

網膜および溶連菌熱ショック蛋白質 60 の分子生物学的検討

田中 孝男, 鈴木 潤, 山川 直之, 臼井 正彦

東京医科大学眼科学教室

要 約

目 的：再発する口腔アフタや抜歯がベーチェット病の眼炎症発作に先行することから、口腔に常在する溶血連鎖球菌(溶連菌)の刺激がこの疾患の発症に関与すると考えられている。溶連菌の加熱抗原の接種で患者は眼炎症発作や全身症状が誘発される。また、患者の血清に網膜の熱ショック蛋白質(HSP)60 と反応する自己抗体があり、これは *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) の HSP 60 とも交差反応を呈する。さらに、網膜の HSP 60 を動物に接種すると実験的ぶどう膜炎が惹起された。したがって、網膜と *S. pyogenes* の HSP 60 はこの疾患の発症に関わると考え、その性状を分子生物学的に解析した。

方 法：*S. pyogenes* から抽出した DNA とウシ網膜 cDNA library を鋳型に、HSP 60 遺伝子領域を polymerase chain reaction (PCR) 法で増幅した。増幅された各断片について DNA シークエンサーで塩基配列を決定

し、アミノ酸の配列を推定した。その解析結果を基にペプチドを合成した。そして、このペプチドを完全 Freund の アジュバントと混和し、ラットに接種して実験的ぶどう膜炎が発症するか否かを検討した。

結 果：ウシ網膜および *S. pyogenes* HSP 60 について、約 200 残基の内部配列を決定した。その結果、両者の配列は 47% 相同した。主として、ヒト HSP 65 の 245 ~ 259 番に相当する網膜 HSP 60 と溶連菌 HSP 60 のペプチドで実験的ぶどう膜炎の発症があった。

考 按：網膜と *S. pyogenes* の HSP 60 のアミノ酸組成を基に、ベーチェット病の発症機序を検討することは意義あるものと考えた。(日眼会誌 104: 328—333, 2000)

キーワード：ベーチェット病, 溶血連鎖球菌, 熱ショック蛋白質, アミノ酸配列, 実験的ぶどう膜炎

Molecular Biological Analysis of Retinal and Streptococcal Heat-shock Protein 60

Takao Tanaka, Jun Suzuki, Naoyuki Yamakawa and Masahiko Usui

Department of Ophthalmology, Tokyo Medical University

Abstract

Purpose : The observation of recurrent oral aphtha preceding ocular inflammation in patients with Behçet's disease suggests a role of oral *Streptococcus* in the etiology of this disease. Heat-treated *Streptococcus* antigen can induce ocular inflammation or systemic symptoms in Behçet's disease patients. Furthermore, the presence of an autoantibody against retinal heat-shock protein 60 (HSP 60) has been detected in the sera of these patients. Injection of extracted retinal HSP 60 also induces experimental uveitis in treated rats. The characteristics of retinal HSP 60 and HSP 60 from *S. pyogenes* were evaluated using a molecular biological approach.

Methods : The gene encoding HSP 60 was isolated by polymerase chain reaction (PCR) from a bovine retinal cDNA library and from *S. pyogenes* DNA. The DNA sequence of the HSP 60 coding region was determined, and the amino acid sequences of the encoded proteins were predicted from the DNA se-

quence. The synthetic peptide (50 nmol) was emulsified with Freund's complete adjuvant and injected into rats.

Results : Comparison of the amino acid sequences of Streptococcal and bovine retinal HSP 60 revealed about 200 residue regions with 47% homology. Experimental uveitis was mainly induced in rats inoculated with retinal HSP 60-derived peptide or *Streptococcus* HSP 60-derived peptide that is equivalent to residues 245~259 of human HSP 65.

Discussion : The retinal and Streptococcal HSP 60 amino acid composition is thought to be important and useful for investigating the mechanisms involved in the induction of Behçet's disease (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 328—333, 2000)

Key words : Behçet's disease, *Streptococcus*, Heat-shock protein, Amino acid sequence, Experimental uveitis

別刷請求先：160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学眼科学教室 田中 孝男

(平成 11 年 4 月 15 日受付, 平成 11 年 11 月 25 日改訂受理)

Reprint requests to: Takao Tanaka, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical University, 6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan

(Received April 15, 1999 and accepted in revised form November 25, 1999)

