

## ベーチェット病における CD 4 陽性 T 細胞サブセットの解析

杉 央子<sup>1)</sup>, 中沢 正年<sup>2)</sup>, 中村 聡<sup>1)</sup>, 南 陸彦<sup>2)</sup>, 大野 重昭<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>横浜市立大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>横浜市立大学医学部寄生虫学教室

### 要 約

ベーチェット病の病態には種々の細胞性免疫機序が関与すると考えられている。近年, CD 4 陽性細胞がその産生するサイトカインの種類によりヘルパーT(Th)細胞サブセットに分類されることが報告されている。我々は, 眼症状を有するベーチェット病患者 22 例の末梢血リンパ球の Th サブセットを解析し, 正常対照群 19 例と比較検討した。また, 患者群を眼症状の活動性により活動期患者群 13 例, 非活動期患者群 9 例の 2 群に分類した。患者および対照群の末梢血リンパ球を固相化抗 CD 3 抗体で 6 時間刺激した後, 抗インターロイキン(IL)-2 抗体, 抗 IL-4 抗体を用いて細胞内サイトカインを直接蛍光標識し, フローサイトメーターで解析した。その結果, ベー

チェット病活動期患者群の CD 4 陽性細胞中の IL-2 産生細胞の割合は, 非活動期群および正常対照群に比べ有意に上昇していた( $p < 0.01$ )。一方, IL-4 産生細胞の割合には有意差はなかった。以上から, ベーチェット病の活動性には, Th 1 サイトカインである IL-2 を産生する CD 4 陽性細胞が深く関わっていることが示され, 今後のベーチェット病の治療, 病態の把握に, Th サブセットの解析が有用であると考えられる。(日眼会誌 101: 335-340, 1997)

キーワード: ベーチェット病, フローサイトメトリー, Th 1/Th 2, IL-2, 免疫病態

### Analysis of the Profile of CD4<sup>+</sup> Cells in Behçet's Disease

Nakako Sugi<sup>1)</sup>, Masatoshi Nakazawa<sup>2)</sup>, Satoshi Nakamura<sup>1)</sup>,  
Mutsuhiko Minami<sup>2)</sup> and Shigeaki Ohno<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Parasitology, Yokohama City University School of Medicine

### Abstract

The cell-mediated immune response and disorders of the cytokine-producing cells play an important role in the pathogenic mechanisms of Behçet's disease. Recently, CD4<sup>+</sup> T helper cells have been categorized into at least two distinct subsets based on their profiles of cytokine production. We analyzed the number of interleukin (IL)-2 producing type 1 helper T (Th1) cells and IL-4 producing Th2 cells from 22 patients (male: 12, female: 10) with Behçet's disease and 19 normal controls (male: 9) by flow cytometric analysis. The patients with Behçet's disease were categorized into two groups by the activity of ocular inflammation; one group comprised the active cases (13 patients) and the other the inactive cases (9 patients). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients and normal controls were stimulated with immobilized anti-CD3 mAb for 6 hours and immunostained with anti

IL-2 and anti IL-4 mAbs followed by fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated 2nd Abs. The number of IL-2 producing CD4<sup>+</sup> cells in Behçet's disease patients with active uveoretinitis was significantly higher than that from both inactive cases ( $p < 0.005$ ) and controls ( $p < 0.01$ ). In contrast, the number of IL-4 producing CD4<sup>+</sup> cells showed no significant difference among the groups. These results may indicate that Th1 cells play an important role in the immunopathogenesis of ocular inflammation of Behçet's disease. Thus, analysis of Th subsets in Behçet's disease may be useful for management of the disease. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 335-340, 1997)

Key words: Behçet's disease, Flowcytometry, Th1 and Th2, IL-2, Immunopathogenesis

別刷請求先: 236 神奈川県横浜市金沢区福浦 3-9 横浜市立大学医学部眼科学教室 杉 央子

(平成 8 年 6 月 13 日受付, 平成 8 年 11 月 5 日改訂受理)

Reprint requests to: Nakako Sugi, M.D. Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken 236, Japan

(Received June 13, 1996 and accepted in revised form November 15, 1996)

