

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

「クローン病手術例の妊娠、出産例の検討—多施設共同研究—(中間報告)」

分担研究者 杉田 昭 横浜市立市民病院外科 部長

研究要

クローン病は手術を必要とする症例が少なくない。若年発症のため女性患者は経過中に妊娠、出産を経験する年齢となる。本症手術症例での妊娠、出産の知見は少なく、本プロジェクトは本邦におけるクローン病手術後の妊娠、出産の現状を明らかにし、妊娠、出産に関する留意点を検討することを目的とした。本研究はアンケート調査による多施設共同研究で行うこととし(本研究班に参加している外科 16 施設、内科 2 施設)、妊娠可能と推定される 45 歳未満の女性患者数、腸管手術歴、手術術式、妊娠時の治療や活動性、妊娠および出産経過、新生児の状態などを含むアンケートを作成、集計を依頼した。2008 年 2 月までに集計されたクローン病妊娠例は 21 例でこれらを中間解析した。初回腸管手術時年齢は平均 25 歳、術後初回妊娠時年齢は 31 歳で、計 30 回の妊娠歴があり、流産が 2 例にみられたが、出産は 26 回(出生児 28 児)であった。初回妊娠までの手術回数は 1 回が最も多く、複数回手術例にも妊娠例がみられた。手術術式は回腸、結腸切除が多くを占めた。切迫流産、自然流産がそれぞれ 1 例、早期産、前期破水が 1 例づつみられ、胎児仮死、発育遅延がそれぞれ 1 例、低体重児は 6 例と高い頻度であった。分娩法は帝王切開が 57.7% (15/26 回分娩)であった。今後は更に症例を追加して本邦でのクローン病手術後患者の妊孕率を含めた経過を分析する予定である。

共同研究者

小金井一隆 横浜市立市民病院 外科
木村英明 横浜市大市民総合医療センター
佐々木巖 東北大学生態調節外科

1. 研究目的

クローン病の多くは若年で発症し、女性は経過中に妊娠、出産を経験する年齢となる。クローン病女性患者の妊娠、出産についてはいまだに不明な点が多く、特に手術症例の術後妊娠、出産に関する知見は極めて少ない。本プロジェクトは本邦におけるクローン病手術後の妊娠、出産の現状を明らかにし、妊娠、出産に関して留意する点を検討することを目的とした。

2. 対象、方法

本研究はアンケート調査による多施設共同研

究で行うこととし、検討項目(表-1)に基づいてアンケート用紙を作成し、本研究班に参加している外科 16 施設、内科 2 施設に送付して集計を依頼した。アンケートの主な内容は妊娠可能と推定される 45 歳未満の女性患者数、腸管手術歴、手術術式、妊娠時の治療や活動性、妊娠および出産経過、新生児の状態などを含むものとした(表-2)。

C. 結果(中間報告)

2008 年 2 月までに集計されたクローン病妊娠例は 21 例で、これらを中間解析した。

症例の概要は初回腸管手術時年齢が平均 25 歳、術後初回妊娠時年齢は 31 歳で、計 30 回の妊娠歴があり、術後 1 回妊娠例が 14 例と最も多かった(図-1)。

計 30 回の術後妊娠経過は流産が 2 例にみられ

たが、出産は26回（出生児28児）であった（図-2）。

初回妊娠までの手術回数は1回が16回と最も多かったが、2回10例、3回が4例と複数回手術例にも妊娠例がみられた。

手術術式は回腸、結腸切除が多く、直腸の手術例は少なかった（表-3）。

最終手術から妊娠までの期間は25ヶ月以上が21例と最も多かったが、6ヶ月未満の症例も4例みられた（図-3）。

妊娠、分娩時の異常は切迫流産、自然流産がそれぞれ1例、早期産、前期破水が1例ずつみられた（表-4）。出生児の異常は胎児仮死、発育遅延がそれぞれ1例（3.6%）、低体重児が6例（23%）と高い頻度であった（表-5）。分娩法は帝王切開が57.7%（15/26回分娩）であった。

3. 考察

クローン病症例の妊娠、出産については不明な点が多く、特に手術例での報告は少ない。現在まで本邦での手術後出産や人工肛門の造設例での出産の報告はあるが少数例であり、欧米でも妊娠

経過と手術の既往の有無とは関連ないとする報告や腸管手術は低体重児のリスクとする報告があるが、多くの報告はない(1)。

本プロジェクトは本邦でのクローン病術後の妊娠、出産の経過を多施設共同研究で明らかにし、臨床での治療に役立てることを目的としている。今回の中間報告の結果では妊娠、出産の経過は概ね良好で、複数回手術例も多くみられ、分娩方法は帝王切開が多いことが特徴であった。出生児に関しては低体重児の頻度が高いことに留意する必要があると思われた。

今後は更に症例を追加して本邦でのクローン病手術後症例の妊孕率を含めた経過を分析する予定である。

4. 文献

1) 小金井一隆、杉田昭、木村英明、ほか：クローン病女性の妊娠、出産と手術. 大腸疾患 NOW 日本メディカルセンター 2008 p177-182

表-1 検討項目

- | |
|-------------------|
| 妊娠 |
| 1. 症例数 |
| 2. 妊娠経過 |
| 3. 妊娠中の異常の有無とその程度 |
| 出産 |
| 1. 症例数 |
| 2. 出産方法(経産、帝王切開) |
| 3. 新生児の状況 |
| 4. 出産後の異常の有無とその程度 |

表-2.1 腸管手術歴

- | |
|----------------------------|
| 腸管手術回数
(複数回の場合、それぞれを記入) |
| 腸管手術 |
| 手術日 |
| 手術適応 |
| 大量出血 |
| 穿孔 |
| 中毒性巨大結腸症 |
| 腸閉塞 |
| 難治性狭窄 |
| 腫瘍 |
| 内瘻(消化管、尿路、婦人科) |
| 内科的治療無効 |
| 肛門部病変 |
| その他(内容記入) |
| 詳細不明 |

表一2.2 妊娠時の状況(1)