I 緒 言

ベーチェット病の原因は未だ不明である。その病因については、内因として遺伝的素因と、外因として環境因子が注目されている。遺伝的素因として疾患感受性に関わるヒト白血球抗原(HLA)B51¹⁾や、HLA-B領域から腫瘍壊死因子(TNF)遺伝子間に存在する主要組織適合遺伝子複合体(MHC)class I chain-related gene A(MICA)遺伝子²⁾が重要と考えられている。一方、環境因子としては口腔アフタがこの疾患の眼炎症発作に先行することや、抜歯後炎症が起こるため、口腔に常在する溶血連鎖球菌(以下、溶連菌)の刺激が注目されてきた³⁾⁴⁾。

ベーチェット病患者の $\gamma\delta$ T細胞がヒトリンパ球や結核菌に由来する65 kDの熱ショック蛋白質(heat-shock protein, HSP)のあるアミノ酸配列に著しく反応⁵⁾⁶⁾することや、その配列を基に合成したペプチドで実験的なぶどう膜炎が惹起されることが報告⁷⁾された。我々は患者の血清に細菌性のHSP 60および網膜HSP 60と交叉反応する自己抗体が存在⁸⁾することを明らかにした。この網膜HSP 60には実験的にぶどう膜炎を惹起する組成が含まれていると推測される⁹⁾。さらに、溶連菌*Streptococcus pyogenes*(以下、*S. pyogenes*)や種々の細胞から抽出したHSP 60に対する液性免疫応答を検討すると、患者の血清は網膜と*S. pyogenes*のHSP 60に対する抗体価の上昇を示した¹⁰⁾。患者に加熱処理した溶連菌成分を皮内に接種すると、高率に眼炎症発作が誘発され、全身症状も悪化¹¹⁾する。以上のことから、本報告では網膜や*S. pyogenes*のHSP 60がベーチェット病の発症に重要と考え、HSP 60の性状を分子生物学的に検討し、各々のアミノ酸配列を明らかにした。また、幾つかのペプチドを合成し、それらを動物に接種し実験的にぶどう膜炎が惹起されるか否かを検討した。

II 方 法

1. 網膜および溶連菌 HSP 60 のクローニングと合成ペプチドの作製

1) Polymerase chain reaction (PCR) プライマーの作製

ウシ網膜および*S. pyogenes*のHSP 60遺伝子領域をPCR増幅するため、最初に幾つかの生物種間(*E. Coli*, *streptomyces*, human, ratのHSP 60)で保存性の高い領域を検索した。その結果、⁸¹AGDTTTA⁹¹領域と²⁷⁵VKAPGFGD²⁸²領域(アミノ酸の位置は大腸菌HSP 60を基準)が保存されていることから、以下のPCRプライマーを合成した。プライマーはN末端側、5'側から増幅するものをHSP 60-S→と、C末端側3'側から増幅するものをHSP 60-AS←と表記した。すなわち、HSP 60-S→: 5'-GCI GGI GA (T/C) GGI ACI ACI ACI GC-3' (23 mer) と HSP 60-AS←: 5'-TCI CC (A/G) AAI CCI GGI GC (T/

C) TTI AC-3' (23 mer) である。

2) DNA の調製

ウシ網膜cDNAライブラリー(Stratagene, 米国)500 μ l に対し、5 μ g/mlのDNase 2.5 μ lと5 μ g/mlの2.5 μ l RNaseを加えて、37°Cで30分間反応させた。その後、20% polyethylen glycol/2.5 M NaClを500 μ l加えて、氷上で1時間放置した。遠心によりファージを回収し、500 μ lのSM bufferに再懸濁した。さらに、10 mM EDTA/0.1% SDSを加えて、65°Cで15分処理することによりファージDNAを精製した。*S. pyogenes*のゲノムDNAは、約5 mgの菌体(OK-432, ピシバニール, 中外製薬)からSepa Gene(和光純薬)を用いて調製した。

3) DNA の増幅

調製した各DNAを鋳型に1)項で示したプライマーを用いてPCRによるクローニングを行った。

4) *S. pyogenes* HSP 60 の DNA 解析

得られたPCR断片をMicrospin TM S-400 HR カラム(Pharmacia Amersham, スウェーデン)で精製した後、DNAシーケンサーPRISM 377 (PE Biosystems, Foster, 米国)で塩基配列を決定した。

5) 網膜 HSP 60 の DNA 解析

得られたPCR断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、SUPREC-01(宝酒造)で精製、SureCloneキット(Pharmacia Amersham, スウェーデン)を用いてプラスミドpUC 18に挿入した。大腸菌JM 109を形質転換した後、増幅断片が挿入されたポジティブクローンを選別し、塩基配列を決定した。ベーチェット病患者のリンパ球がヒトHSP 65や結核菌HSP 65のある塩基配列と特異的に反応し、その配列を基に合成したペプチドで実験的なぶどう膜炎を惹起したとの報告⁷⁾がある。今回、それらの結果を参考に、網膜HSP 60や溶連菌HSP 60のペプチドを合成した。なお、ペプチドがS抗原やinterphotoreceptor retinoid-binding protein, rhodopsinやphosducinなど動物にぶどう膜炎を起こす既知の蛋白組成と相同性が高いことはSwissProtデータベースで確認した。

2. 接 種 実 験

1) 接 種

接種動物は、15週齢、体重約280 gで雄のLewisラット(日本クレア)を用いた。合成ペプチド(各50または100 nmol)を生理食塩水で0.1 mlに調整し、等量の完全 Freundのアジュバント(DIFCO, 米国)と混和した後、足蹠部に接種した。同時に不活化百日咳菌混濁液(和光純薬)1 ml(10¹⁰個)も腹腔に投与した。対照群は生理食塩水とアジュバントと百日咳菌を投与した群、百日咳菌のみを投与した群および無処置の群とした。

2) 眼症状と眼組織所見

接種後、細隙灯顕微鏡で前眼部症状を観察した。炎症のみられたものは種々の時期に眼球を摘出した。眼球は10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋

表1 網膜と溶連菌熱ショック蛋白質(HSP)60のアミノ酸配列

(1) 網膜 HSP 60のアミノ酸配列

¹⁰⁹AGDGT T T A T V L A R S I A K E G F E K I S K G A N P V E I R R G V M -
L A V D A V I A E L K K Q S K P V T T P E E I A Q V A T I S A N G D K E I G N -
I T S D A M K K V G R K G V I T V K D G K T L N D E L E I I E G M K F D R G -
Y I S P Y F I N T S K G Q K C E F Q D A Y V L L S E K K I S S V Q S I V P A L E I -
A N A H R K P L V I A E D V D G E A L S T L V L N R L K V G L Q V V A V K -
A P G F G³⁰⁶

(2) 溶連菌 HSP 60のアミノ酸配列

¹¹⁰G D G T T T A T V L T Q A I V H E G L K N V T A G A N P I G I R R G I E T -
A T A T A V E A L K A I A Q P V S G K E A I A Q V A A V S S R S E K V G E Y -
I S E A M E R V G N D G V I T I E E S R G M E T E L E V V E G M Q F D R G Y -
L S Q Y M V T D N E K M V A D L E N P F I L I T D K K V S N I Q D I L P L L E -
E V L K T N R P L L I A D D V D G E A L P T L V L N K I R G T F N V V A V K -
A P G F G³⁰⁶

後,切片をヘマトキシリン・エオジン染色し,光学顕微鏡で観察した。

III 結 果

1. 網膜,溶連菌 HSP 60 のアミノ酸配列の解析

ウシ網膜 HSP 60 は 198 残基,溶連菌 HSP 60 は 196 残基が推定された(表1)。これらの配列を GENETYX-MAC を用いて比較した結果,互いに 47.2% の割合で相同性があった。ウシ網膜 HSP 60 の配列はヒトリンパ球 HSP 65 と同領域において 99% 相同した。クローニング

表2 合成ペプチド

由来	表記	配列番号	塩基配列
網膜 HSP 60	RE-1	136~150	NPVEIRRGVMLAVDA
	RE-2	180~198	KEIGNITSDAMKKVGR-KGV
	RE-3	245~259	LLSEKKISSVQSIVP
溶連菌 HSP 60	ST-1	136~150	NPIGIRRGJETATAT
	ST-2	176~195	SRSEKVGGEYISEAMER-VGN
	ST-3	245~259	LITDKKVSNIQDILP

配列番号はヒト HSP65の塩基配列に準ずる。

の結果を基に網膜と溶連菌 HSP 60 について,各3種類(計6種類)の合成ペプチドを作製した(表2)。

2. 実験的ぶどう膜炎(表3)

合成したペプチドのうち,RE-1,RE-2,RE-3とST-3を接種したラットの前眼部に軽度の線維素の析出が接種後約2週間目に観察された。ヒト HSP 65 の 254~259 番目に相当する RE-3 と ST-3 で比較的発症率が高かった。

3. 眼組織所見

前房に線維素の析出や虹彩後癒着が観察された。虹彩血管の周囲にリンパ球を中心とした炎症細胞浸潤があった(図1)。対照群に炎症はなかった。

IV 考 按

本報告で明らかになったことは,ウシ網膜と溶連菌の HSP 60 についてアミノ酸配列を部分解析し,それを基に

表3 ぶどう膜炎の発症

接種抗原	接種量(nmol)	前眼部の線維素析出(n=ラット)	発症日
網膜 HSP 60			
RE-1	50	1/3	12.0
	100	0/3	—
RE-2	50	1/3	13.0
	100	0/3	—
RE-3	50	3/3	12.7*
	100	3/6	12.3*
溶連菌 HSP 60			
ST-1	50	0/3	—
	100	0/3	—
ST-2	50	0/3	—
	100	0/3	—
ST-3	50	1/3	13.0
	100	2/6	11.0*
対照群			
生理食塩水	0	0/3	—
CFA + B.p.	0	0/3	—
Bpのみ	0	0/3	—
無処置	0	0/3	—

前眼部の症状は軽度のものが多く,組織学的に炎症を確認した。対照群に炎症はなかった。

発症日は接種後日数,*印は平均を示す。

CFA:完全 Freund のアンジュバンド, Bp:不活化百日咳菌

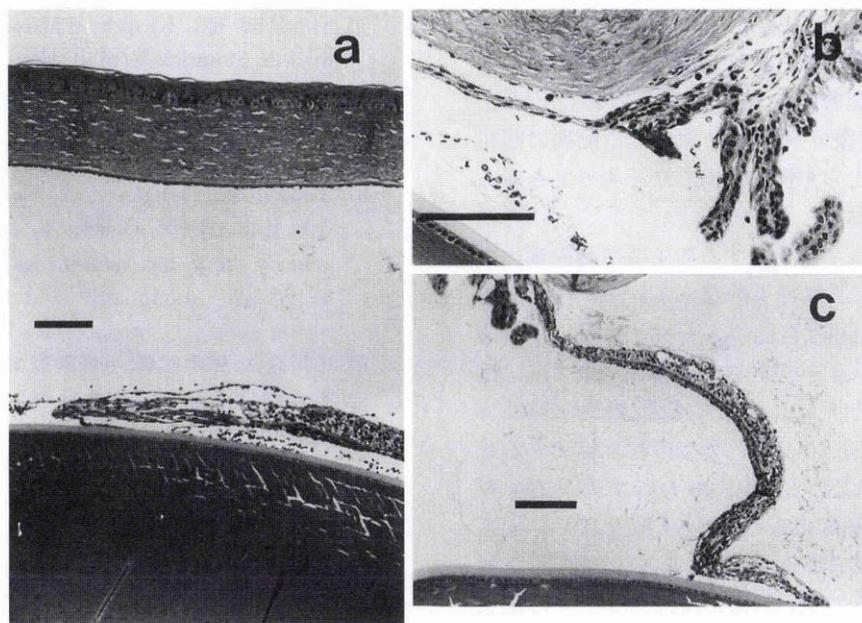


図 1 病理組織所見.

- a: RE-3 を接種したラットの虹彩所見. 前房内に線維素の析出や虹彩後癒着があり, リンパ球を中心とした炎症細胞浸潤が虹彩にあった. バーは 100 μm
- b: RE-3 を接種したラットの虹彩毛様体所見. 血管の拡張が著しく, 好中球の浸潤も観察された. バーは 100 μm
- c: ST-3 を接種したラットの虹彩, 毛様体所見. 溶連菌由来のペプチド ST-3 を接種したラットでも虹彩に軽度の炎症細胞浸潤があった. バーは 100 μm

合成したペプチドをラットに接種すると実験的なぶどう膜炎が惹起されたことである. ウシ網膜 HSP 60 はヒト HSP 65 の配列と 99% と極めて相同性が高かったので, ウシ網膜のペプチドで虹彩炎を起こしたことは, ヒトの HSP 65 でぶどう膜炎を惹起した既報⁷⁾を検証したことになる. 一方, 結核菌と 40% 相同する溶連菌 HSP 60 のペプチド ST-3 で虹彩炎が確認されたことは, 新しい知見と思われる.

溶連菌の先行感染によって, 溶連菌の HSP 60 に反応する免疫応答が誘導され, それが自己免疫疾患の発症に関与するという報告¹³⁾がある. こうした考え方にとって, 溶連菌 HSP 60 のペプチドで虹彩炎が惹起されたことは重要と思われる. ベーチェット病患者に加熱処理した溶連菌成分を接種すると, 高率に眼炎症発作が誘発され, 全身症状も悪化¹¹⁾するので, 患者はこの菌に強く感作されていると推察される. 実際, ベーチェット病患者には扁桃腺炎や歯肉炎などの慢性, あるいは再発性口腔感染症の既往が多く, その口腔病変の周囲組織は溶連菌抗原の刺激を受けている¹²⁾.

ベーチェット病患者の $\gamma\delta$ 型 T 細胞はヒトリンパ球や結核菌の HSP 65 の特定の amino 酸配列に著しく反応⁶⁾する. 健常者でも, 弱毒化ウシ型結核菌 (Bacille de Calmette et Guérin, BCG) を接種された者の単核白血球分画を purified protein derivative of tuberculin (PPD) で刺激すると, CD 4-CD 8- の $\gamma\delta$ 型 T リンパ球の増加¹⁴⁾が

ある. 我が国では結核予防法に基づき BCG 接種が行われている. したがって, 日本人は BCG 接種を受けない国の人々と比較すると, $\gamma\delta$ 型 T リンパ球が誘導されやすいと推測される. この $\gamma\delta$ 型 T リンパ球が結核菌の HSP 60 のみならず, BCG に感染したマクロファージに由来する内因性の HSP 60 とも反応するか否かが, 自己免疫疾患と HSP 60 の関係で注目される点である.

BCG を接種しない米国 (カリフォルニア州やハワイ州) の日系人に, 本邦でみられるようなベーチェット病の眼症状を呈する者はいないと報告¹⁵⁾¹⁶⁾されている. 同様の観点で他の自己免疫疾患をみると, 高安病も BCG 接種の行われない国では発生しないため, その発症に BCG が関与するとの説¹⁷⁾がある. したがって, BCG は本邦のベーチェット病にも何らかの影響を及ぼしているのではないかと推察される. 種々の 60 kD の HSP は互いに相同性が高いので, 溶連菌と結核菌の HSP の関係はベーチェット病の発症機序や病像の形成にとって重要と考えた.

ペプチドで虹彩炎が起こる機序は不明であるが, 実験的自己免疫性脳脊髄炎にぶどう膜炎が伴う場合, 虹彩上皮に抗 HSP 60 モノクローナル抗体と反応する細胞が出現¹⁸⁾する. したがって, 接種したペプチドと相同性の高い HSP 60 のエピトープが何らかの機序で虹彩に発現したため, 炎症が惹起されたと考えた. 主にヒト HSP 65 の 245~259 番目の塩基配列に相当する RE-3 と ST-3 でぶ

どう膜炎があつが、発症率は高くなく炎症も軽度であった。ヒト HSP 65 の 336~351 番目の配列 (HU 18 ペプチド) と患者リンパ球が著しく反応するとの報告¹⁹⁾もある。網膜あるいは溶連菌で HU 18 に相当する配列に眼組織に激しい炎症をもたらす性質があるかを調べてみることは興味深いと思われる。

臓器特異的の自己免疫病を発症する新生時期胸腺摘出マウスでは、65 kD の HSP に特異的な $\alpha\beta$ T リンパ球が増加する。この T リンパ球は自己のスーパー抗原に特異的な受容体である TcRV β を有するため、HSP 60 は自己抗原の認識を補助すると考えられる²⁰⁾。また、慢性関節リウマチのモデルでは、HSP 60 は自己免疫応答を規制するとの考え²¹⁾が支持されている。HSP 60 のペプチドで虹彩炎が惹起されることを考えると、自己抗原としての働きが想定されるため、機能的にみると前述の調節的な働き²⁰⁾²¹⁾と矛盾するように思われる。今後、ペプチドの抗原性や動物の免疫応答を検討し、ペプチドと虹彩炎の関係にどのような特異性があるのかを明確にしたい。

本実験で明らかにした網膜と *S. pyogenes* の HSP 60 のアミノ酸配列は、ベーチェット病の発症機序を分子レベルで検討することに役立つと考えた。

この研究は、平成 10 年度文部省科学研究費基盤研究 C の助成を受け (課題番号 09671817) 行った研究成果の一部である。

文 献

- 1) Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M: Close association of HLA-Bw 51 with Behçet's disease. Arch Ophthalmol 100: 1455-1458, 1982.
- 2) Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, et al: Triple repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet's disease. Proc Natl Acad Sci USA 94: 1298-1303, 1997.
- 3) Yokota K, Hayashi S, Araki Y, Isogai E, Kotake S, Yoshikawa K, et al: Characterization of *Streptococcus sanguis* isolated from patients with Behçet's disease. Microbiol Immunol 39: 729-732, 1995.
- 4) 吉川浩二, 小竹 聡, 松田英彦: ベーチェット病と連鎖球菌抗原. 日眼会誌 100: 173-180, 1996.
- 5) Pervin K, Childerstone A, Shinnick T, Mizushima Y, van der Zee R, Hassan A, et al: T cell epitope expression of mycobacterial and homologous human 65-kilodalton heat shock protein peptides in short term cell lines from patients with Behçet's disease. J Immunol 151: 2273-2282, 1993.
- 6) Hassan A, Fortune F, Wilson A, Warr K, Shinnick T, Mizushima Y, et al: Role of $\gamma\delta$ T cell in pathogenesis and diagnosis of Behçet's disease. Lancet 347: 789-794, 1996.
- 7) Stanford MR, Kasp E, Whiston R, Hasan A, Todyk S, Shinnick T, et al: Heat shock protein peptides reactive in patients with Behçet's disease are uveitogenic in Lewis rats. Clin Exp Immunol 97: 226-231, 1994.
- 8) Tanaka T, Yamakawa N, Yamaguchi H, Okada AA, Konoeda Y, Ogawa T, et al: Common antigenicity between *Yersinia enterocolitica*-derived heat-shock protein (HSP) and the retina, and its role in uveitis. Ophthalmic Res 28: 284-288, 1996.
- 9) 山川直之, 田中孝男, 毛塚剛司, 臼井正彦: ぶどう膜炎における熱ショック蛋白質の関与. 日眼会誌 102: 411-416, 1998.
- 10) Tanaka T, Yamakawa N, Koike N, Suzuki J, Mizuno F, Usui, M: Behçet's disease and antibody titers to various heat-shock protein 60 s. Ocular Immunol Inflamm 7: 69-74, 1999.
- 11) The Behçet's Disease Study Research Committee of Japan: Skin hypersensitivity to Streptococcal antigens and the induction of systemic symptoms by the antigen in Behçet's disease - a multicenter study. J Rheumatol 16: 506-511, 1989.
- 12) Kaneko F, Takahashi Y, Muramatsu Y, Miura Y: Immunological studies on aphthous ulcer and erythema nodosum-like eruptions in Behçet's disease. Br J Dermatol 113: 303-312, 1985.
- 13) Lemos JAC, Giambiagi-Demarval M, Castro ACD: Expression of heat-shock proteins in *Streptococcus pyogenes* and their immunoreactivity with sera from patients with streptococcal disease. J Med Microbiol 47: 711-715, 1998.
- 14) Haregewoin A, Soman G, Hom RC, Finberg RW: Human $\gamma\delta$ T cells response to mycobacterial heat shock protein. Nature 340: 309-312, 1989.
- 15) 倉恒匡徳, 自見庄三郎, 広畑富雄, Nomura A: ハワイにおけるベーチェット病の疫学調査, ハワイ日系人と日本人 (日本本土) の比較をもとに. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和 49 年度研究業績, 27-28, 1974.
- 16) 大野重昭, 杉浦清治: カリフォルニア大学眼科における Behçet 病. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和 50 年度研究業績, 15-17, 1975.
- 17) Kothari SS: Aetiopathogenesis of Takayasu's Arteritis and BCG vaccination: The missing link? Med Hypotheses 45: 227-230, 1995.
- 18) 隈上武志, 加藤信介, 大浜栄作: 実験的の自己免疫性脳脊髄炎に合併する虹彩炎におけるストレス応答蛋白質 60 の発現 - 免疫組織学的研究 -. 日眼会誌 101: 299-304, 1997.
- 19) Kaneko S, Suzuki N, Yamashita N, Nagafuchi H, Nakajima T, Wakisaka S, et al: Characterization of T cells specific for an epitope of human 60-kD heat shock protein (hsp) in patients with Behçet's disease (BD) in Japan. Clin Exp Immunol 108: 204-212, 1997.

20) **Iwasaki A, Yoshikai Y, Yuuki H, Takimoto H, Nomoto K**: Self-reactive T cells are activated by the 65-kDa mycobacterial heat shock protein in neonatally thymectomized mice. *Eur J Immunol* 21:597-603, 1991.

21) **van Eden W, van der Zee R, Paul AGA, Prakken BJ, Wendling U, Anderton SM, et al**: Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases? *Immunol Today* 19:303-307, 1998.