## I 緒 言

ベーチェット病は口腔内の再発性アフタ性潰瘍, 結節性紅斑様皮疹などの皮膚症状, 網膜ぶどう膜炎などの眼症状, および外陰部潰瘍を主症状とする慢性炎症性全身疾患である。その病因は未だ明らかにされておらず, 免疫病態も不明な点が多い。ベーチェット病の皮膚病変あるいは前房蓄膿中にみられる浸潤細胞が主に好中球であることから, 好中球の異常が本疾患の本態であると考えられてきた<sup>1)2)</sup>。一方, ベーチェット病患者血清中のインターフェロン(IFN)- $\gamma$ 活性<sup>3)</sup>および末梢血単核球のIFN- $\gamma$ 産生能<sup>4)</sup>は, 健常人に比べ有意に上昇しているという報告もあり, 近年, その病態形成には活性化したT細胞および, その産生するサイトカインが重要な役割を果たしていると考えられている<sup>5)</sup>。

サイトカインは様々な生物学的活性を有しており, 同一のサイトカインが種々の細胞から産生され, さらに, 多種の細胞に作用してサイトカイン産生を刺激する, いわゆるサイトカインネットワークを形成する<sup>6)</sup>。従来からTリンパ球は主としてヘルパーT(Th)細胞(CD 4<sup>+</sup>)と細胞障害性T細胞(CD 8<sup>+</sup>)に分けられてきたが, 1986年Mosmannら<sup>7)</sup>によって, マウスCD 4陽性細胞はその産生するサイトカインの種類に基づいて, Th 1, Th 2の2つのサブセットに分けられることが報告された。Th 1サブセットはインターロイキン(IL)-2, IFN- $\gamma$ および腫瘍壊死因子(TNF)- $\beta$ を産生するが, IL-4やIL-5は産生しない。一方, Th 2サブセットはIL-2, IFN- $\gamma$ を産生せず, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10を産生する。機能的にTh 1サブセットは遅延型過敏症やCD 8陽性細胞の活性化に関与し, Th 2サブセットはB細胞の増殖, 抗体産生を助けていると考えられる<sup>8)</sup>。

これまでT細胞サブセットの判定には, 抗原またはマイトージェンで刺激培養したT細胞やT細胞クローンの培養上清中のサイトカインを酵素抗体法で測定する方法や, 細胞のサイトカインメッセンジャーRNA(mRNA)をreverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)で検出する方法が用いられていた。しかし, これらの方法は定性的なもので, T細胞の各サブセットの比率を直接定量的に求めることは不可能であった。近年, マウスリンパ球内のサイトカインを抗サイトカイン抗体を用いて標識し, フローサイトメトリーで解析する方法が開発され<sup>9)</sup>, Th細胞のサブセットの比率を直接解析することが可能になった。今回, 我々はベーチェット病の免疫病態解明の一環として, ヒトリンパ球内のサイトカインを直接蛍光染色し, フローサイトメトリーで測定する方法を用いて, ベーチェット病患者のTh細胞のTh 1, Th 2サブセットの割合を検討し, 眼症状を中心とする臨床症状との相関について解析を行ったので報告する。

表1 対象患者の背景

症例 No.	年齢	性別	病型*	HLA-B 51
活動期患者				
1	43	F	完全型	-
2	33	F	不全型	-
3	35	F	不全型	-
4	33	F	不全型	+
5	36	M	不全型	-
6	44	M	完全型	-
7	33	M	完全型	+
8	44	F	完全型	-
9	34	M	完全型	+
10	47	F	完全型	+
11	22	M	不全型	+
12	36	F	完全型	+
13	25	M	不全型	+
非活動期患者				
1	41	F	完全型	-
2	42	M	不全型	+
3	40	F	不全型	+
4	46	M	不全型	-
5	59	M	完全型	+
6	39	M	不全型	+
7	34	M	完全型	-
8	44	F	完全型	-
9	42	M	不全型	-

\*病型は厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班による診断基準(1987年)による。

HLA: ヒト白血球抗原, M: 男性, F: 女性

## II 対象および方法

## 1. 対 象

横浜市大病院眼科ぶどう膜炎外来通院中の眼症状を有するベーチェット病患者で, 免疫抑制治療を受けていない22例を対象とした。その内訳は男性12例, 女性10例で, 年齢は22~59歳に及び, 平均39.0歳であった。ベーチェット病の診断は, 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班の診断基準(1987年)に従った。ベーチェット病の病型は完全型が11例, 不完全型が11例で, うちヒト白血球抗原(HLA)-B 51陽性は完全型7例, 不完全型4例であった(表1)。また, 対照として健康成人19例(男性9例, 女性10例)を用いた。対照の平均年齢は32.4歳であった。インフォームド・コンセントはすべての患者および健康成人から得られた。

眼症状の活動性から, 患者群を毎月1回以上のぶどう膜炎発作を3か月以上繰り返す活動性の症例13例(活動期患者群)と, 3か月間以上ぶどう膜炎の発作を起さない非活動性の症例9例(非活動期患者群)の2群に分類した。活動期患者群の採血は眼発作から2週間以内に行った。

## 2. 抗体および試薬

末梢血リンパ球内のサイトカインの染色は, 一次抗体

として抗ヒトIL-2モノクローナル抗体(mouse IgG 1)(Genzyme),抗ヒトIL-4モノクローナル抗体(mouse IgG 1)(Genzyme)を用い,二次抗体として fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG 1モノクローナル抗体(Southern Biotechnology)を用いた.また,リンパ球表面抗原の染色には phycoerythrin (PE) 標識マウス抗ヒトCD4モノクローナル抗体(Becton Dickinson)を用いた.

リンパ球培養には10%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培養液(GIBCO)を用い,培養中に細胞内で産生された蛋白の細胞外への流出を阻害するため,0.1 M モネンシン(Sigma)を加えた.

細胞内のサイトカインを染色する際,細胞膜表面を開窓し抗体を細胞内へ移行させるために,サポニン含有リン酸緩衝液を用いた.

### 3. 細胞調整および培養

末梢血をヘパリン採血し,Ficoll-Conray液(比重1.077)(Sigma)を用いた比重遠心法により単核球を分離した.これを $4 \times 10^6$  cells/mlに調整し,抗CD3抗体を固相化した24穴培養プレート(FALCON® No. 3047)で培養した.実験により0,6,10,24,48時間培養を行った.

### 4. 染色,測定

培養後の細胞をリン酸緩衝液(PBS,0.01 M,pH 7.2)で2回洗浄し,2%パラフォルムアルデヒドで10分間固定したのち,細胞内サイトカインおよび表面抗原の染色を行った. $1 \times 10^6$ 個の細胞を0.1%サポニン,10% AB型血液のヒト血清と $1 \mu\text{g/ml}$ ヤギIgG(Chemicon International Inc)を含むPBS  $100 \mu\text{l}$ に浮遊させ,10分後に抗ヒトIL-2モノクローナル抗体,抗ヒトIL-4モノクローナル抗体およびマウスIgG 1(Chemicon International Inc)を加えて氷上で30分間反応させた.次に,サポニン含有PBSで2回洗浄後, $1 \mu\text{g/ml}$ ヤギIgGを含むサポニンPBS  $100 \mu\text{l}$ 中で,FITC標識した二次抗体と暗室室温で30分間反応させた.細胞を洗浄し,PE標識

抗CD4抗体を加え,氷上で30分間反応させ,2回洗浄後PBS  $500 \mu\text{l}$ に再懸濁し,FACScan®フローサイトメトリー(Becton Dickinson)で測定,解析した.前方散乱光および側方散乱光強度によりリンパ球分画にゲートをかけ,1検体につきゲート内10,000個を測定して解析した.解析ソフトはCELL Quest software(Becton Dickinson)を用い,統計学的な有意差の検定にはMann-Whitney検定を用いた.

### 5. 染色の特異性

染色の特異性を確認するため,末梢血単核球細胞(PBMCs)を6時間培養後,リコンビナントIL-2あるいはIL-4の存在下で抗サイトカイン抗体で染色し,サイトカイン特異的モノクローナル抗体の阻害試験を行った.また,細胞内サイトカインおよび細胞表面抗原の標識は蛍光顕微鏡(OLYMPUS®)で確認し,走査型レーザー生物顕微鏡LSM-GB 200 UV(OLYMPUS®)を用いて撮影した.

## III 結果

### 1. 末梢血単核球中のCD4陽性細胞の割合

末梢血単核球中のCD4陽性細胞の割合を患者群と対照群とで比較検討した.ベーチェット病患者群の末梢血リンパ球中のCD4陽性細胞の割合は $36.9 \pm 8.7\%$ (平均値 $\pm$ 標準偏差)で,対照群の $36.0 \pm 6.8\%$ と比べ有意差はなかった.ぶどう膜炎の活動性と非活動性でも差はみられなかった.

### 2. 染色の特異性

図1に各サイトカイン産生CD4陽性細胞のヒストグラムを示す.リコンビナントサイトカインを加えることにより細胞への抗サイトカイン抗体の結合が完全に阻害され,染色の特異性が確認された.

蛍光顕微鏡により蛍光顕微鏡細胞内サイトカインの染色および細胞表面抗原の蛍光染色を確認した.図2aは共焦点レーザー顕微鏡で撮影したFITC標識IL-2抗体で染色したT細胞であり,細胞質内にIL-2の存在が示

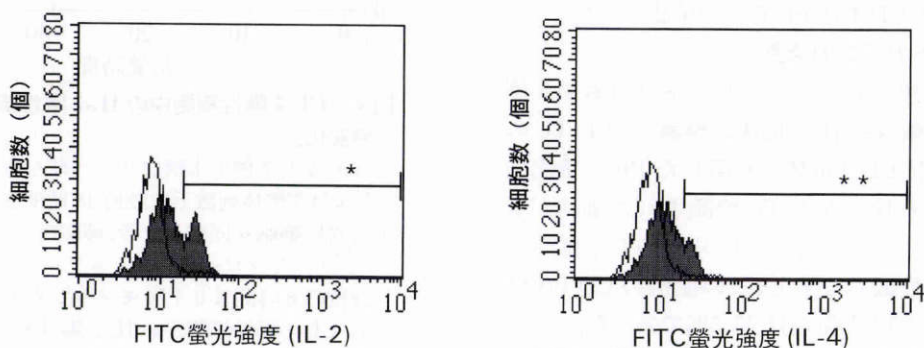


図1 細胞内サイトカイン染色の特異性.

抗サイトカイン抗体の特異性を確認するために,CD4陽性細胞をリコンビナントサイトカイン(IL-2,IL-4)の存在下(実線)または非存在下(黒塗り)で染色し解析した.図のX軸は fluorescein isothiocyanate (FITC)の蛍光強度を,Y軸は細胞数を表す.\*:インターロイキン(IL)-2産生細胞,\*\*:IL-4産生細胞.

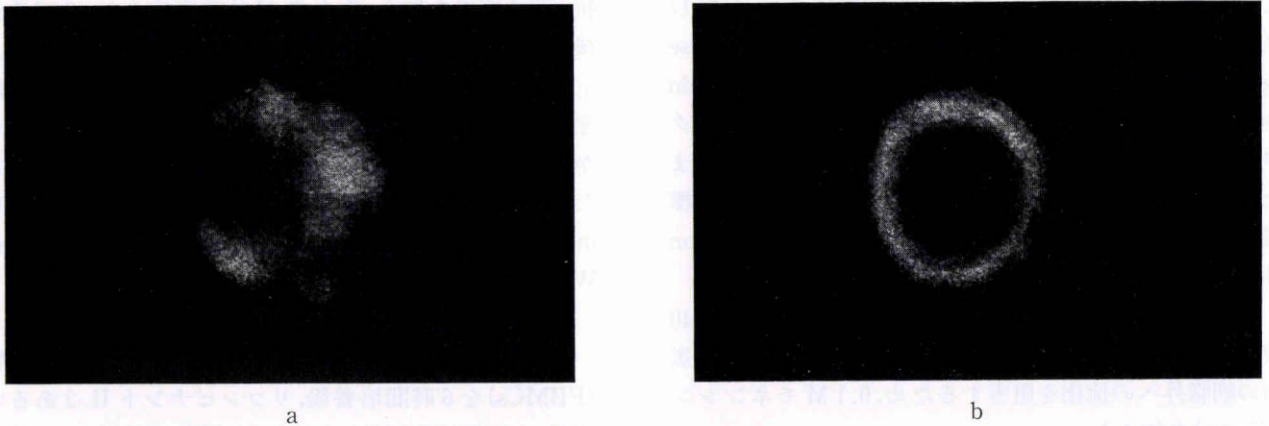


図2 共焦点レーザー写真。

a: FITC 標識抗 IL-2 抗体によりリンパ球細胞質内の IL-2 を染色した, b: FITC 標識抗 CD4 抗体によりリンパ球細胞表面の CD4 分子を染色した。

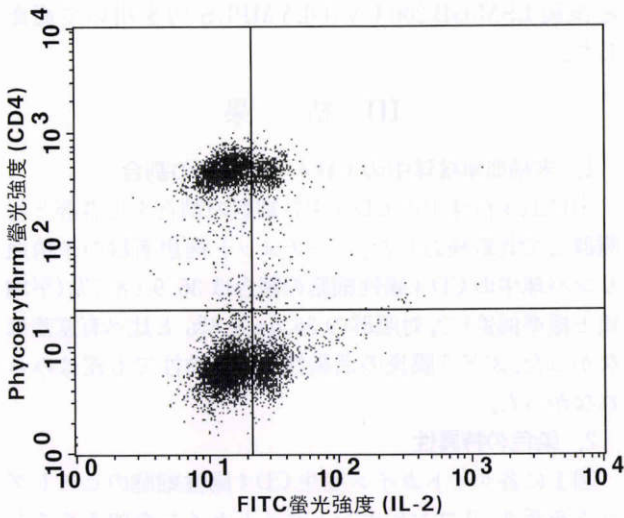


図3 フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球の解析。

X 線は FITC 標識抗 IL-2 抗体の蛍光強度を示す, Y 軸は phycoerythrin (PE) の蛍光強度, すなわち細胞表面の CD4 抗原の有無を示す, 四分割された右上領域の細胞は IL-2 産生 CD4 陽性細胞である。

された。図 2 b は FITC 標識抗 CD4 抗体で染色した T 細胞で, 細胞表面の CD4 分子の存在が確認された。

3. 細胞内サイトカインの染色

ベーチェット病患者の 2-カラーヒストグラム の 1 例 を 図 3 に 示 す, X 軸 は 抗 IL-2 抗体 に 標 識 し た FITC の 蛍 光 強 度, Y 軸 は 抗 CD4 抗体 に 標 識 し た PE の 蛍 光 強 度 を 表 す, 細胞 内 の IL-2 が FITC 標 識 さ れ た 細胞 が X 軸 側 に 陽 性 に 示 さ れ て い る, 図 の 四 分 割 の 右 上 部 分 が IL-2 産 生 CD4 陽 性 細胞 を 表 し, この 症 例 の CD4 陽 性 細胞 中 の IL-2 産 生 細胞 の 割 合 は 25.5% で あ っ た。

4. CD4 陽性細胞中のサイトカイン産生細胞の割合の経時変化

正常対照 12 例の, 各サイトカイン産生細胞の割合の経時変化を観察した(図 4)。ベーチェット病患者 10 例でも

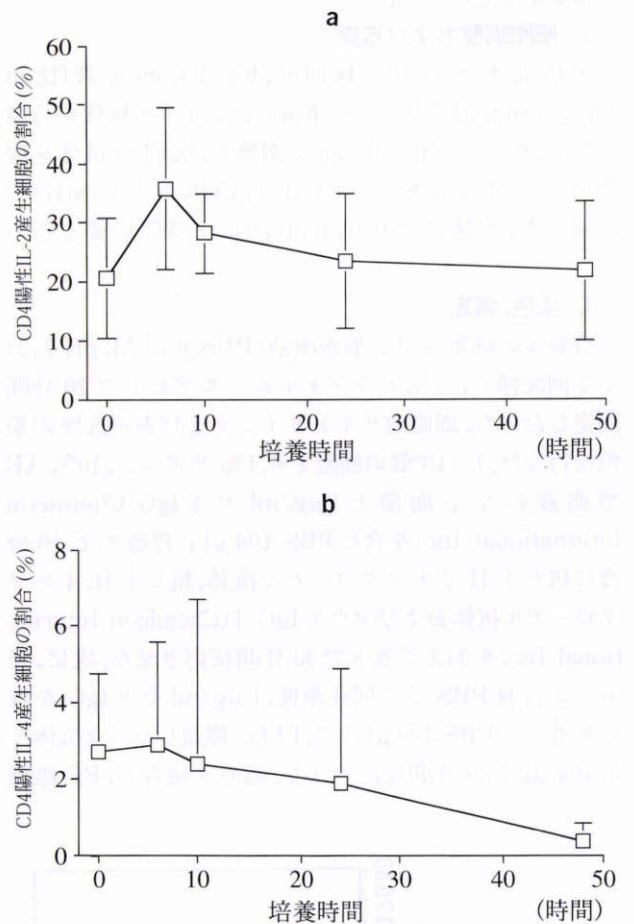


図4 CD4 陽性細胞中の IL-2 陽性細胞の割合の経時変化。

健康成人 7 例の末梢血リンパ球を用い, 固相化した抗 CD3 抗体刺激下で最長 48 時間まで培養した。経時的に細胞を固定した後, 細胞内サイトカインの染色を行い, フローサイトメトリーで解析した。培養の最後の 6 時間は 0.1 M モネシンを加えた。

a: CD4 陽性細胞中の IL-2 陽性細胞の割合の経時変化, b: CD4 陽性細胞中の IL-4 陽性細胞の割合の経時変化。

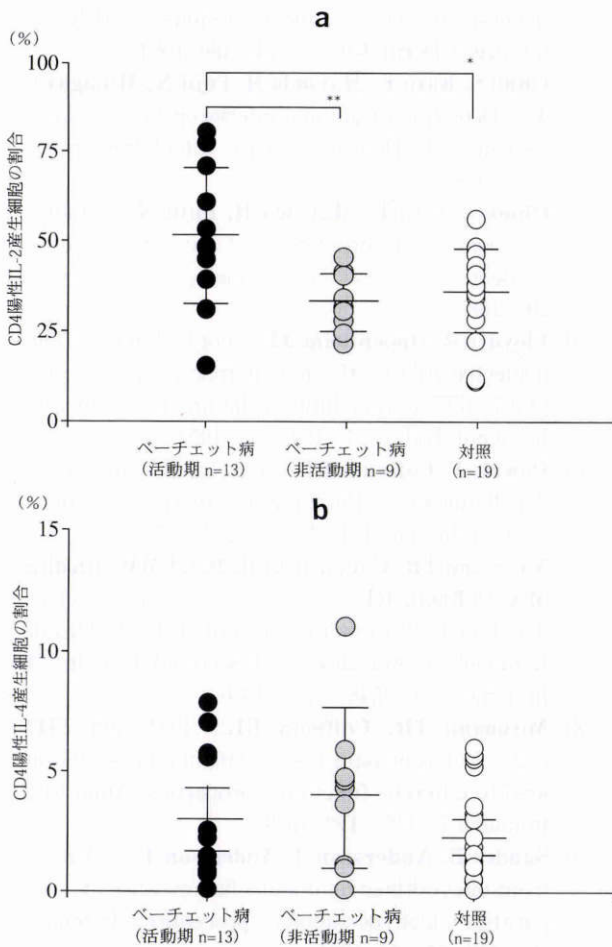


図5 CD4 陽性細胞中のサイトカイン産生細胞の割合。  
固相化抗 CD 3 抗体刺激下で 6 時間培養後の CD 4 陽性細胞中のサイトカイン産生細胞の割合および平均値±標準偏差を示す。n=検体数。a: IL-2 産生 CD 4 陽性細胞の割合。b: IL-4 産生 CD 4 陽性細胞の割合。\*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.005$ 。

同様の傾向が観察された。潜在的な Th サブセットを明らかにするために固相化抗 CD 3 抗体を用いて T 細胞を活性化し、細胞内にサイトカインを蓄えてから測定した。ただし、この刺激によりリンパ球の増加や割合の変化はなかった。IL-2 産生 CD 4 陽性細胞の CD 4 陽性細胞の中での割合は、0 時間で  $21.7 \pm 12.6\%$ 、6 時間で  $36.5 \pm 11.3\%$ 、10 時間で  $28.2 \pm 16.7\%$ 、24 時間で  $22.1 \pm 14.2\%$ 、48 時間で  $21.9 \pm 11.8\%$  で、図 4 a のような経時変化を示した。IL-4 産生 CD 4 陽性細胞については、図 4 b に示す通り 6 時間において最も高い値を示した。ベーチェット病患者でも同様に検討したところ、刺激後 6 時間で同様にピークを示した。これにより抗 CD 3 抗体で刺激した場合、刺激後 6 時間において蓄積されるサイトカイン産生量がピークに達すると考えられた。

##### 5. ベーチェット病ぶどう膜炎の活動性とサイトカイン産生細胞の割合

ベーチェット病患者 22 例のうち、活動性の症例は 13 例、非活動性の症例は 9 例であった。活動期患者群では、

採血前 6 か月間に眼発作を 3~6 回、平均 4.3 回起こしていた。一方、非活動期患者群では、0~2 回、平均 1.1 回眼発作がみられた。眼症状以外の全身症状では、外陰部潰瘍は陰性の症例もあったが、皮膚症状、口腔内アフタはほぼ眼症状の程度に比例していた。活動期患者群の血液データでは、平均で、白血球数  $8,300/\mu\text{l}$ 、単核球数  $2,020/\mu\text{l}$ 、CRP  $2.1 \text{ mg/dl}$ 、赤沈  $21 \text{ mm}$  であった。白血球および単核球の絶対数は活動期、非活動期で有意な差はなかった。

抗 CD 3 抗体刺激後 6 時間における CD 4 陽性細胞中の IL-2 産生細胞の割合は、ベーチェット病活動期患者群  $51.3 \pm 18.5\%$  であり、対照群の  $36.5 \pm 11.3\%$  に比べ有意に高値を示した ( $p < 0.01$ )。また、非活動期患者群 ( $32.1 \pm 7.9\%$ ) と比べても有意に高値を示した ( $p < 0.005$ )。一方、非活動期患者群と対照群との間には有意差がなかった (図 5 a)。

抗 CD 3 抗体刺激後 6 時間における CD 4 陽性細胞中の IL-4 産生細胞の割合は、ベーチェット病活動期患者群では  $3.6 \pm 2.8\%$  であり、非活動期患者群 ( $4.4 \pm 3.3\%$ )、対照群 ( $2.2 \pm 2.0\%$ ) との間には有意差はなかった (図 5 b)。

また、末梢血分離直後 0 時間では、ベーチェット病活動期患者群の CD 4 陽性細胞中の IL-2 産生細胞の割合は  $32.6 \pm 21.6\%$  であり、非活動期患者群 ( $11.2 \pm 9.3\%$ ) に比べ有意に高値を示した ( $p < 0.01$ )。対照群は  $21.7 \pm 12.6\%$  であった。IL-4 産生細胞の割合は、活動期患者群  $1.9 \pm 1.9\%$  で、非活動期患者群 ( $3.5 \pm 3.6\%$ ) および対照群 ( $2.5 \pm 2.3\%$ ) と比べ差はなかった。

## IV 考 按

ベーチェット病は全身諸臓器のリンパ球および好中球浸潤を特徴とする慢性再発性の炎症を来す疾患である。この病態には、好中球の機能過剰に基づく活性酸素の産生亢進による組織障害が重要であると考えられてきた<sup>10)</sup>。近年、リンパ球などの免疫担当細胞が産生するサイトカインについて研究が進み、活動性のぶどう膜炎を有するベーチェット病患者において、血中の高 IFN- $\gamma$  活性<sup>3)</sup>や PBMC の IFN- $\gamma$  産生能の亢進<sup>4)</sup>が報告された。また、血清中の可溶性 IL-2 レセプターがベーチェット病患者で高値を示したという報告<sup>11)</sup>もみられ、ベーチェット病の免疫病態の形成には、好中球よりもむしろリンパ球がより重要であると考えられるようになってきた。さらに、ベーチェット病患者のリンパ球は IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-8 を過剰に産生すること<sup>12)</sup>や、血清 IL-1、TNF- $\alpha$  の上昇も報告されていることから、ベーチェット病では、リンパ球の中でも特に Th 1 サイトカイン産生細胞の数的増加、機能亢進が考えられてきた。

今回我々は、ベーチェット病患者の末梢血リンパ球内のサイトカインを直接免疫染色し、フローサイトメト

リーで解析することにより、CD4陽性細胞中の各サイトカイン産生細胞の割合を検討することができた。その結果、ベーチェット病活動期患者では、IL-2産生CD4陽性細胞の割合が非活動期患者群あるいは対照群に比べ有意に高く、ベーチェット病の眼症状の活動性にTh1サイトカイン産生CD4陽性細胞が深く関与していることが示唆された。

採血直後0時間の末梢血リンパ球を同様に染色し解析したところ、ベーチェット病活動期患者群では、PBMC中のIL-2産生CD4陽性細胞の割合は非活動期群に比べ有意に高かった。この0時間での解析は生体内ですでに活性化されたThサブセットを表し、生体内での状態をよりよく反映するものと考えられる。ベーチェット病活動期患者群ではCD4陽性細胞が生体内においてすでに活性化されており、Th1サイトカインであるIL-2産生を活発に行っていることが示唆される。中村ら<sup>13)</sup>の報告でも、ベーチェット病患者末梢血CD4陽性細胞上のCD25抗原は対照群に比べ有意の高値を示し、非活動期の症例と比べても有意差がみられた。この結果は、活動期患者末梢血中のCD4陽性細胞の活性化を示しているものと思われる。

一方、IL-4産生CD4陽性細胞の割合は、刺激後6時間で活動期患者群、非活動期患者群、対照群で有意差はみられなかった。CD4陽性細胞中のIL-4産生細胞の割合は通常でも10%以下であり、群間の差の判定は難しいが、IL-4はベーチェット病の病態には直接関与していないことが推察される。

以上から、ベーチェット病活動期患者では、Th1サイトカイン産生細胞の割合が増加しており、眼症状の活動性と相関していることが明らかにされた。ベーチェット病は繰り返す炎症発作をいかに抑制するかが極めて重要であり、視力予後はこの発作の頻度、程度を抑えることにより改善される。今回の解析方法はベーチェット病眼症状の活動性の判定に有用であり、今後の治療指針の目安となり得ると考えられる。

#### 文 献

- 1) 橋本喬史, 徳富研二: ベーチェット病, 自己免疫疾患およびアレルギー性疾患. 総合臨床 38: 550—554, 1989.
- 2) Inoue C, Itoh R, Kawa Y, Mizoguchi M: Path-

- ogenesis of mucocutaneous lesions in Behçet's disease. *J Dermatol* 21: 474—480, 1994.
- 3) Ohno S, Kato F, Matsuda H, Fujii N, Minagawa T: Detection of gamma interferon in the sera of patients with Behçet's disease. *Infect Immun* 36: 202—208, 1982.
- 4) Ohno S, Kato F, Matsuda H, Fujii N: Studies on spontaneous production of gamma-interferon in Behçet's disease. *Ophthalmologica* 185: 187—192, 1982.
- 5) Lloyd AR, Oppenheim JJ: Poly's lament: The neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today* 13: 169—172, 1992.
- 6) Powrie F, Coffman RL: Cytokine regulation of T-cell function: Potential for therapeutic intervention. *Immunol Today* 14: 271—274, 1993.
- 7) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. *J Immunol* 136: 2348—2357, 1986.
- 8) Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145—173, 1989.
- 9) Sander B, Andersson J, Andersson U: Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol Rev* 119: 65—93, 1991.
- 10) Niwa Y, Miyake S, Sakane T, Shingu M, Yokoyama M: Auto-oxidative damage in Behçet's disease-endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils. *Clin Exp Immunol* 49: 247—255, 1982.
- 11) BenEzra D, Maftzir G, Kalichman I, Barak V: Serum levels of interleukin-2 receptor in ocular Behçet's disease. *Am J Ophthalmol* 115: 26—30, 1993.
- 12) 木谷 敦, 原まさ子, 川越光博: ベーチェット病患者好中球の活性化に関わる各種サイトカインの検討. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 平成2年度研究業績: 91—92, 1990.
- 13) Nakamura S, Sugita M, Matoba H, Tanaka S, Isobe F, Ohno S: Insufficient expression of Fas antigen on helper T cells in Behçet's disease. *Br J Ophthalmol* 80: 174—176, 1996.