妊娠日(西暦 年 月 日頃)
 最も近い手術から妊娠までの期間(ヶ月)
 妊娠前使用薬剤
 5ASA製剤
 ステロイド
 免疫調節剤[妊娠前 ヶ月まで使用、判明時も使用]
 抗TNF α 抗体[妊娠前 ヶ月まで使用、判明時も使用]
 経腸栄養剤
 TPN
 妊娠時のCrohn病活動性(CDAI>150を指標として)
 活動期
 緩解期
 不明

表一2.3 妊娠中の状況(2)

妊娠中使用薬剤
 5ASA製剤
 ステロイド
 免疫調節剤
 抗TNF α 抗体
 経腸栄養剤
 TPN
 妊娠、産褥期の再燃
 妊娠判明時から活動期
 妊娠中に再燃
 再燃時期(初期、中期、後期、産褥期)
 妊娠中、産褥期に緩解を維持

表一2.4 出産

出産日
 在胎期間(週)
 分娩
 正常
 異常 (内容記入)
 出産方法
 経陰分娩
 会陰裂傷あり(裂傷の程度、 度)
 会陰切開有無
 帝王切開
 理由:(内容記入)

表一2.5 新生児

児数(1、2、3以上)
 それぞれに以下項目をチェック
 性別(男、女)
 体重(g)
 身長(cm)
 発育状況
 正常
 異常あり
 異常の内容記入()
 第何子
 第一子、第二子、第三子、第四子

表一3 初回妊娠までの術式

術式	症例数
回盲部切除	4
+回腸部分切除	3
+Stoma	2
+直腸or S状結腸切除	2
回腸~結腸全摘	4
+Stoma	4
回腸部分切除	1
回腸stoma造設	1

表一4 妊娠中、分娩時の異常(n=26)

	例数	頻度(%)
切迫流産	1	3.3
自然流産	1	3.3
(人工流産)	1)	
早期産(<37W)	1	3.8
前期破水	1	3.8

表-5 出生児の異常 (n=28)

	例数	頻度(%)
胎児仮死	1	3.6
発育遅延	1	3.6
低体重(<2500g)	6	23
	(2例体重不明のため26例中)	

図-1 クローン病術後の妊娠症例(n=21)

クローン病発症時年齢 19歳(12~26)
 初回腸管手術時年齢 25歳(16~35)
 術後初回妊娠時年齢 31歳(23~41)

術後妊娠回数

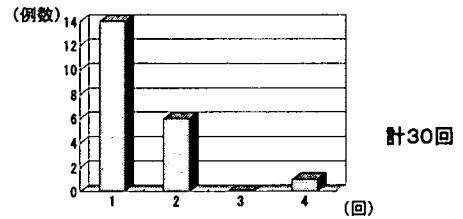


図-2 Crohn病術後妊娠

妊娠のべ30回

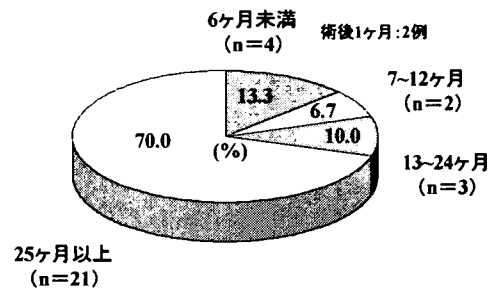
流産 2 (自然 1、人工 1)
 妊娠中 2
 双胎 2



出産 26回
 出生児 28児

図-3 直近手術から妊娠までの期間

妊娠 30回



厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

潰瘍性大腸炎術後患者における骨粗鬆症の現状調査

研究協力者 亀岡 信悟 東京女子医科大学第二外科 教授

研究要旨：手術を必要とした潰瘍性大腸炎（以下、UC）における骨密度を測定して骨粗鬆および骨障害の現状を明らかとすることを目的とした。9施設において手術を施行したUC術後症例のうち骨密度が測定された症例について、アンケート調査研究を行った。対象は潰瘍性大腸炎手術例122例で、手術適応は、骨障害7例、難治84例、癌13例、出血12例、その他6例であった。122例中、骨粗鬆症は63例（51.6%）の症例に認められた。骨障害発生は19例（15.6%）であった（脊椎圧迫骨折13例、大腿骨頭壊死6例）。手術時年齢では50歳以上の症例が有意に骨粗鬆症の頻度が高かった（ $p=0.025$ ）。年齢別の傾向は女性では有意（ $p=0.02$ ）であったが男性では有意差は認めなかった。潰瘍性大腸炎の発症年齢、手術までの期間、入院回数、ステロイド総投与量では有意差を認めなかった。骨粗鬆症発症は手術時年齢50歳以上の女性で特に高頻度であることが推測された。骨粗鬆症の合併を念頭に、予防と治療にあたる必要がある。

共同研究者

板橋道朗 1) 飯塚文瑛 2) 白鳥敬子 2)
佐々木巖 3) 杉田 昭 4) 畠山勝義 5)
楠 正人 6) 二見喜太郎 7) 渡邊聡明 8)
池内浩基 9) 国崎玲子 10)

1)東京女子医科大学第二外科 2)東京女子医科大学消化器内科 3) 東北大学大学院胃腸外科 4) 横浜市民病院外科 5) 新潟大学消化器一般外科 6)三重大学消化管小児外科 7)福岡筑紫病院外科 8)帝京大学外科 9)兵庫医科大学第二外科 10)横浜市大難病医療センター

A. 研究目的

IBDにおける骨障害の頻度はかなり高頻度であることが報告されている。しかしながら、手術を必要とした症例での頻度の報告はない。今回、手術を必要とした潰瘍性

大腸炎（以下、UC）における骨密度を測定して骨粗鬆および骨障害の現状を明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

9施設において手術を施行したUC術後症例のうち骨密度が測定された症例について、臨床データを retrospective にアンケートによる調査研究を行った。骨密度の測定は腰椎を原則として、不可能な場合には大腿骨を測定部位とした。骨密度70%未満を骨粗鬆症と定義して検討した。骨粗鬆症発症の発症の現状を調査するとともに種々の危険因子についても検討した。統計解析は χ^2 検定で p 値0.05以下を有意差ありと判断した。

なお、個人情報遵守されており、本研究においては倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

対象は潰瘍性大腸炎手術例 122 例で手術時年齢 37.4 歳 (14-78 歳)、男性 71 例女性 51 例である。潰瘍性大腸炎の発症年齢は 29.5 歳 (10-74 歳)、発症から手術までの期間は 8.3 年 (1-37 年) であった。手術適応は、骨障害 7 例、難治 84 例、癌 13 例、出血 12 例、その他 6 例であった。

1) 骨粗鬆症発症の現状

122 例中、骨粗鬆症は 63 例 (51.6%) の症例に認められた。骨障害発生は 19 例 (15.6%) であった (脊椎圧迫骨折 13 例、大腿骨頭壊死 6 例)。

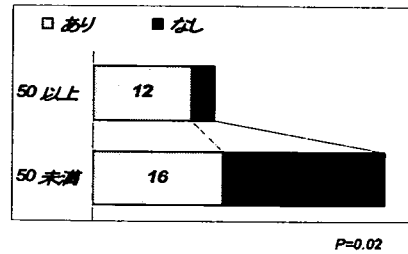
2) 骨粗鬆症のリスク因子

手術時年齢では 50 歳以上の症例が有意に骨粗鬆症の頻度が高かった ($p=0.025$)。年齢別の傾向は女性では有意 ($p=0.02$) であったが男性では有意差はみとめなかった。潰瘍性大腸炎の発症年齢、手術までの期間、入院回数、ステロイド総投与量 (10g 以上) については骨粗鬆症あり群、なし群で各々 30.2 ± 14 、 28.1 ± 10 ($p=0.21$)、 9.0 ± 7.7 、 7.2 ± 6.4 ($p=0.079$)、 3.9 ± 2.2 、 3.9 ± 1.8 ($p=0.48$)、43:17、42:15 (NS) であり有意差を認めなかった。

表 1 骨粗鬆症

	あり	なし	
・ 手術時年齢	39.2 ± 16	34.9 ± 11	$p=0.079$
・ 手術時 50 歳以上	18:46	6:52	$p=0.025$
・ 性	35:29	35:23	NS
・ 発症年齢	30.2 ± 14	28.1 ± 10	$p=0.21$
・ 手術までの期間	9.0 ± 7.7	7.2 ± 6.4	$p=0.079$
・ 入院回数	3.9 ± 2.2	3.9 ± 1.8	$p=0.48$
・ PSL 総投与量 (10g)	43:17	42:15	NS

図 1 女性 50 以上 vs 未満



D. 考察

Retrospective な調査研究であるが、潰瘍性大腸炎で手術が施行された患者の約 50% と高頻度に骨粗鬆症の合併が認められ、手術時年齢 50 歳以上の女性で特に高頻度であることが推測された。骨障害を呈した患者は 19 例であったが、他の症例では骨粗鬆症が存在するにもかかわらず無症状であった。骨粗鬆症の原因としては、潰瘍性大腸炎保存的治療の key drug である副腎皮質ステロイドの副作用が考えられる。手術要因の多くは難治であり、大量のステロイドが使用された結果とも推測される。手術を受けた大部分の症例が良好な QOL を得ており、さらにステロイド投与を中止可能な状況になっているにもかかわらず、潜在的な骨粗鬆症が存在することは大きな問題である。内科治療期間中はもとより、外科手術後には骨塩量測定を施行して骨粗鬆症の有無をチェックすることが必要であり、ステロイド使用中の患者には骨粗鬆症の予防も念頭に入れて治療にあたるべきである。

E. 結論

潰瘍性大腸炎手術例の約 50% に骨粗鬆症の合併が認められ、骨障害は 15.6% に認められた。骨粗鬆症発症は手術時年齢 50 歳以上の女性で特に高頻度であることが推測さ

れた。骨粗鬆症の合併を念頭に、予防と治療にあたる必要がある。

F. 文献

- 1) 棟方昭博、畑田康政、八尾恒良：
ステロイドホルモン副作用の定量的評価—
副作用からみたステロイド療法の限界 難
治性炎症性腸管障害調査研究班 平成7年
度研究報告 45-47, 1996

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治製炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

炎症性腸疾患における疾患感受性候補遺伝子の関連解析

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学 学長

研究要旨：数多くの疾患感受性遺伝子研究において、日本人に特有の IBD 疾患関連遺伝子研究の報告例は少ない。IBD の発症・病態修飾に関連があると推測される SP-D 遺伝子 *SFTPD* に着目し、その SNPs (一塩基多型) 解析を行うことで、日本人特有の IBD 疾患感受性遺伝子を同定することを目的とした。

共同研究者：田中道寛，有村佳昭，後藤啓，中垣 卓，田中浩紀，細川雅代，永石 欽和，山本博幸、本谷 聡、篠村恭久
所属：札幌医科大学第一内科

外の 2 つの SNP，計 7 箇所に対して Realtime PCR 法を用い typing を行った。結果は，Wellcome Trust Case Control Consortium の Dr. Durrant より供与頂いた CLADHC プログラム他，2 種の統計解析プログラムを用いて，単変量解析，回帰分析，ハプロタイプ解析を行い，多重検討を行った。

(倫理面への配慮) 検体提供にあたっては，インフォームドコンセントを得た上で，研究を施行した。

A. 研究目的

Surfactant protein D (SP-D) は，collagen domain と globular domain である C-type lectin を含む polypeptide で，pathogen や Apototic cell を排除して炎症反応を調節する機能を持つとされる。SP-D は潰瘍性大腸炎患者の腺管上皮に発現が増強しており，IBD の発症・病態修飾に関連があると推測されることから，SP-D 遺伝子 *SFTPD* の SNPs (一塩基多型) 解析を行い，日本人特有の IBD 疾患感受性遺伝子を同定することを目的とした。

C. 研究結果

コード領域にありアミノ酸置換を伴う Met11Thr と Ala160Thr の 2 つの common SNP の検討を行った。各 genotype の単変量解析では，2 つの SNP 共に genotype の頻度に有意差を認めず，各アレル頻度にも有意差は認めなかった。多変量解析では，Met 11Thr CC genotype と Ala160Thr GG genotype において IBD との関連が認められた。さらに Ala160Thr/Met11Thr のハプロタイプ解析を行ったところ，GT ハプロタイプが IBD 疾患感受性と関連を認めた。また，

B. 研究方法

北海道在住の IBD 患者 469 名 (クローン病患者 174 名，潰瘍性大腸炎患者 295 名)，及び正常健康人の末梢血白血球より genomic DNA を抽出し，*SFTPD* 内の 5 つの SNP，及び欧米で報告された *SFTPD*

若年発症例(15歳以下)での検討では、単変量解析にて Met11Thr が有意な関連を示した。

Ara160Thr と Met11Thr に SFTPD 内の tag SNP 3 箇所、及び SFTPD 前後にあり欧米にて IBD との関連性の報告のある各 1 箇所を加えた計 7 箇所のタイピングを行い、ファインマッピングを行ったところ、SFTPD 内の二箇所について疾患関連 locus の可能性が示唆された。さらにハプロタイプ解析では、rs2243639 (Ala160Thr)/rs2255601rs721917 (Met11Thr) の G A C ハプロタイプにおいて、有意な関連性を認めた。

D. 考察

Met11Thr と Ala160Thr の 2 つの common SNP は単変量解析では感受性との関連が認められず、多変量解析、ハプロタイプ解析においてのみ有意な関連が認められた。これより、この 2 つの SNP 自体が疾患の責任 locus ではないことが示唆された。しかし、遺伝的要因が強く影響する若年発症例においては、単変量解析にて Met11Thr が有意な関連を示し、このタイプが IBD 発症の遺伝的素因として関連している可能性が考えられた。

さらに、tag SNP を追加したマッピングの結果からも、Met11Thr の周囲に疾患責任 locus が存在する可能性が高いと考えられた。今回の研究において、その存在範囲を約 4400bp にまで狭めることに成功している。今後は同規模のコホートで再現性を調べ、さらに厳密な責任 locus の同定を行う必要があると考えられる。

E. 結論

炎症反応の調節を担う SP-D は、IBD の疾患感受性と関連することが示唆された。その疾患責任 locus は、Met11Thr の周囲約 4400bp 内に存在する可能性が高いと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

田中道寛、後藤啓、篠村恭久
炎症性腸疾患とアディポサイトカイン
Adipo science Vol. 4 (1), 61-67, 2007

2. 学会発表

田中道寛, 有村佳昭, 後藤 啓, 中垣卓, 田中浩紀, 細川雅代, 山下健太郎, 本谷 総, 野村 昌史, 篠村恭久, 今井造三

炎症性腸疾患における SP-D 遺伝子の検討
第 27 回札幌消化管研究会
札幌医科大学記念ホール

2007 年 9 月 26 日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

日本人クローン病患者における Infliximab 治療効果と
TNFR 遺伝子多型との関連

研究協力者 村松 正明 東京医科歯科大学難治疾患研究所・分子疫学 教授

研究要旨：日本人クローン病 (CD) 患者における Infliximab (IFX) 治療効果と遺伝的因子の関連を検討した。TNF α 受容体である TNF receptor superfamily 1A, 1B (TNFRSF1A, 1B) を候補遺伝子とし、計 5SNPs の遺伝子型と IFX 治療効果 (n=80) との関連を調べた。有効性の判定は Harvey-Bradshaw index (HBI) に従った。TNFRSF1A rs767455 の A allele をホモで持つ群と比較して、G allele を持つ群で IFX 治療効果が有意に低いことが明らかとなった (OR = 0.26; 95%CI = 0.08-0.91)。一方、各 SNPs 単体では IFX 治療効果との間に関連は見られなかったが、TNFRSF1B A/T ハプロタイプ (rs1061624 A/rs3397 T) で有効群と無効群で頻度の差が見られた (P = 0.01)。

共同研究者：松倉寛、池田仁子、吉村直樹*、高添正和*

東京医科歯科大学、*社会保険中央総合病院

A. 研究目的

遺伝子解析により日本人 CD 患者における IFX 治療に対する薬剤感受性との関連性を明らかにし、将来的なオーダーメイド医療確立への貢献を目的とする。

B. 研究方法

TNFRSF1A から 2 個 (rs767455, rs4149570)、TNFRSF1B から 3 個 (rs1061622, rs1061624, rs3397) の遺伝子多型 (SNPs) を選択し、計 5SNPs の遺伝子型を融解曲線分析法を用いて同定し IFX 治療効果との関連を調べた。検体は社会保険中央総合病院で IFX 治療を受けている 81 人の日本人 CD 患者の DNA を用い、有効性の判定は Harvey-Bradshaw index (HBI) に従った。

(倫理面への配慮)

本研究プロトコールは東京医科歯科大学倫理委員会、社会保険中央総合病院倫理

委員会の認証を受けている。

C. 研究結果

TNFRSF1A rs767455 の A allele をホモで持つ群と比較して、G allele を持つ群で IFX 治療効果が有意に低いことが明らかとなった (OR = 0.26; 95%CI = 0.08-0.91)。一方、各 SNPs 単体では治療効果との間に関連は見られなかったが、TNFRSF1B A/T ハプロタイプ (rs1061624 A/rs3397 T) で有効群と無効群で頻度の差が見られた (P = 0.01)。

D. 考察

欧米の研究結果からは TNFRSF1A、TNFRSF1B 遺伝子多型は IFX 治療効果の薬理的マーカーにはなり得ないという結論が導き出されている。しかし、日本人 CD 患者と欧米人 CD 患者を比較した場合、罹患に家族性が少ない、女性に比べて男性の罹患率が有意に多いなどの特徴が見られる。その最たる例が CARD15 や IL23 受容体、ATG16L1 の遺伝子多型であり、この多型は

欧米人では CD の risk factor として認められているが、日本人では疾患感受性に関与していないことが分かっている。欧米人と日本人とで IFX 効果に影響を与える遺伝的因子が異なることは十分考えられる。

今回有意な結果を得た遺伝子多型に関して、その機能は未だ明らかではない。rs767455 は同義 SNP でありコドンの三文字目にあたり、通常は CCA だが変異によって CCG となる。ヒトのコドン使用頻度においてプロリンをコードするコドンは CCU、CCC、CCA、CCG の四種類あるが、他の三種と比較して CCG の頻度が低い。このことから rs767455 は同義 SNP であるが TNFRSF1A 遺伝子の転写や翻訳の段階で何らかの影響を及ぼしている可能性があると考えられた。または真に関連しているのは rs767455 と連鎖不平衡にある別の遺伝子多型である可能性も残されている。

薬剤の効果が得られなかった群に TNFRSF1B の haplotype AT 頻度が高いという結果は日本人で以前報告されている結果と同じ傾向であった。しかしその研究で IFX は用いられておらず、また haplotype AT が外瘻を有する患者群で有意に相関が見られたことから、この haplotype は治療効果というよりも CD の臨床症状全般と関連している可能性が考えられた。

本研究結果は臨床現場における治療方針の決定にすぐに反映されるものではないが、日本人 CD 患者に抗 TNF α 抗体治療を行う上で薬効発現の理解を深め、また将来的な薬剤使い分けへとつながる可能性がある。

E. 結論

TNFRSF1A、TNFRSF1B の二つの遺伝子の多型が日本人 CD 患者における IFX 治療効果と関連していることが示唆された。そのためにも日本人大規模集団での研究を含む更

なる調査や機能解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsukura H, Ikeda S, Yoshimura N, Takazoe M, Muramatsu M. Genetic polymorphisms of TNF receptor superfamily 1A and 1B (TNFRSF1A and TNFRSF1B) affect response to Infliximab in Crohn's disease patients in Japan
ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS (in print 2008)

2. 学会発表

松倉 寛, 池田仁子, 吉村直樹, 高添正和、村松正明 日本人クローン病患者における TNF 受容体遺伝子多型と Infliximab による治療効果の関連
日本人類遺伝学会第 52 回大会 平成 19 年 9 月 14 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

炎症性腸疾患における Th1/Th17 バランスとその制御

分担研究者 日比 紀文 慶應義塾大学医学部内科 教授

研究要旨

(背景) 近年、数々の炎症性疾患において、Th1、Th2 に続く第3のヘルパーT細胞サブセットとして、IL-17 を産生する Th17 の重要性が提唱されている。炎症性腸疾患においては、従来より Crohn 病 (CD) では Th1 型の免疫応答を示すと報告され、IL-17 が双方の疾患で増加していることも既に報告されているが、Th1/Th17 双方についての検討は不十分である。(目的) 炎症性腸疾患における Th1/Th17 バランスを明らかにし、同時にこれを制御するメカニズムについて検討を加えた。(方法) 炎症性腸疾患の粘膜固有層単核細胞 (LPMC) 中の CD4 陽性 T 細胞を分離し、IFN-g/IL-17 ならびに IL-12p40/35, IL-23p19 の発現を検討し、また IL-23 による IFN-g/IL-17 の産生増加を検討した。(結果) CD では IFN-g が、UC では IL-17 が有意に増加していた。IL-12p35 は CD で、IL-23p19 は UC/CD 双方で有意に増加していた。IL-23 刺激による IL-17 の増加は UC でより顕著であった。また、IL-23 刺激による IFN-g の産生増加が粘膜固有層 T 細胞、NK 細胞で観察された。(結論) CD では Th1、UC では Th17 優位になっていることが示され、この制御に IL-23 が重要な役割を担っていることが示唆された。

共同研究者

岡本 晋¹、久松理一¹、小林 拓¹、鎌田信彦¹、新井久美子¹、長沼 誠¹、井上 詠²、緒方晴彦³、岩男 泰²

慶應義塾大学消化器内科¹

同 包括先進医療センター^{2,3}

同 内視鏡センター³

A. 研究目的

炎症性腸疾患はこれまでの幾多の研究にもかかわらず、いまだ原因不明であるが、これまでにその病態形成に種々の免疫異常が関わっていることが報告されている。特に粘膜固有層の CD4 陽性ヘルパーT細胞の機能異常は 1990 年代に報告され、Crohn 病 (CD) においては典型的 Th1 優位、潰瘍性大腸炎では Th2-like や混合型と称されてきた。しかし近年 IL-17 を高産生する

Th17 の重要性が多く炎症性疾患で報告されており、炎症性腸疾患においても粘膜内の IL-17 発現が亢進していることはすでに示されている。ところがマウスを中心とした今までの研究では Th1 と Th17 は互いに拮抗的に制御されると報告されており、また、helperT細胞に特化した形での IL-17 産生の検討 (=Th17 の発現そのもの) は未だ明確にはされていないことから、Th1/Th17 バランスとして病態をとらえる必要がある。それに加えて、IL-12 ファミリーとくに IL-23 が Th1/Th17 をいかに制御しているのかについても解析を行った。

B. 研究方法

①ヒト炎症性腸疾患患者粘膜における IL-17/IFN-g/IL-12p40/p35/IL-23p19 の発現 (RT-PCR 法) を、手術検体の粘膜層を採取し、RNA を抽出した上で RT-PCR 法にて検討した。

②ヒト炎症性腸疾患患者粘膜固有層 CD4T 細胞における IFN-g/IL-17 の発現を、手術検体の粘膜固有層単核細胞をコラゲナーゼ処理にて分離採取したのち、CD4 陽性細胞を magnetic sorting にて分離し、RT-PCR 法にて検討した。

③ヒト炎症性腸疾患患者腸管組織中の IL-17 の局在を確認するため、抗 CD4、抗 IL-17 で蛍光 2 重免疫染色を行った。

④ヒト炎症性腸疾患患者粘膜固有層単核細胞からの、IL-23 による IFN-g/IL-17 産生増加を ELISA 法、cytokine secretion assay (Miltenyi Biotec) にて解析した。

C. 研究結果および考察

①粘膜における IL-17 発現は UC, CD ともに有意に高値であった。IL-12p40 は UC/CD 双方で、IL-12p35 は CD のみで、IL-23p19 は UC/CD 双方で高かった。

②CD4 陽性細胞において mRNA の発現は、IFN-g は CD のみ、IL-17 は UC のみで亢進していた。

③IL-17 は主として CD4 陽性 T 細胞に発現していたが、それ以外にも局在を認めた。

④IL-23 による IL-17 の増加は UC で有意に大きかった。また、IL-23 は T 細胞、NK 細胞からの IFN-g の産生も増加させた。

D. 考察

今回の検討においても、従来の報告と同様に、粘膜固有層 CD4+T 細胞について、CD が Th1 優位の免疫応答を示していることが確認された。一方で Th17 はむしろ

UC で強調されていることが示された。CD においては、T-bet や IFN-g, IL-12 といった Th1 応答が優位になっていることが IL-17 発現を抑制している可能性が考えられる。

また、マウスを対象とした近年の研究から、IL-23 は Th17 を刺激する代表的なサイトカインと考えられているが、今回ヒト炎症性腸疾患粘膜固有層 T 細胞や NK 細胞からの IFN-g 産生も増加させることが明らかになったことは、抗 IL-17 抗体や抗 IL-23p19 抗体の新規治療としての可能性を検討する上で示唆に富むものと考えられる。

E. 結語

炎症性腸疾患粘膜固有層ヘルパー T 細胞サブセットを検討したところ、CD では Th1、UC では Th17 優位になっていることが示され、この制御に IL-23 が重要な役割を担っていることが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsuoka K, Hibi T et al.: Cytomegalovirus is frequently reactivated and disappears without antiviral agents in ulcerative colitis patients. *Am J Gastroenterol* 102 (2): 331-337, 2007.

Kobayashi T, Hibi T et al.: Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+T cell in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis* 13 (7): 837-846, 2007.

Yoshizawa S, Hibi T et al.: Clinical significance of serum p53 antibodies

- in patients with ulcerative colitis and its carcinogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 13 (7): 865-873, 2007.
- Kobayashi K, Hibi T et al.: Development of consensus statements for the diagnosis and management of intestinal Behçet's disease using a modified Delphi approach. *J Gastroenterol* 42 (9): 737-45, 2007.
- Chinen H, Hibi T et al.: Lamina propria c-kit+immune precursors reside in human adult intestine and differ into natural killer cells. *Gastroenterology* 133 (2): 559-573, 2007.
- Ishikawa H, Hibi T et al.: Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunol Rev* 215: 154-165, 2007.
- Nanno M, Hibi T et al.: Exacerbating role of gammadelta T cells in chronic colitis of T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* 134 (2): 481-490, 2008.
- Kamada N, Hibi T et al.: Non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inhibits signal transduction in intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 76 (1): 214-220, 2008.
- Matsumoto T, Hibi T et al.: Endoscopic and chromoendoscopic atlas featuring dysplastic lesions in surveillance colonoscopy for patients with long-standing ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 14 (2): 259-64, 2008.
- Sakuraba A, Hibi T et al.: A Pilot open-labeled prospective randomized study between weekly and intensive treatment of granulocyte and monocyte adsorption apheresis for active ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 43(1):51-56, 2008
- Takaishi H, Hibi T et al.: Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol* 2008, in press
- 緒方晴彦、日比紀文: IV. カプセル内視鏡の特徴と診断法. *日本大腸肛門病学会雑誌* 60 (10): 947-951, 2007.
- 日比紀文、長沼誠: 炎症性腸疾患に対する新しい治療戦略. *日本内科学会雑誌* 96 (5): 997-1005, 2007.
- 鎌田信彦、日比紀文 他: 腸管粘膜マクロファージによる腸管ホメオスターシスとその破綻. *分子消化器病* 4 (2): 104-109, 2007.
- 日比紀文、中澤敦: 腸内細菌と腸管免疫. *医学のあゆみ* 221 (11): 907-911, 2007.
- 佐藤俊朗、伊達昌一、日比紀文: 消化管上皮幹細胞. *G. I. Research* 15 (4): 263-267, 2007.
- 緒方晴彦、日比紀文: 炎症性腸疾患診療の進歩と今後の展望. *日本消化器病学会雑誌* 104 (8): 1155-1164, 2007.
- 鎌田信彦、日比紀文 他: IL-10 産生性抑制性腸管マクロファージの特殊性と IBD 治療へのアプローチ. *IBD Research* 1 (3): 189-194, 2007.
- 日比紀文: 特集/炎症性腸疾患における AZA/6-MP の役割. *臨床消化器内科* 22 (10): 1549-1550, 2007.
- 鎌田信彦、日比紀文 他: クロウン病の発症と樹状細胞様マクロファージからの IL-23
- 臨床免疫・アレルギー科* 49 (1): 36-41, 2008.
- 久松理一、日比紀文 他: 3. 腸管免疫研究の最前線—腸管の恒常性維持と炎症性

腸疾患におけるその破綻— 1. 消化管.

Annual Review 消化器 2008 : 13-18,
2008.

2. 学会発表

Kobayashi T, Hibi T et al. Abnormal innate immune response and Th1/Th17 induction in murine colitis and human inflammatory bowel disease. 94th Annual Meeting of American Association of Immunologists, Miami, May 18-23, 2007.

Inoue N, Hibi T et al. : Clinical significance of serum p53 antibodies in patients with ulcerative colitis and its carcinogenesis. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 20, 2007.

Kamada N, Hibi T et al. : Abnormally differentiated intestinal macrophages in human Crohn' s disease produce excess IL-23 in response to the enteric bacteria. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 21, 2007.

Ogata H, Hibi T et al. : Effect of rabamipide on disruption of tight junctional protein, claudin-1, and trans-epithelial electrical resistance induced by oxidative stress in intestinal inflammation. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 20, 2007.

Hisamatsu T, Hibi T et al. : Profiling of amino acids metabolism ("Amino Index") is useful for diagnosis, judgment of clinical activity, and understanding of pathophysiology in inflammatory bowel disease. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 21, 2007.

Naganuma M, Hibi T et al. : Novel

Endoscopic activity index is useful to decide treatment options of active ulcerative colitis. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 21, 2007.

Kobayashi T, Hibi T et al. : Abnormally differentiated intestinal macrophage causes both Th1 and Th17 induction in IL-10 deficient mice.

108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 21, 2007.

Kamada N, Hibi T et al. : Intestinal macrophages in human Crohn' s disease produce excess IL-23 in response to commensal bacteria.

13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 10, 2007.

Chinen H, Hibi T et al. : In situ natural killer cell differentiation from lamina propria c-kit⁺ immune precursor cells in human adult intestine.

13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 11, 2007.

Kobayashi T, Hibi T et al. : Exclusive increase of CX3CR1⁺CD28⁻CD4⁺T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes.

13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 11, 2007.

Hisamatsu T, Hibi T et al. : L-histidine ameliorates IL-10 deficient cells transfer murine colitis model by inhibition of pro-inflammatory cytokine production from mononuclear cells. 13th International Congress of

Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 11, 2007.

久松理一、日比紀文 他：クローン病における腸管マクロファージによる腸内細菌認識異常と Th-1 誘導—マクロファージを中心とした炎症サイクル. 第 93 回日本消化器病学会総会、青森、2007. 4. 19 シンポジウム

長沼誠、日比紀文 他：潰瘍性大腸炎に対する白血球除去療法・シクロスポリン A の治療効果の予測因子の検討. 第 93 回日本消化器病学会総会、青森、2007. 4. 21 パネルディスカッション

岩男泰、日比紀文 他：colitic cancer の内視鏡像と新しいサーベイランスプログラム構築に向けて. 第 73 回日本消化器内視鏡学会総会、東京、2007. 5. 11 ワークショップ

長沼誠、日比紀文 他：潰瘍性大腸炎に対する白血球除去療法・シクロスポリン A の治療効果の予測因子に内視鏡スコアは有用か？第 73 回日本消化器内視鏡学会総会、東京、2007. 5. 11 ワークショップ

新井久美子、日比紀文 他：IL-10 ノックアウトマウス腸炎モデルにおける Th1/Th17 バランスとその制御. 第 44 回日本消化器免疫学会総会、東京、2007. 7. 9
岡本晋、日比紀文 他：潰瘍性大腸炎に対する PC-SOD の治療効果の検討. 第 44 回日本消化器免疫学会総会、東京、2007. 7. 9

和田安代、日比紀文 他：合成 Retinoic acid receptor agonist (AM80) は樹状細胞の分化に作用し IL-1 2 産生を抑制することで DSS 腸炎を改善させる. 第 28 回日本炎症・再生医学会、東京、2007. 8. 3
日比紀文：クローン病マクロファージの腸内細菌に対する免疫応答異常. 第 35 回日本臨床免疫学会総会、大阪、

2007. 10. 19 シンポジウム

小林拓、日比紀文、ほか：IL-10 ノックアウトマウス腸炎における抗原提示細胞による Th1/Th17 バランスの制御. 第 35 回日本臨床免疫学会総会、大阪、2007. 10. 19 ワークショップ

矢島知治、日比紀文 他：6-MP/AZA 代謝における ITPase 遺伝子多型の意義. 第 49 回日本消化器病学会大会、神戸、2007. 10. 19 パネルディスカッション
長沼誠、日比紀文 他：シクロスポリン A、インフリキシマブはステロイドより先に行われるべきか？第 62 回日本大腸肛門病学会学術集会、東京、2007. 11. 2 シンポジウム

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

・国際特許

PCT/JP2008/050942 2008/01/24 出願
「IBD の評価方法、ならびにアミノ酸情報処理装置、アミノ酸情報処理方法、アミノ酸情報処理システム、アミノ酸情報処理プログラムおよび記録媒体」

・特許

特願 2008-013393 2008/01/24 出願
「IBD の評価方法、ならびにアミノ酸情報処理装置、アミノ酸情報処理方法、アミノ酸情報処理システム、アミノ酸情報処理プログラムおよび記録媒体」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

炎症性腸疾患における酸化修飾蛋白の同定

研究協力者 内藤 裕二 京都府立医科大学医学部 消化器内科 准教授

研究要旨：これまで傷害因子としてのみ認識されていた酸化ストレスが各種蛋白質に対して翻訳後酸化修飾を惹起し、蛋白質の機能変化をもたらすとともに新たなシグナル分子として作用していることが明らかとなりつつある。本研究においては、炎症大腸粘膜内のこれら酸化修飾蛋白質の検出・同定を行い、さらにはその機能解析を目標に検討を進めている。現在、好中球、好酸球由来のハロゲン化修飾蛋白質を検出し、その病態における意義を検討中である。

共同研究者 高木智久
京都府立医科大学医学部消化器内科

A. 研究目的

我々はこれまでに炎症大腸粘膜において酸化ストレスが亢進しており、その病態に關与する重要な因子であることを報告してきた。この病態において、活性化好中球の存在は重要であり、好中球由来の酸化ストレスは粘膜傷害因子として作用すると考えられている。一方、この好中球が様々な蛋白質に対して酸化修飾を惹起し、蛋白質の機能変化をもたらしている可能性も示唆されている。しかしながら、この翻訳後修飾と炎症性腸疾患の病態における関わりは未だ明らかになっていない。そこで今回我々は、潰瘍性大腸炎患者大腸粘膜、マウス Dextran Sodium Sulfate (DSS) 腸炎モデルならびに 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 腸炎モデルを用いて酸化修飾蛋白の解析を行った。

B. 研究方法

動物モデルとして7週齢雄性 C57BL/6 マウスを用い、既報に従いマウス DSS 腸炎モデル、TNBS 腸炎モデルを作成し、大腸粘膜を採取し解析に供した。本実験に関しては本学内実験動物取り扱い規約を遵守して施行された。さらに、文書にて同意の得られた潰瘍性大腸炎患者を対象に大腸内視鏡検査下で大腸粘膜生検検体を採取し、解析に供した。

解析は 3,5-dibromotyrosine (DiBrY) モノクローナル抗体を用いてハロゲン化修飾蛋白質の解析を1次元、2次元電気泳動を用いて行い、蛋白の同定を質量分析計にて行った。

C. 研究結果

マウス TNBS 腸炎、DSS 腸炎において大腸粘膜中

MPO 活性の亢進を認め、組織学的にも著しい好中球・好酸球の浸潤を認めた。蛋白の解析においては DiBrY 修飾蛋白質の存在が検出された。また、活動期潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜においても DiBrY 修飾蛋白質の存在が検出された。

D. 考察

好中球・好酸球は生体内において炎症病態に深く関与しており、これらの炎症細胞が持つ MPO は過酸化水素と臭素の存在下で次亜臭素酸 (HOBr) を形成することが知られている。この活性型ハロゲン種は核酸、蛋白質、脂質に結合してハロゲン化修飾物を形成することが知られている。DiBrY は蛋白質チロシン残基に Br が結合して出来る酸化修飾蛋白質であり、一般には新規組織障害マーカーとして捉えられている。活動期潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜やマウス腸炎モデル大腸粘膜において DiBrY 修飾蛋白の存在が検出されたが、現在、本蛋白質を同定中である。また、我々はこれら修飾蛋白質が機能変化を受け、新たなシグナル分子として作用している可能性を検討中である。

E. 結論

活動期潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜やマウス腸炎モデル大腸粘膜において DiBrY 修飾蛋白質の存在が検出された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. J Clin Biochem Nutr. 41. 18-26. 2007

2. Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Molecular fingerprints of neutrophil-dependent oxidative stress in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. Oct;42(10) 787-98. 2007

3. 内藤裕二、高木智久 : 炎症性腸疾患治療の最前線. 京都府立医科大学雑誌 116(3)127-143. 2007

2. 学会発表 特記事項なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
取得なし
2. 実用新案登録
登録なし
3. その他
特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

炎症性腸疾患患者における血清 IgG 糖鎖のガラクトース欠損と疾患活動性との相関

研究協力者 飯島 英樹 大阪大学大学院消化器内科学 助教

研究要旨：炎症性腸疾患患者の IgG 糖鎖構造を解析したところ、炎症性腸疾患患者では健常者や炎症性腸疾患患者以外の腸炎患者に比して糖鎖末端におけるガラクトースの欠損を高率に認めた。ガラクトース欠損は、疾患の発症早期より陽性となり、疾患活動性とも相関した。血清 IgG のガラクトース欠損は、新たな疾患の診断マーカーとして有用であるばかりでなく、治療方法選択のために活用できると考えられた。

共同研究者：新崎信一郎¹、中川孝俊²、近藤昭宏
三善英知³、辻井正彦¹、辻晋吾¹、林紀夫¹
大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学¹、
鎖治療学²、機能診断科学³

A. 研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) 患者における IgG 糖鎖構造解析を行い、IgG のガラクトース欠損と疾患活動性の相関を明らかにすること

B. 研究方法

クローン病 60 例、潰瘍性大腸炎 58 例、健常者 27 例、IBD 以外の腸炎患者 15 例の血清より分離した IgG より Fc 部分の付着糖鎖を切り出し、HPLC にて糖鎖構造を解析した。2 箇所の遠位糖鎖末端にガラクトースが付着するものを G2、いずれもガラクトースを欠損しているものを G0 とし、G0/G2 比を算出した。糖鎖根部にフコースを付着する糖鎖の G0/G2 比が健常サンプルを用いて算出した cut off 値を上回るものを G0F/G2F 陽性とし、IBD 患者の疾患活動性などの背景との相関を調べた。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントの取得、患者情報および血清サンプルの管理などについて、大阪大学倫理委員会の許可を得た上、厳重な配慮を行った。

C. 研究結果

健常者に比して IBD 患者では IgG フコシル化糖鎖においてガラクトース欠損糖鎖が増加していた。フコシル化ガラクトース欠損 IgG の程度を示す G0F/G2F と、発症時期や罹病期間の相関は認めなかった。一方、G0F/G2F は IBD の疾患活動性や罹病範囲と高い相関を認めた。G0F/G2F 陽性潰瘍性大腸炎患者では陰性患者に比して、再燃率が有意に高かった。

D. 考察

IgG のガラクトース欠損が疾患活動性と相関し、特に再燃を起こしやすい IBD 患者で顕著であることから、IBD の発症、増悪に深く関わることが示唆された。

E. 結論

IgG 糖鎖のガラクトース欠損が IBD の診断マーカーになるばかりでなく、疾患活動性、予後予測マーカーとして有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shinzaki S, Iijima H, Nakagawa T, et al. IgG Oligosaccharide Alterations Are a Novel Diagnostic Marker for Disease Activity and the Clinical Course of Inflammatory Bowel Disease. Am J Gastroenterol Accepted for publication.

In press.

2. 学会発表

1. Shinzaki S, Iijima H, Nakagawa T, et al. New serologic marker for IBD based on the oligosaccharide analysis. 13th International Congress of Mucosal Immunology Tokyo 2007/7/10

2. Shinzaki S, Iijima H, Nakagawa T et al., New diagnostic marker in Crohn's disease based on IgG oligosaccharide analysis The 2nd Korea-Japan IBD symposium Tokyo 2007/12/1

3. 飯島英樹、新崎信一郎、林紀夫 レクチンを介した自然免疫系制御による炎症性腸疾患治療の可能性 第93回日本消化器病学会総会 青森 2007/4/21

4. 新崎信一郎、飯島英樹、中島佐知子、他 糖鎖解析に基づく炎症性腸疾患の新たな血清マーカー 第93回日本消化器病学会総会 青森 2007/4/21

5. 新崎信一郎、飯島英樹、中島佐知子、他 IgG 糖鎖解析に基づく新たなクローン病診断法 DDW-Japan 2007 神戸 2007/10/18

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

炎症性腸疾患の鑑別判定方法 (特願 2006-140457)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし