北海道大学動物実験委員会で審議を経た後、許可を得てから実施した。

C. 研究成果

1. OPN KO におけるぶどう膜炎の発症と進展

OPN KO および対照の B6 マウスに EAU を誘導したところ、OPN KO では発症遅延と、ピーク臨床スコアの低下を認めた。平均発症日は B6 で 14.4 \pm 2.72 日であったのに対し、OPN KO では 18.2 \pm 1.93 日で、有意に遅延していた ($p < 0.01$)。また、病理組織学スコアも、B6 に比較して OPN KO では有意に低下していた。これらの結果より、OPN の機能阻害による眼炎症の改善が期待され、以下の実験を行なった。

2. 抗 OPN 抗体投与マウスにおけるぶどう膜炎の発症と進展

抗 OPN 抗体 (M5) 投与を行った EAU 誘導 B6 マウスでは、コントロール Ig 投与群と比べ、ぶどう膜炎の発症が遅延し、ピーク時の臨床スコアも有意に低下した (図 1 ; 平均最高スコア : 対照

群 1.67 \pm 0.90 vs 実験群 0.75 \pm 1.12 ; $p < 0.01$)。

抗体投与群より得た脾臓 T 細胞を用いて、抗原特異的増殖反応を行った結果、M5 投与群で増殖反応の低下を認め、また培養上清中の IFN- γ 、TNF- α 産生量の有意な低下を認めた。

3. siRNA 投与マウスにおけるぶどう膜炎の発症と進展

OPN-siRNA 投与を行った EAU 誘導 B6 マウスでは、control-siRNA 投与群と比較して、ぶどう膜炎の発症が遅延し、ピーク時の臨床スコア・組織病理スコアとも有意に低下した (臨床スコア : 図 2)。

OPN-siRNA 投与群より得た脾臓 T 細胞を用いて抗原特異的増殖反応を行ったところ、control-siRNA 群と較べて低下傾向はあったものの、有意な変化は認められなかった。一方、培養上清中の IFN- γ 、TNF- α 産生量は、control-siRNA 投与群の産生量と比較して、OPN-siRNA 群で有意な低下が認められた。

D. 考 察

抗 OPN 抗体による中和・機能阻害、RNA 干渉による OPN の発現阻害の有効性が、本研究により示された。トロンビンにより限定分解されて生じる、NH₂側の末端 (OPN-N) の cryptic な配列 SLAYGLR は、 $\alpha_9\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンと結合し、これらを発現する好中球の病変部への遊走および活性化を惹起する。また、OPN-N で活性化された NKT 細胞からの MIP-2 によっても、好中球の遊走・活性化はさらに進行する。このことが EAU 炎症の増悪を招いていると考えられる。抗 OPN 抗体により、この炎症増悪が阻止されることが 1 つの奏功メカニズムと考えられた。また OPN は、IL-12 発現促進・IL-10 産生抑制、形質細胞様樹状細胞からの IFN- α 産生など、Th1 免疫偏倚に促進的に機能する他、活性化 T 細胞の生存にプラスに働くことが示されている。OPN の機能・発現低下により、EAU のエフェクター細胞の活性化阻止、また活性化 T 細胞のアポトーシスを促進し、治療効果を発揮するものと考えられた。今後、OPN と Th17 細胞との関係等について、検討する予定である。

E. 結 論

OPNの機能・発現制御は、マウスぶどう膜炎モデルの有効な治療法である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitamura M, Kitaichi N, Takeuchi M, Kitamei H, Namba K, Yamagishi S, Iwabuchi K, Onoé K, Ohno S: Decrease in the glyceraldehyde-derived advanced glycation end products(AGEs)in the sera of patients with Vogt-Koyanagi-Harada's disease. *Brit J Ophthalmol.* 89(11), 1407-9, 2005.
- 2) Jin XH, Ohgami K, Shiratori K, Suzuki Y, Koyama Y, Yoshida K, Ilieva I, Tanaka T, Onoé K, Ohno S: Effects of blue honeysuckle(Lonicera caerulea L.)extract on lipopoly-saccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Exp Eye Res.* 82(5), 860-867, 2006.
- 3) Kitamei H, Iwabuchi K, Yanagawa Y, Yoshida K, Namba K, Kitaichi N, Kitamura M, Ohno S, Onoé K: Amelioration of experimental auto-immune uveoretinitis(EAU)with an inhibitor of nuclear factor κ B(NF- κ B), pyrrolidine dithiocarbamate. *J Leukoc Biol.* 79(6), 1193-1201, 2006.
- 4) Namba K, Sonoda KH, Kitamei H, Shiratori K, Ariyama A, Iwabuchi K, Onoé K, Saniabadi AR, Inaba S, Ishibashi T, Ohno S: Granulo-cytopheresis in patients with refractory ocular Behçet's disease. *J Clin Apher.* 21(2), 121-128, 2006.
- 5) Kitamei H, Kitaichi N, Yoshida K, Nakai A, Fujimoto M, Kitamura M, Iwabuchi K, Miyazaki A, Namba K, Ohno S, Onoé K: Association of heat shock protein 70 induction and the amelioration of experimental auto-immune uveoretinitis in mice. *Immunobiol.* 212(1), 11-18, 2007.
- 6) Kitamura M, Iwabuchi K, Kitaichi N, Kon S, Kitamei H, Namba K, Yoshida K, Denhardt D, Rittling S, Ohno S, Uede T, Onoé K: Osteopontin aggravates experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *J Immunol.* 178(10), 6567-72, 2007.
- 7) Onoé K, Yanagawa Y, Minami K, Iijima N, Iwabuchi K: Th1 or Th2 balance regulated by interaction between dendritic cells and NKT cells. *Immunol Res.* 38(1-3), 319-32, 2007.
- 8) Takeda M, Yamada H, Iwabuchi K, Shimada S, Naito M, Sakuragi N, Minakami H, Onoé K: Administration of high-dose intact immunoglobulin has an anti-resorption effect in a mouse model of reproductive failure. *Mol Hum Reprod.* 13(11), 807-14, 2007.
- 9) Mishima T, Iwabuchi K, Fujii S, Tanaka S, Ogura H, Watano-Miyata K, Ishimori N, Andoh Y, Nakai Y, Iwabuchi C, Ato M, Kitabatake A, Tsutsui H, Onoé K: Allograft inflammatory factor-1 augments macrophage phagocytic activity and accelerates the progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Int J Mol Med.*(in press)
- 10) Miyazaki A, Kitaichi N, Ohgami K, Iwata D, Jin X-H, Iwabuchi K, Morohashi T, Ohno S, Onoé K: Anti-inflammatory effect of angiotensin type1 receptor antagonist on endotoxin-induced uveitis in rats. *Graef Arch Clin Exp Ophthalmol.* (in press)
- 11) 北村 瑞, 小野江和則, 上出利光, 大野重昭: オステオポンチンの自己免疫疾患発症への関与. *臨床免疫・アレルギー科*, 47(3), 285-289, 2007.
- 12) Kitamura M, Iwabuchi K, Iwata D, Kitaichi N, Kon S, Miyazaki A, Kitamei H, Namba K, Yoshida K, Ohno S, Uede T, Onoé K. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by blockade of osteopontin with small interfering RNA. (submitted)

2. 学会発表

- 1) 岩渕和也, 上出利光, 小野江和則: マウス実験的網膜ぶどう膜炎 (EAU) におけるオステオポンチン (OPN) の役割. 第94回日本病理学会. 2005, 4 (於 横浜).
- 2) 北村 瑞, 岩渕和也, 北明大洲, 北市伸義, 南場研一, 今 重之, 大野重昭, 上出利光, 小野江和則: マウス実験的自己免疫網膜ブドウ膜炎 (EAU) におけるオステオポンチン (OPN)

の役割. 第38回北海道病理談話会. 2005, 9 (於札幌).

3) Kitamura M, Iwabuchi K, Kitaichi N, Kon S, Kitamei H, Namba K, Ohno S, Uede T, Onoé K: Investigation of the role of Osteopontin(OPN)in experimental autoimmune uveo-retinitis(EAU)in mice. 第35回日本免疫学会総会・学術集会. 2005, 12 (於横浜).

4) Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Van Kaer L, Onoé K, Uede T: Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. 第35回日本免疫学会総会・学術集会. 2005, 12 (於横浜).

5) 岩渕和也, 上出利光, 小野江和則: マウス実験的ブドウ膜炎 (EAU) におけるオステオポン

チン (OPN) の役割. 抗 OPN 抗体による治療効果. 第96回日本病理学会総会, 2007, 3 (於大阪).

6) Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Onoé K, Uede T: The role of Osteopontin in the activation and function of natural killer T cells. 第37回日本免疫学会学術集会, 2007, 11 (於東京).

7) Kitaichi N, Kitamura M, Iwabuchi K, Kon S, Namba K, Ueda T, Onoé K, Ohno S: Role of osteopontin in endogenous uveitis and intraocular inflammation. The 1st International Symposium on Uveitis in China, Nov^{30th}, 2007. (Guangzhou)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

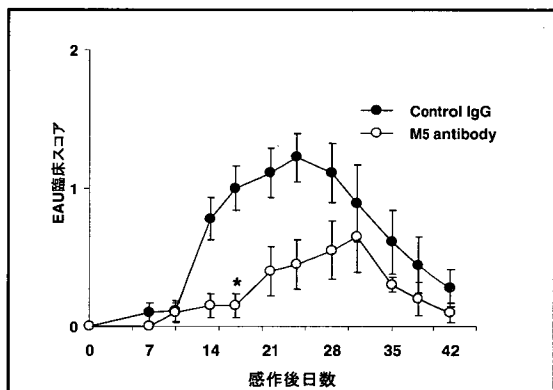


図1 EAU 臨床スコア経時変化 (抗 OPN 抗体)
B6マウスにEAUを誘導し, control Ig (●), 抗 OPN 抗体 M5 (○) を投与したものの臨床スコア (縦軸) を経時的に観察した (横軸: 日). (*: p < 0.05)

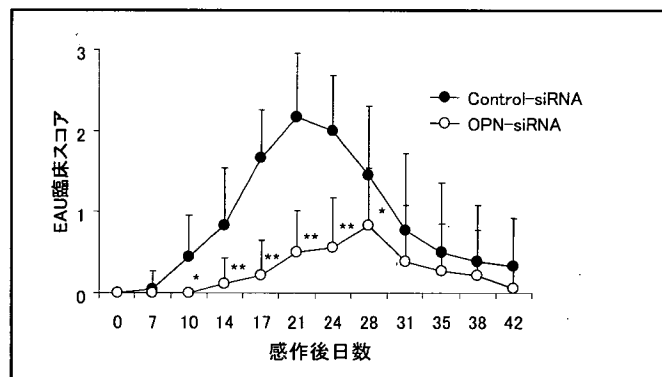


図2 EAU 臨床スコア経時変化 (OPN-siRNA)
B6マウスにEAUを誘導し, control-siRNA (●), OPN-siRNA (○) を投与したものの臨床スコア (縦軸) を経時的に観察した (横軸: 日). (*: p < 0.05; **: p < 0.01)

「ベーチェット病動物モデルを用いた免疫制御療法の標的分子探索」

② NKT 細胞を介入標的とした新しいぶどう膜炎治療法の開発

分担研究者 小野江和則（北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野）
研究協力者 岩淵 和也（北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野）
柳川 芳毅（北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野）
北村 瑞（同上・北大大学院医学研究科視覚器病学分野）
宮崎 晶子（同上・北大大学院医学研究科視覚器病学分野）
北市 伸義（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）
南場 研一（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）
今 重之（北大遺制研マトリックスメディスン研究部門）
上出 利光（北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野）
大野 重昭（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）

研究要旨

実験的自己免疫性ぶどう膜炎（EAU）における NKT 細胞の役割を明らかにする目的で、NKT 欠損マウス（CD1d KO・J α 18 KO）と C57BL/6（B6）に EAU を誘導し、発症・進展過程を比較した。また、B6マウスに EAU を誘導し、 α -galactosylceramide（ α -GalCer）あるいは OCH（type I NKT 細胞リガンド）で NKT 細胞を活性化した場合の発症・進展過程を比較した。その結果、NKT 細胞欠損マウスでは、EAU は重症化した。B6マウスで NKT 細胞をいずれのリガンドで活性化しても、EAU は軽症化しなかった。そこで type II NKT 細胞リガンドであるスルファチドを、EAU 誘導時 B6 に投与し、発症・進展過程を観察した。その結果、臨床スコアは逆に悪化した。この悪化には T 細胞応答時の IFN- γ 産生の増加を伴っていた。スルファチドを EAU 誘導前投与した場合も EAU の改善は認められなかった。NKT 細胞欠損時の EAU 臨床症状の悪化メカニズムの解明とともに、治療に使用可能なリガンドの探索が必要と考えられた。

A. 研究目的

NKT 細胞は CD1d 拘束性に糖脂質抗原を認識する自然 T 細胞の 1 亜群であり、さらには T 細胞受容体とその認識抗原によって Type I（V α 14J α 18⁺, α -GalCer）・Type II（diverse TCR⁺, 多様な糖脂質・リン脂質）のサブセットに分けられる。NKT 細胞は自身がエフェクターとなるほか、免疫制御能を発現する。したがって、眼炎症に対して何らかの抑制的機能を有している可能性が期待される。実際、NKT 細胞は前房関連免疫偏倚（ACAID）成立に重要な役割を果たしていることを、園田らが報告している（J Exp Med. 190, 1215-26, 1999）。

本研究では、まず NKT 細胞が眼炎症に対してどのような役割を果たしているかを明らかにする

目的で、type I NKT が欠損する J α 18 KO マウス、type I + II NKT 細胞が欠損する CD1d KO マウスで EAU を誘導し、その発症・進展過程を比較検討した。次いで、野生型（B6）マウス EAU 誘導時に、 α -GalCer あるいは OCH にて type I NKT 細胞を活性化した場合、臨床経過にどのような変化が生じるかを解析した。

多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）マウスでは、type II NKT 細胞のリガンドの一つであるスルファチドを誘導時に投与することで、EAE が軽症化することが示されている（Jahng AW. *et al.* J Exp Med. 194, 1789-99, 2001）。スルファチドが EAU 治療に応用可能かについても、本研究にて検討した。投与スルファチドについては、複数の脂肪酸を含む標品・単一化学種の脂肪

酸から構成される標品を用い、構成脂肪酸化学種の違いが進展過程に影響を与えるか否かについても検討を加えた。また、EAUにおいて、NKT細胞が介入標的となり得るか否かについて考察した。

B. 研究方法

1. EAUの誘導法およびNKT細胞リガンドの投与

EAUは報告①に示した方法で、C57BL/6 (B6), *Jal8 KO*, *CD1d KO*に誘導した。*α*-GalCer (キリンビールより供与)、OCH (国立精神神経センター山村博士より供与)は、0.3 μg/g体重で1回/日×7日で投与した (コントロールはPBS)。ウシ脳から精製され、構成脂肪酸については混合物であるスルファチド (Sigma) を、20 μgあるいは200 μg量で、感作7日前と感作時、感作7日後に腹腔 (i. p.) 投与した。コントロールとしてスルファチドを溶解した0.5%ポリソルベート水溶液のみを腹腔内 (i. p.) 投与した。単一脂肪酸からなるスルファチド (Matreya; C24 [炭素数]: 0 [不飽和結合数] または C16: 0) は、20 μgを上記の通り投与した。

2. T細胞増殖反応と上清のサイトカイン測定

hIRBP₁₋₂₀ペプチド感作10日後、所属リンパ節を採取した。T細胞エンリッチメントカラム (R&Dシステム) にかけて得たリンパ節由来T細胞分画を、30Gy X線照射した同系脾細胞 (抗原提示細胞)、抗原ペプチドと48時間培養した。T細胞増殖は³H-thymidine (Perkin-Elmer ジャパン) 取り込みで、上清中に産生されたサイトカインはELISA (BD バイオサイエンス) にて、それぞれ測定した。

3. 血清抗IRBP抗体サブクラスの測定

hIRBP₁₋₂₀をプレートにコートし、各群のマウスより採取した血清を階段希釈した後、インキュベートし、horse raddish peroxidase 標識抗マウスIgG₁、あるいは抗マウスIgG_{2a}抗体を反応させた。洗浄後発色基質を添加し、硫酸で反応停止後OD₄₅₀を測定・比較した。

4. 倫理面への配慮

動物実験は、北海道大学動物実験委員会で審議を経た後、許可を得てから実施した。

C. 研究成果

1. NKT細胞欠損マウスにおけるEAUの臨床経過とtype I NKT細胞リガンドの治療効果

B6に比較して、2種のNKT細胞欠損マウスはいずれも臨床スコアが高く経過した (図1)。したがってNKT細胞はEAUの進展に対して抑制的に機能するものと考えられた。次いで、NKT細胞を活性化することでEAUの軽症化が誘導されるか否かを、*α*-GalCerあるいはOCH投与B6マウスで解析した。いずれのリガンドを投与した群においても、対照群との臨床スコアの差を認めず、軽症化は誘導されなかった。

2. type II NKT細胞リガンド、スルファチド (Sigma社) の治療効果

溶剤コントロールと比較し、スルファチド投与群でEAUの臨床スコアは悪化した。20 μgと200 μgの2種の投与量で行なったが、投与量と臨床スコア間に相関は認められなかった (図2)。病理組織学的スコアでは、両群間 (20 μgと溶剤のみ) で有意差は認められなかった。また、*in vitro* のリンパ球反応でも、³H-TdR取込みについてみると両群間で有意差を認めなかったが、スルファチド投与群で培養上清中のIFN-γ産生が有意に増強されていた。TNF-α産生については、両群とも同程度の産生が認められた。抗IRBP特異的IgG₁、IgG_{2a}抗体産生についてもELISAで解析したが、有意な偏倚は認められなかった。

3. 単一脂肪酸で構成されるスルファチド (Matreya社) の治療効果

Sigma社のスルファチドをガスクロマトグラフィーマススペクトロスコーピー分析にて脂肪酸を分析したところ、C24:1、C24:0などを主成分とする混合物であることが判明した。そこで、C24:0あるいはC16:0と、構成脂肪酸が単一であるスルファチドを投与して、EAUに対する治療効果を解析した。その結果は、Sigma社のスルファチドとは異なり、C24:0・C16:0のいずれも、臨床スコアで溶剤コントロールと有意差のない経過を取った (データ示さず)。

D. 考察

NKT細胞欠損マウスでEAUの臨床スコアが高

く、重症化するという結果は、ぶどう膜炎においてNKT細胞が何らかの抑制的役割を果たしていることを示唆する。しかしながら、既存のtype I NKT細胞リガンドである α -GalCer, OCHなどでNKT細胞を活性化しても、EAUは軽症化しなかった。このことは、ACAIDが既に機能している状態で、更なるNKT細胞の活性化は抗原特異的寛容を誘導しないためか、type II NKT細胞リガンド（スルファチドなど）などで活性化される亜群が重要であるなど、の可能性が考えられた。

そこで実際、スルファチドの投与による影響を検索した。抗IRBP抗体応答においてはIgG_{2a}/IgG₁比は増加しなかったものの、IRBPに対するT細胞応答においてIFN- γ 産生が有意に増加した。後者の結果は、臨床スコアの悪化とは矛盾しない結果であった。これまでスルファチド投与は、野生型マウスにおいてEAEを抑制した(Jahng AW, *ibid*)という報告とEAEを悪化させた(Kanter JL et al *Nat Med* 12: 138-143, 2005)という報告がある。今回の結果は、後者の結果に合致したものであった。今回マウスに投与したスルファチドはウシ脳より精製されたものであり、構成脂肪酸は、C24:1, C24:0を主成分としてその他、C24h(水酸基あり):0など5~数%の微量成分の混合物であった。一方、NODマウスにおいて糖尿病の発症率を減少させたという報告で用いられたものは、C16:0 (Buschard K et al *Autoimmunity* 34: 9-17, 2001)であり、構成脂肪酸の化学種による相違が重要とも考えられる。しかし、C16:0、またはC24:0単独のスルファチドを投与した場合には、治療効果も病状悪化も認められなかった。したがって、C24:1が悪化の原因物質の可能性があるが、C24:1スルファチドが調整出来次第、検討予定である。

スルファチドによる眼炎症の修飾については、もともと網膜や神経鞘に内在するスルファチドが、ぶどう膜炎の発症・進展・再発にどのように関与するかを考える上で重要と考えられる。今回の結果とこれまでの報告との齟齬については、含有脂肪酸の分子種の違い、EAEとEAUのモデルの違い等も考えられたが、今後更なる検討を必要とすると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimada S, Nishida R, Takeda M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoé K, Minakami H, Yamada H. Natural killer, natural killer T, helper and cytotoxic T cells in the decidua from sporadic miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 56, 193-200, 2006.
- 2) Andoh Y, Fujii S, Iwabuchi K, Yokota T, Inoue N, Nakai Y, Mishima T, Yamashita T, Nakagawa T, Kitabatake A, Onoé K, Tsutsui H. Lower prevalence of circulating natural killer T cells in patients with angina: a potential novel marker for coronary artery disease. *Coronary Art Dis.* 17, 523-528, 2006.
- 3) Takagi D, Iwabuchi K, Maeda M, Nakamaru Y, Furuta Y, Fukuda S, Van Kaer L, Nishihira J, Onoé K. Natural killer T cells ameliorate antibody-induced arthritis in macro-phage migration inhibitory factor transgenic mice. *Int. J. Mol. Med.* 18, 829-836, 2006.
- 4) Nyambayar D, Iwabuchi K, Hedlund E, Murakawa S, Shirai K, Iwabuchi C, Yanagawa Y, Onoé K. Characterization of NKT-cell hybridomas expressing invariant T-cell antigen receptors. *J Clin Exp Hematop.* 47(1), 1-8, 2007.
- 5) Maeda M, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Minami K, Nakamaru Y, Takagi D, Fukuda S, Onoé K. IL-21 enhances dendritic cell ability to induce interferon- γ production by natural killer T cells. *Immunobiol.* 212(7), 537-547, 2007.
- 6) Miyazaki Y, Iwabuchi K, Iwata D, Miyazaki A, Kon Y, Niino M, Kikuchi S, Yanagawa Y, van Kaer L, Sasaki H, Onoé K. Effect of western diet on NKT cell function and NKT cell-mediated regulation of Th1 response. *Scand J Immunol.* (in press)

2. 学会報告

- 1) 小野江和則. 講演 T細胞免疫系の成立、生体内機能と疾患との関わり. 九州大学生医研セミナー, 2006, 2月. (於 福岡)
- 2) 岩渕和也, 小野江和則. リポ多糖による動脈硬化病変の進展には natural killer T細胞の役割が重要である. 第95回日本病理学会総会,

2006, 4月30日～5月2日. (於 東京)

- 3) Onoé K. Symposium "Th1 and Th2 balance regulated by interaction between dendritic cells and NKT cells." "The 1st Symposium of the Robert A. Good Immunology Society, June 9 - 12, 2006. (at Florida)
- 4) Iwabuchi K, Fujii S, Ishimori N, Van Kaer L, Tsutsui H, Onoé K, Yasuhiro Andoh. Natural killer T cells are responsible for enhanced development of atherosclerotic lesion by lipopolysaccharide in apolipo-protein E-deficient mice. The 4th International NKT Cell & CD1 Workshop(Tuscany, Italy Oct 4-8, 2006).
- 5) 大村 計, 石森直樹, 藤井 聡, 安藤康博, 岩渕和也, 小野江和則, 筒井裕之. ナチュラルキラーT細胞はメタボリックシンドロームの発症進展に寄与する; 高脂食投与 β_2 -microglobulin欠損マウスを用いた検討. Molecular Cardiovascular Conference, 2006.
- 6) 岩渕和也, 小野江和則. *alymphoplasia* マウスにおける胸腺内NKT細胞生成障害とその分化段階. 第46回日本リンパ網内系学会総会, 2006. (於 名古屋)
- 7) Miyazaki, Y., Iwabuchi, K., Niino, M., Miyagishi, R., Fukazawa, T., Kikuchi, S., Sasaki, H. and Onoé, K.: Functional and phenotypical analysis of CD28⁻ CD4 T cells in patients with multiple sclerosis. The 8th International Congress of Neuroimmunology, 2006. (於 名古屋)
- 8) 小野江和則: 講演 初心者のための免疫学・分子生物学. 第1回JCR北海道・東北地域教育研修会, 2006. (於 札幌)
- 9) Miyazaki, A., Kitamura, M., Ohno, S., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Effect of sulfatide, a ligand for a subset of NKT cells, in experimental autoimmune uveoretinitis(EAU)in mice. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 2006. (於 大阪)
- 10) Maeda, M., Yanagawa, Y., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: IL-21 enhances dendritic cell ability to induce interferon-g production by natural killer T cells. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 2006. (於 大阪)
- 11) Iwabuchi, K., Nyambayar, D. and Onoé, K.: Developmental arrest of V α 14 invariant NKT cells in SL/Kh thymus. 第36回日本免疫学会総会・学

術集会, 2006. (於 大阪)

- 12) Kon, Y., Iwabuchi, K., Nyambayar, D., Yanagawa, Y. and Onoé, K.: Analysis of NKT cell development in β -hexosaminidase deficient mice. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 2006. (於 大阪)
- 13) 小野江和則: 講演 免疫と動脈硬化症. 北海道大学21世紀COE市民キャンパス, 「ナノで未来につなぐバイオの世界」, 2006. (於 札幌)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

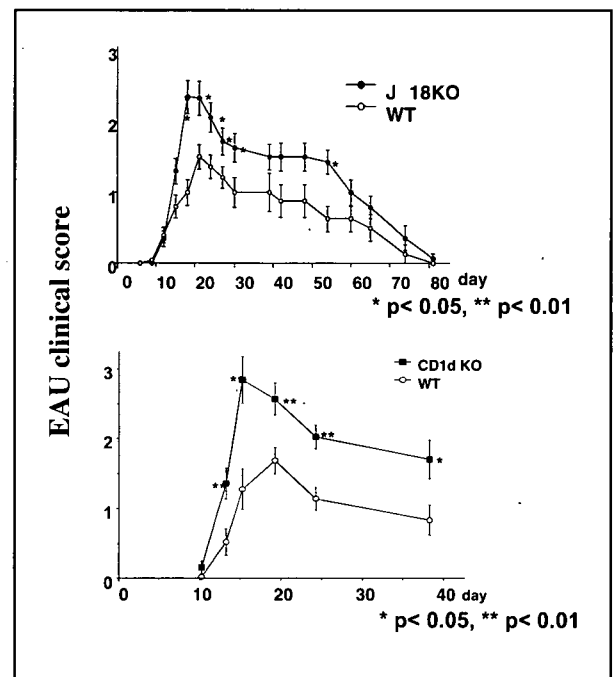


図1 NKT細胞欠損マウスにおけるEAU臨床スコアの経時変化

J a18 KO (上: ●), CD1d KO (下: ■) マウスにEAU誘導後, 臨床スコア(縦軸)を経時的に観察した(横軸:日).

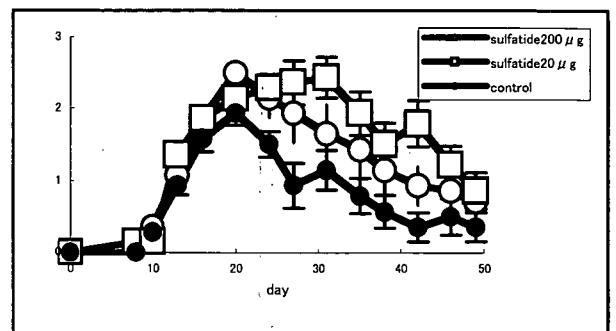


図2 sulfatide投与マウスでのEAU臨床スコア経時変化 B6マウスにEAU誘導時に溶剤のみ(●), スルファチド20 μ g(□), 200 μ g(○)同時投与したものの臨床スコア(縦軸)を経時的に観察した(横軸:日).

「ベーチェット病動物モデルを用いた免疫制御療法の標的分子探索」

③樹状細胞による新規免疫応答制御法の開発

分担研究者 小野江和則（北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野）
研究協力者 岩渕 和也（北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野）
柳川 芳毅（北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野）
水内 一臣（同上・北大大学院医学研究科視覚器病学分野）
北市 伸義（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）
南場 研一（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）
大野 重昭（北海道大学大学院医学研究科視覚器病学分野）

研究要旨

ベーチェット病をはじめとする網膜ぶどう膜炎のマウスモデルである自己免疫性ぶどう膜炎（EAU）はTh1免疫偏倚を呈すると考えられている。Th1への免疫偏倚をTh2側に偏向させることでEAUを治療し得る可能性も想定される。樹状細胞は、ナイーブT細胞が抗原感作され、免疫偏倚の方向性が決定される際に重要な役割を担っている。したがって、治療を目的とした免疫偏倚誘導のために、樹状細胞のどのような機能修飾が、特定方向への偏倚に有効かを決定することは極めて重要である。我々は、特にNKT細胞との相互作用に焦点を当て、各種のToll-like receptor (TLR) リガンド処理した樹状細胞によるNKT細胞の活性化について解析した。具体的には、 α -galactosylceramide (α -GalCer) をパルスした樹状細胞 (DC) を、2種の異なるTLRリガンド、Pam(3)Cys(Pam3; TLR1/2), CpG(TLR9), で前処置し、NKT細胞を刺激すると、それぞれIFN- γ とIL-4の産生が亢進した。これらのサイトカイン産生パターンは、両リガンドが本来有する特性とは、対称的な傾向を示し、DCのCpG前処置によりNKT細胞をTh2方向に偏倚させることが可能であることが判明した。今後、*in vivo*において、免疫応答全体のTh2方向への偏倚が誘導されるか、そしてこの結果がEAU治療に応用可能か、検討する予定である。

A. 研究目的

ぶどう膜炎の発症段階、あるいは進展過程で、Th1への免疫偏倚をTh2方向に偏向できれば、EAUの軽症化が可能となると考えられる。樹状細胞 (DC) を異なるTLRリガンドで前処置し、調節性細胞と考えられるNKT細胞のDCに対する反応性を調べた。すなわち、 α -GalCerをDCにパルスし、マイコプラズマ由来合成トリパルミトイルリポペプチド (*N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis-(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-[*R*]-Cys-[*S*]-Serl-[*S*]-Lys (4) trihydrochloride; Pam(3)Cys; TLR1/2リガンド)、あるいはCpGオリゴデオキシヌクレオチド (CpG; TLR9リガンド) で前処置をしたDCでNKT細胞を刺激した場合に、サイトカイン産生

パターンがTh1/Th2のいずれを示すかを解析することを目的とした。

B. 研究方法

TLRリガンド刺激DCによるNKT細胞反応性の修飾

BALB/c脾臓由来の未熟DC株BC1をR1メEDIUM (リコンビナントGM-CSF + NIH3T3培養上清 添加10% FCS Iscove's Modified Dulbecco's Medium) にて継代した。NKT細胞と共培養するためのDCは、 α -GalCerと37°C 24時間培養したのち、PBS (コントロール)、CpG、またはPam(3)Cysと24時間培養し、調製した。それぞれをPBS/DC、CpG/DC、またはPam(3)Cys/DCとした。これらDCと、NKT細胞ソースとして

ナイロン非付着性脾細胞を48時間共培養し、上清中のサイトカイン産生量をELISAにて測定した。

C. 研究成果

DC機能のTLRリガンドによる修飾とNKT細胞の応答性の変化

PBS/DCと比較した場合、CpG/DCで刺激したNKT細胞ではIL-4のみ、Pam(3)Cys/DC刺激NKT細胞では、主としてIFN- γ 産生が増強された(図1)。通常のT細胞培養条件では、CpGはTh1、Pam(3)CysはTh2方向に偏倚させることが知られているので、今回の研究結果は、T細胞とは逆方向の偏倚を誘導したものとなっている。また、NKT細胞のソースとして胸腺細胞を用いた場合にも、同様の結果が得られた。

D. 考 察

これまでの研究においては、CpGはDCからのIL-12産生を誘導し、Th1応答を惹起、一方、Pam(3)CysはIL-12の誘導は少なく、IL-10の誘導が強いため、Th2方向への偏倚を生じると考えられていた。しかし、本研究において、精製されたDC細胞株に α -GalCerをロードし、さらにCpGで処置後にNKT細胞を刺激すると、IL-4産生が亢進することが判明した。この結果は、CpG/DCでNKT細胞を刺激することにより、Th1/Th2バランスをTh2優位にすることが可能であることを示唆するものである。今後は、*in vivo*にCpG/DCを導入し、新規の自己免疫疾患治療法として応用可能かを検証する必要がある。これまで表面抗原の検討からは、CpGでCD1dとCD86の両者の、Pam(3)CysではCD86のみの発現増強が判明しているが、*in vitro*におけるサイトカイン産生パターン逆転のメカニズムの詳細は不明である。この点を明らかにすべく今後さらなる基礎研究を続ける必要があると考えられた。

E. 結 論

DCのTLRを介する刺激により、DCで活性化されるNKT細胞のサイトカイン産生パターンを修飾することが出来た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagawa Y, Onoé K. CCR7 ligands induce interconnected ruffles of actin filaments in mature dendritic cells that are associated with vigorous endocytosis. *J Clin Exp Hematop*. 45(1), 25-35, 2005.
- 2) Kikuchi K, Yanagawa Y, Onoé K: CCR7 Ligands-enhanced phagocytosis of various antigens in mature dendritic cells -Time course and antigen distribution different from phagocytosis in immature dendritic cells. *Microbiol Immunol*. 49(6), 535-544, 2005.
- 3) Minami K, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Shinohara N, Harabayashi T, Nonomura K, Onoé K: Negative feed back regulation of T helper type 1(Th1)/Th2 cytokine balance via dendritic cell and natural killer T cell interactions. *Blood*. 106(5), 1685-1693, 2005.
- 4) Iijima N, Yanagawa Y, Clingan JM, Onoé K: CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells. *Int Immunol*. 17(9), 1201-1212, 2005.
- 5) Saito Y, Yanagawa Y, Kikuchi K, Iijima N, Iwabuchi K, Onoé K: Low dose lipo-polysaccharide modifies reactivity of dendritic cells against various cytokines for IL-12 production. *J Clin Exp Hematop*. 46(1), 31-36, 2006.
- 6) Yanagawa Y, Onoé K: Distinct regulation of CD40-mediated interleukin(IL)-6 and IL-12 production via mitogen-activated protein kinase(MAPK)and nuclear factor κ B inducing kinase(NIK)in mature dendritic cells. *Immunology*. 117(4), 526-535, 2006.
- 7) Chan C-FR, Wang M, Li N, Yanagawa Y, Onoé K, Lee JJ, Nel AE: Pro-oxidative diesel exhaust particle chemicals inhibit LPS-induced dendritic cell responses involved in T-helper differentiation. *J Allergy Clin Immunol*. 118(2), 455-465, 2006.
- 8) Clingan JM, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K: Effect of T helper 1(Th1)/Th2 cytokine on chemokine-induced dendritic cell functions. *Cell*

Immunol. 242(2), 72-79, 2006.

- 9) Yanagawa Y, Onoé K: Enhanced IL-10 production by TLR4 and TLR2 primed dendritic cells upon TLR restimulation. J Immunol. 178(10), 6173-6180, 2007.
- 10) Ono T, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Nonomura K, Onoé K: Glycogen synthase kinase 3 activity during development of bone marrow-derived dendritic cells(DC)essential for the DC function to induce T helper 2 polarization. Immunology. 122(2), 189-198, 2007.
- 11) Mizuuchi K, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Namba K, Kitaichi N, Ohno S, Onoé K: H-2D^d-mediated upregulation of IL-4 production by natural killer T cell and dendritic cell interaction. Immunology. (in press)

2. 学会報告

- 1) 柳川芳毅, 三浪圭太, 岩渕和也, 小野江和則: Th1/Th2サイトカインバランスに対する DC/NKT細胞を介した negative feed-back 機構. 第45回日本リンパ網内系学会. 2005, 7 (於 福岡).
- 2) 三浪圭太, 篠原信雄, 原林 透, 野々村克也, 小野江和則: ワークショップ. 樹状細胞による NKT細胞のサイトカイン産生制御と腫瘍拒絶効果. 第64回日本癌学会学術総会. 2005, 9 (於 札幌).
- 3) Yanagawa Y, Onoé K: Distinct regulation of CD40-mediated IL-6 and IL-12 productions via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor κ B-inducing kinase in mature dendritic cells. 第35回日本免疫学会総会・学術集会. 2005, 12 (於 横浜).
- 4) Minami K, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K: Negative feed back regulation of T helper type 1(Th1)/Th2 cytokine balance via dendritic cell and natural killer T cell interactions - An application for anti-tumor therapy-. 第35回日本免疫学会総会・学術集会. 2005, 12 (於 横浜).
- 5) 水内一臣, 柳川芳毅, 岩渕和也, 南場研一, 大野重昭, 小野江和則: CpG で前処理した樹状細胞 (DC) による NKT細胞からの IL-4産生増強. 第39回北海道病理談話会, 2006, 9 (於 札幌).
- 6) Clingan MJ, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K: Effect of T helper 1(TH1)/Th2 cytokine on chemokine-induced dendritic cell functions. 第36回日

本免疫学会総会・学術集会, 2006, 12 (於 大阪).

- 7) Maeda M, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K: IL-21 enhances dendritic cell ability to induce interferon- γ production by natural killer T cells. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 2006, 12 (於 大阪)
- 8) Mizuuchi K, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Namba K, Ohno S, Onoé K: H2-D^d mediated upregulation of IL-4 production by natural killer T cell and dendritic cell interactions. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 2006, 12 (於 大阪)
- 9) 小野江和則: 特別講演. Th1 or Th2 balance regulated by interaction between dendritic cells and NKT cells. 第92回北海道癌談話会, 2007, 9 (於 札幌).
- 10) Ono T, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K: Glycogen synthase kinase 3 activity during development of bone marrow-derived dendritic cells(DC)essential for the DC function to induce T helper 2 polarization. 第37回日本免疫学会学術集会, 2007, 11 (於 東京).

H. 【知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)】 なし

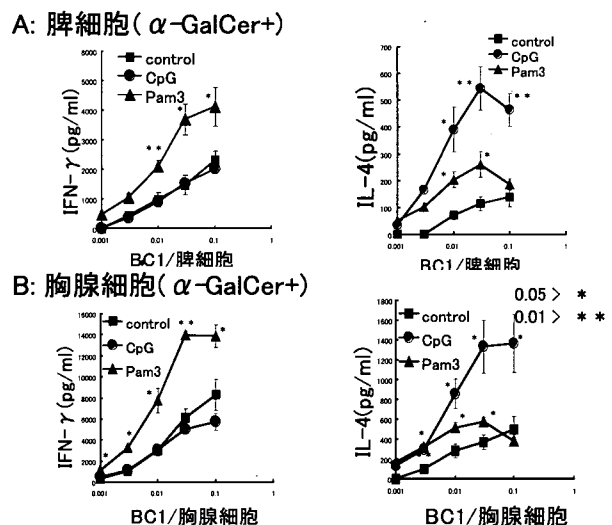


図1 TLR リガンド前処理樹状細胞による NKT細胞の活性化とサイトカイン産生プレファレンス α -GalCerラベルした樹状細胞を, コントロール PBS(control; ■)Pam(3)Cys(Pam3; ▲)あるいは CpG (●)で前処置し, NKT細胞ソースとして脾細胞 (A)あるいは胸腺細胞 (B)と共培養した. Pam3前処置では IFN- γ , CpG 前処置では IL-4産生が, それぞれ NKT細胞から優先的に産生されている.

疫学 と Q O L

パーチェット病患者の口腔関連 QOL に関する研究

分担研究者 内藤真理子 (名古屋大学大学院医学系研究科予防医学 / 医学推計・判断学)

研究協力者 畔地 美紀 (大垣女子短大学歯科衛生科)

若井 建志 (名古屋大学大学院医学系研究科予防医学 / 医学推計・判断学)

研究要旨

パーチェット病患者を対象とした口腔衛生指導介入によるパイロット・スタディを実施した。個別の口腔衛生指導を実施し、指導後1ヶ月の口腔状態との比較をおこなった。歯周組織に関連した自覚症状が軽減する傾向が認められ、口腔衛生指導がQOL向上に役立つ可能性が示された。

更に、平成16年度に実施した患者を対象とした全国調査結果との比較を目的に、一般集団を対象とした口腔保健とQOLに関する全国調査を実施した。層化多段無作為抽出によるサンプリングをおこない、抽出された15～79歳の男女2400名を対象に調査を実施した。パーチェット病患者の口腔関連QOLは一般集団と比較して有意に低く示され、とくに口腔内アフタ出現頻度の低い患者に対する口腔保健の啓発活動の必要性が示唆された。

A. 研究目的

口腔内症状を持つ全身疾患患者の口腔に関連したQOLを検討することは重要と考えられるが、この課題に関する報告は国内外共にほとんど認められていない。

そこで、筆者らは平成16年度にパーチェット病患者を対象とした全国規模の口腔関連QOL調査を実施した。この調査結果では40歳未満の患者の口腔関連QOL低下が特徴的に認められた。また、口腔診査を実施した患者集団において、若年者の口腔疾患の有所見者割合が高く認められる傾向にあった。次段階としてQOL向上を目的として、40歳未満の患者を対象とした口腔衛生指導介入によるパイロット・スタディを実施した(研究方法1)。

さらに、パーチェット病患者の全国調査結果との比較検討を目的に、一般集団を対象に全国調査をおこなった(研究方法2)

B. 研究方法

1. 口腔衛生指導介入に関するパイロット・スタディ

平成17年4月にパーチェット病友の会大阪支部で開催された「若者のつどい」の40歳未満の参加

者で、文書で研究参加の同意が得られた者を対象とした。

研究説明ならびに同意取得後、研究参加者に質問票への回答を依頼した。質問項目は現在の口腔状態や口腔内アフタ症状出現等を問うものとした。その後、各々の対象者に約20分の個別指導をおこなった。まず歯垢染色液による歯垢付着状態の把握をおこない、刷掃方法や歯間清掃器具使用について指導した。

指導1ヶ月後に郵送による質問票調査をおこない、指導前後の回答を比較した。

2. 一般を対象とした口腔関連QOLと口腔内アフタに関する全国調査

対象集団を決定するために全国200地点から層化多段無作為抽出によるサンプリングをおこなった。平成12年度国勢調査時の人口に基づき、地域、市郡規模により層化した。第1次抽出単位は各層毎に市町村を抽出し、第2次抽出単位となる調査地点は平成12年国勢調査時に設定された調査区を使用し、各層毎にランダムに抽出した。第3次の個人の抽出は、調査地点の範囲内の住民基本台帳から調査対象適格者を等間隔に系統抽出した。

抽出された15～79歳の男女2,400名を対象に、郵送による質問票調査を実施した。平成16年度調査と同様、アフタ出現を含めた口腔内状態や

QOLに関する項目内容とした。

C. 研究結果

1. 口腔衛生指導介入に関するパイロット・スタディ

パイロット・スタディに参加し、指導前後の質問票を両方とも回答した7名（うち男性5名）を対象に解析をおこなった。平均年齢は 30 ± 5 歳、Stage分類はStage I 3名、II 3名、III 1名であった。過去1年間の治療は、経過観察のみ1名、対症療法2名、薬物投与4名であった。

指導前の口腔保健行動として、2名が1日の歯磨き回数が2回未満であった。口腔清掃指導を受けた経験の有する者は5名、口腔清掃補助用具使用は4名、定期的な歯科検診受診者は6名であった。

指導前の口腔内症状として、4名が歯肉や歯の疼痛、2名が歯肉出血や腫脹を挙げた。指導後は、歯肉や歯の疼痛を有する者は1名、歯肉出血や腫脹を申告した者はいなかった。

2. 一般を対象とした口腔関連QOLと口腔内アфтаに関する全国調査（パーチェット病患者データとの比較を含めて）

調査対象の2400名中1170名（男性569名、女性601名）から回答が得られた（回収率49%）。平均年齢は 49 ± 17 歳（15-79歳）であった。

全体の20%が可撤性義歯を装着していた。現在歯科治療を受けている者は全体の12%、歯科治療を受けていないがその必要性を感じている者は41%であった。全体の1%（15名）がパーチェット病の既往ありと回答した。過去1年間に口腔内アфта出現ありと回答した割合は32%であった。

日常の口腔保健行動について、「歯磨き回数が1日1回以下」の割合はパーチェット病患者で全体の20%、一般集団で25%であった。その一方、年齢別の比較では、15-19歳、30-39歳、50-59歳において、パーチェット病患者が一般集団より高い割合を示した。さらに、両集団を過去1年間の口腔内アфта出現の有無で分けて「1日の歯磨き回数1回以下」の割合を比較したところ、いずれの年齢層においても、「アфта出現のないパーチェット病患者」群に最も高い割合が認められた。

いずれの年齢層においても、パーチェット病患者に有意に低い口腔関連QOLスコアが認められた（スコアが低いとQOLが低い）。男性では、年齢の上昇とともにパーチェット患者のスコアが増加、一般集団では減少する傾向にあったことから、高齢者では両集団の差が減少していた。女性では、パーチェット病患者は年齢にかかわらず低いスコアを維持しており、一般集団も年齢別の比較では一定の傾向を示さなかった。

D. 考 察

40歳未満の患者に対する口腔衛生指導介入の効果を検討したところ、歯周組織に関連した自覚症状が軽減する傾向が認められた。対象人数が少なく、あくまでも予備的な検討であるが、口腔保健に対する意識が高いと考えられる集団における結果であることを考慮すると、患者への口腔衛生指導による介入が短期的あるいは長期的なQOL向上につながる可能性も示唆された。

QOL向上に結びつく効果的な口腔保健介入の方法や時期等については、更なる詳細な検討が必要と考えられる。基本情報となる患者の喪失歯や齲歯等の口腔内状態に関する疫学データの蓄積も今後取り組むべき課題のひとつであり、多施設共同研究の実施が待たれるところである。

2つの全国調査結果から、パーチェット病患者は男女ともに一般集団にくらべて有意に低い口腔関連QOLを有することが示された。男性は年齢の上昇とともにパーチェット病患者のQOLが増加する傾向にあり、一般集団との差が減少していたが、女性のパーチェット病患者は年齢にかかわらず低いQOLを維持していた。口腔関連QOL項目別の検討では機能面より心理面の訴えの方がより強く示されており、QOL向上のための具体的な対策を検討する上で口腔内診査データを加えた分析が必要と思われた。

歯磨き回数や歯間清掃器具の使用などの口腔保健行動について、全般にパーチェット病患者と一般集団の大きな違いは認められなかった。その一方で、口腔内アфта出現のないパーチェット病患者に絞って見た場合、歯磨き回数や歯間清掃器具の使用頻度に一般集団と差が認められた。これより、口腔内アфта出現頻度の低いパーチェット病

患者への口腔保健の啓発活動の必要性が示唆された。

E. 結 論

ペーチェット病患者の口腔関連 QOL は一般集団より低く、口腔保健の維持・増進が QOL 向上に影響を及ぼす可能性が示唆された。口腔内アフタ出現頻度の低い患者への口腔保健行動の啓発も必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Naito M, Suzukamo Y, Nakayama T, Hamajima N, Fukuhara S: Linguistic Adaptation and Validation of the General Oral Health Assessment Index(GOHAI)in an Elderly Japanese Population. J Public Health Dent. 2006; 66: 273-275
2. Naito M, Yuasa H, Nomura Y, Nakayama T, Hamajima N, Hanada N: Oral health status and health-related quality of life: A systematic review. J Oral Sci. 2006; 48: 1-7.

2) 学会発表

1. Naito M, Suzukamo Y, Nakayama T, Fukuhara S: The impact of recurrent aphthous stomatitis on quality of life in Behçet's disease patients. The 12th Annual Meeting of the International Society for Quality of Life Research, Oct. 19-22, 2005
2. Naito M, Suzukamo Y: Oral health status and psychological distress in Behçet's disease patients. The 84th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, June 28-July 1, 2006
3. Naito M, Suzukamo Y, Fukuhara S: Norms for the oral health related quality of life questionnaire GOHAI in the Japanese general population. The 13th Annual Meeting of the International Society for Quality of Life Research, Oct. 11-14, 2006
4. 畔地美紀, 内藤真理子: ペーチェット病患者の口腔関連 QOL と保健行動に関する研究: 第

1 回日本歯科衛生学会学術大会, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ベーチェット病患者の口腔保健と QOL に関する研究

分担研究者 内藤真理子 (名古屋大学大学院医学系研究科予防医学 / 医学推計・判断学)

研究協力者 黒沢美智子 (順天堂大学医学部衛生学)

稲葉 裕 (順天堂大学医学部衛生学)

研究要旨

介入研究や長期的な観察研究において、疾患特異的な QOL 指標による評価は重要と考えられる。その一方、国内で使用可能なベーチェット病患者のための尺度は報告されていない。そこで、英国で開発されたベーチェット病の疾患特異的な QOL 尺度である BD QoL の日本語版作成を目的に、新たな研究を開始した。平成19年1月に BD QoL の原作者から日本語版作成の許可を得て開発に着手した。今年度は順翻訳、暫定版作成を経て、パイロット・スタディを実施した。今後、妥当性検証のための調査を実施する予定である。

A. 研究目的

口腔内アフタ性潰瘍はベーチェット病の主症状のひとつであり、90~100%と最も高い発生頻度を示すとともに初発症状であることも多い。他の症状は治療により発生頻度が減少し、出現しなくなる場合もあるが、口腔内症状は頻度が減っても出現が続く傾向が認められる。

再発性の口腔内症状によって引き起こされる摂食・発音等の口腔関連の機能障害が日常生活の質に与える影響は決して無視できないものと推察される。また、症状による疼痛や不快感が口腔清掃をはじめとする保健行動に影響を及ぼしている可能性も指摘されており、不十分な口腔管理がもたらす歯周病の罹患や歯の喪失が高年・老年期の QOL 低下につながることも示唆されている。

以上の背景から、筆者らは平成15年からベーチェット病患者の口腔状態や口腔保健行動と QOL の関連について調査研究を進めてきた。これらの検討において、General Health Questionnaire(GHQ) や SF-8, General Oral Health Assessment Index(GOHAI) を用いて QOL 評価をおこなってきた。

上記の指標は国際的に広く使用されている包括的な QOL 指標であり、他の疾患患者や健常集団との比較が容易という長所を持つ。その一方、QOL 研究を展開していく上で、介入研究や長期的な観察研究では疾患特異的な指標の使用も必要

と考えられる。しかしながら、これまで国内で使用可能な QOL 尺度の開発報告は認められていない。

そこで、今回、英国で開発されたベーチェット病の疾患特異的な QOL 尺度である BD QoL の日本語版作成を目的に、新たな研究を開始した。

B. 研究方法

平成19年1月、BD QoL の原作者から日本語版作成の許可を得て質問紙を入手した。Beaton ら (Spine 2000; 24: 3186-3191.) の手順に従って日本語版開発を進めることとし、開発に着手した (図 1)。

最初に、複数の翻訳者が別々に質問紙を順翻訳した。翻訳された候補を持ち寄り、訳の相違点について議論しながら訳をひとつにまとめ、暫定版尺度を作成した。さらに、暫定版尺度を用いたパイロット・スタディを実施し、内容を再検討した。

(倫理面への配慮)

パイロット・スタディの質問紙は無記名式とし、連結不可能匿名化データとして解析をおこなった。

C. 研究結果

平成19年7月、ベーチェット病患者19名を対象にパイロット・スタディを実施した。40歳代から70歳代の男女で、内訳は男性10名、女性4名、不

明5名であった。

BD QoLは2択式の30項目からなる尺度である。それぞれの項目の合計点(0-30)がBD QoLスコアとなり、スコアが高いほどQOLが低いと評価される。今回の対象者においてスコアは0から28までに広く分布した(図2)。中央値は7、平均値±標準偏差は8.2±8.3であった。

項目分析では、各項目の欠損値率は5%未満で、欠損値の認められた項目は2項目であった。信頼性分析においてクロンバックの α 係数は0.95であった。基準関連妥当性の検討では、主観的健康観とスコアの間統計学的に有意な関連が示された($P=0.01$)。

D. 考 察

BD QoLは、2002年に英国のリーズ大学リハビリテーション科で開発されたベーチェット病患者に特異的なQOL尺度である(Gilworth G et al. *J Rheumatol* 2004;31:931-7)。大学ホームページには尺度に関する情報が提供されている。(http://home2.btconnect.com/Psylab_at_Leeds/scales.htm)。

原作版は英語で作成されており、質問項目はA4版2ページの分量となっている。“True”あるいは“Not True”の2択式であり、パイロット・スタディの結果を考慮すると回答は比較的たやすく、信頼性も高いと考えられた。日本語版は自記式質問紙として開発を進めているが、視覚障害のある患者に対するインタビュー版作成も今後の検討課題となるだろう。

BD QoLの原作者らは他国語版の開発を推奨しており、韓国ではAjou UniversityのLeeらが韓国語版開発に着手している。BD QoL日本語版は、国内の研究のみでなく、将来の国際共同研究のツールとしても活用できるものと期待される。

今後は、妥当性検証のための本調査を実施し、原作者とやり取りをしながら日本語版完成に向けて更に検討を進める予定である。

E. 結 論

英国で開発されたベーチェット病の疾患特異的なQOL尺度であるBD QoLの日本語版開発に着手した。今年度は、原作者から開発の許可を得て、順翻訳、暫定版作成、パイロット・スタディを実

施した。来年度は妥当性検証のための本調査をおこなう予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

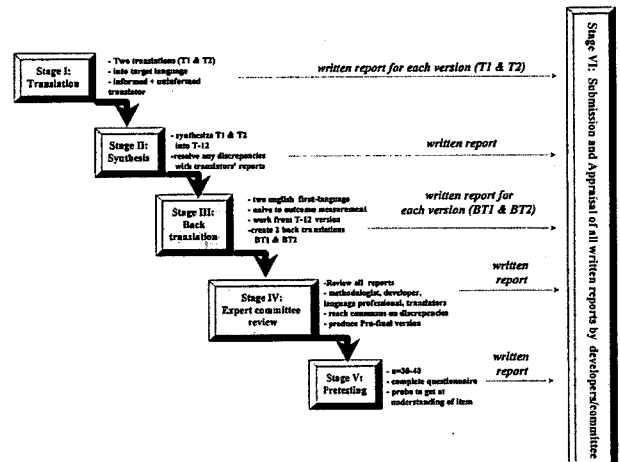


図1. BD QoL日本語版開発過程 (Spine 2000; 24: 3186-3191. Figure 1より転載)

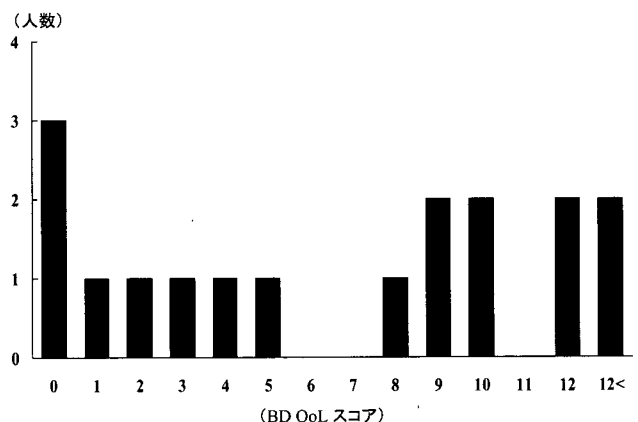


図2. パイロット・スタディにおけるBD QoL日本語版のスコア分布

ベーチェット病の臨床調査個人票電子化データの 分析－臨床疫学像と予後の検討

分担研究者 稲葉 裕（順天堂大学医学部衛生学）
研究協力者 黒沢美智子（順天堂大学医学部衛生学）
金子 史男（福島医科大学医学部皮膚科）
永井 正規（埼玉医科大学公衆衛生学）

研究要旨

ベーチェット病の臨床調査個人票データベースの利用申請を行い、受給者の疫学的特性、臨床医学的特性を分析すること、患者の予後（症状変化、治癒、軽快、悪化、死亡等）を把握するための累積データの利用について検討することを目的として、臨床調査個人票H13年度以降の全国分の利用申請を毎年行い、電子化データを入手した。H17年度に入手した臨床調査個人票データの入力率はH13年度分約3%、H15年度分約50%で、入力状況は都道府県で異なっていた。臨床疫学像について、性比は新規0.85、更新0.78であった。重症度は軽症のStage Iが最も多く48%、眼症状がみられるStage IIは19%、IIIは10%、IV22%、生命予後に危険のあるVは1%であった。病型は完全型が男女とも更新者に多く、新規（男）に特殊型ベーチェットの割合がやや多かった。特殊型ベーチェットは新規申請者、男性に多く、腸管型、神経型、血管型の順に多かった。薬剤投与後の臨床症状の変化は女性の方が軽快の割合が多く、進行・無反応・副作用出現は男性の方が多かった。HLA-B51の陽性割合（新規）は男性22.5%、女性18.6%であったが、不明が半数以上を占めていた。また、予後の分析方法を検討するために1年間の重症度の変化に着目して試行した。ベーチェット病の重症度はI（軽症）～V（重症）のStageで分類されている。まずH16年度の特定期間治療研究医療受給証所持者数（都道府県別）を参照し、ベーチェット病のH15、16年の両年が良好に輸入されていると思われる県のデータを抽出し、H15年度新規・更新データをH16年度更新データにリンケージさせた。分析対象データは計1,137例で、H15年度とH16年度でStageに「変化なし」、軽症から重症になった例を「悪化」、重症から軽症になった例を「軽快」、Stage「不明」、H16年度にデータがない人を「非継続」としてH15年度のStage（重症度）別に例数と割合を確認した。対象1,112例の内、H15年からH16年の1年間で重症度に「変化なし」は670例（60.3%）、「軽快」していたのは65例（5.8%）、「悪化」していたのは69例（6.2%）であった。非継続者（H15年度にデータあり、H16年度になし）の割合は26.9%あった。ベーチェット病の予後を検討するためには非継続者の情報を把握することが重要であることが確認された。入力率を上昇させることも全体の課題である。

A. 研究目的

ベーチェット病の臨床調査個人票データベースの利用申請を行い、受給者の疫学的特性、臨床医学的特性を分析すること、患者の予後（症状変化、治癒、軽快、悪化、死亡等）を把握するための累積データの利用について検討することを目的とする。

B. 研究方法

1. 臨床疫学像の把握

臨床調査個人票H13年度以降の全国分の利用申請を毎年行い、電子化データを入手した。そして入手したデータのうち、入力率の高い年度分について性比、Stage、病型、薬剤投与後の臨床症状の変化等について集計分析した。

2. 予後の検討

入手したデータで予後の分析方法を検討するために1年間の重症度の変化に着目し試行した。H16年度の特定期間治療研究医療受給証所持者数(都道府県別)を参照し、ベーチェット病のH15、16年の両年が良好に輸入されていると思われる県のデータを用いて予後の検討が可能かどうか試行した。まずH15年度新規・更新データをH16年度更新データにリンケージさせ、受給継続者数と非継続者数を新規・更新別に確認した。H15年度旧申請書での入力データは分析から除外した。ベーチェット病の重症度はI(軽症)～V(重症)のStageで分類されている。受給継続者の内、H15年度とH16年度でStageに「変化なし」、軽症から重症になった例を「悪化」、重症から軽症になった例を「軽快」、Stage「不明」、H16年度にデータがない人を「非継続」としてH15年度のStage(重症度)別に例数と割合を確認した。

(倫理面への配慮)

臨床調査個人票は全て匿名化されており、研究班の分担研究者が個人を特定することはできない。

C. D. 研究結果と考察

1. 臨床疫学像の把握

H17年度に入手した臨床調査個人票データの入力率はH13年度分約3%、H15年度分は約50%であった。入力状況は都道府県で異なっていた。性比は新規0.85、更新0.78であった。2003年に実施した全国調査(2002年度の患者)一次調査結果の性比は0.88で、それと比べると受給者はやや女性が多かった。StageについてはStage Iでは女性の割合が多く、眼症状がみられるStage II～Vは男性の方が多かった。病型は完全型が男女とも更新者に多く、男性の新規申請者に特殊型ベーチェットの割合がやや多かった。特殊型ベーチェットは腸管型、神経型、血管型の順に多く、いずれも女性より男性の割合が多く、更新者よりも新規申請者の方が多かった。薬剤投与後の臨床症状の変化は女性の方が軽快の割合が多く、進行・無反応・副作用出現は男性の方が多かった。HLA-B51の陽性割合(新規)は不明が半数以上

を占めていたが、陽性は男性22.5%、女性18.6%であった。今後全般的な課題としては入力率を上昇させることである。

2. 予後の検討

予後を検討するために1年間の重症度の変化に着目して各年の連結データを用いた分析を試みた。また前年の分析で臨床調査個人票データの入力状況が都道府県で異なることが分かったのでベーチェット病のH15、16年の両年が良好に輸入されていると思われる5県(山形県、福島県、茨城県、福井県、高知県)のデータを抽出した。5県のデータはH15年度新規H16年度更新連結データ(52例)、H15年度更新H16年度更新連結データ(1,085例)、計1,137例であった。対象1,112例の内、H15年からH16年の1年間で重症度に「変化なし」は670例(60.3%)、「軽快」していたのは65例(5.8%)、「悪化」していたのは69例(6.2%)であった。非継続者(H15年度にデータあり、H16年度になし)の割合は26.9%であった。ベーチェット病の予後を検討するためには、非継続者の情報を把握することが重要であることが確認された。

E. 結 論

臨床調査個人票H13年度以降の全国分の利用申請を毎年行い、電子化データを入手し、臨床疫学像(性・年齢分布、発症年齢分布、重症度分布、有症状割合等)を示した。入力率を上昇させることが重要課題であることが確認された。また1年間の重症度の変化(軽快、変化なし、悪化)に着目して累積データを用いた予後の分析を試行した。ベーチェット病の予後を検討するためには非継続者の情報を把握することが重要であることが確認された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 黒沢美智子, 稲葉裕: Behcet 病の最近の疫学像の動向. 医学のあゆみ215(1): 5-8, 2005 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

2. 学会発表

1. 黒沢美智子, 稲葉裕, 松葉剛, 西部明子, 金子史男, 川上佳男, 玉腰暁子, 川村孝. ベーチェット病ノ全国疫学調査-患者数ノ推計. 第15回日本疫学会学術総会講演集, p143, 2005
2. 稲葉裕, 黒沢美智子, 松葉剛, 西部明子, 金子史男, 川上佳男, 玉腰暁子, 川村孝. ベーチェット病の全国疫学調査-臨床疫学像. 第15回日本疫学会学術総会講演集, p144, 2005.
3. Michiko Kurosawa, Yutaka Inaba, Tsuyoshi Matsuba, Akiko Tamakoshi, Fumio Kaneko, Akiko Nishibu, Takashi Kawamura. QOL study of Behcet's disease patients in Japan. Rheumatology Supple42, S15, 2006.
4. Yutaka Inaba, Michiko Kurosawa, Fumio Kaneko, Tomohiko Makino, Masaki Nagai. Analysis of the electronic clinical database(2001-2004)of patients with Behchet disease receiving financial aid for treatment in Japan. Rheumatology Supple42, S16, 2006.
5. 黒沢美智子, 稲葉裕, 金子史男, 永井正規. ベーチェット病の臨床調査個人票データの分析. 第65回日本公衆衛生学会総会抄録集, 2006
6. 黒沢美智子, 稲葉裕, 松葉剛. ベーチェット病のQOL調査. 第71回日本民族衛生学会総会講演集, p190-191, 2006
7. 黒沢美智子, 稲葉裕, 金子史男, 永井正規. 臨床調査個人票データベースを用いたベーチェット病の予後の検討. 第77回日本衛生学会総会講演集, p699, 2007
8. 黒沢美智子, 稲葉裕, 玉腰暁子, 金子史男, 西部明子, 川上佳男, 川村孝. ベーチェット病のQOLフォローアップ調査. 第66回日本公衆衛生学会総会抄録集, p398, 2007

H. 知的財産権の出願, 登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし